

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Mr sci. Milutin Antić, dr vet. med.

POVEZANOST KONCENTRACIJE PROTEINA AKUTNE
FAZE I FAKTORA KOJI UTIČU NA FUNKCIJU ENDOTELA
KOD PASA PRIRODNO INFICIRANIH PROTOZOOM
Leishmania spp.

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Milutin Antić, DVM, MSc

THE ASSOCIATION OF CONCENTRATIONS OF ACUTE
PHASE PROTEINS AND THE FACTORS INFLUENCING
ENDOTHELIAL FUNCTION IN DOGS NATURALLY
INFECTED WITH PROTOZOON *Leishmania* spp.

PhD thesis

Belgrade, 2023.

Mentori

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

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

Članovi komisije

dr Dragan Bacić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

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

dr Dragiša Trailović, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Istraživanja sprovedena u ovoj tezi podržalo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200143).

The thesis was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract number 451-03-68/2022-14/200143).

Datum odbrane.....

Kratak sadržaj

Lajšmanioza je teško hronično oboljenje pasa i ljudi, koja je u Mediteranskom basenu izazvana protozom *Leishmania infantum*. Prenosi se putem peščanih mušica iz roda *Phlebotomus*. Pas je glavni rezervoar ovog patogena. Crna Gora je endemsko žarište lajšmanioze pasa, pre svega opštine Bar i Ulcinj. Naročito su ugroženi psi litalice i psi u prihvatilištima koji nisu obuhvaćeni nikakvim merama prevencije. U literaturi, lajšmanioza pasa je opisana sa aspekta kliničko-patološkog nalaza i poremećaja strukture i funkcije tkiva i organa tokom četiri tipične progresivne faze bolesti. Manje su zastupljena savremena istraživanja vezana za različite aspekte specifičnog ćelijskog i humoralnog imunskog odgovora. Takođe, postoji i opravdana potreba da se prošire saznanja o funkcionalnom stanju vaskularnog endotela. Budući da se on nalazi na neposrednom „udaru“ specifičnog humoralnog imuniteta, dalja istraživanja bi doprinela razumevanju mehanizama III tipa preosetljivosti i vaskulitisa, odnosno lokalne i sistemske inflamacije, karakteristične za odmakle faze bolesti. Zbog toga je cilj ove disertacije bio da se ispita veza pojedinih markera oštećenja tkiva i markera oštećenja vaskularnog endotela kod lajšmanioze pasa u različitim fazama bolesti.

Materijal i metode: Izvedena je opservaciona studija preseka na 50 pasa sa kliničkim znacima lajšmanioze u različitim fazama bolesti. Studija je sprovedena na višku materijala prikupljenog posle dijagnostike lajšmanioze i tokom njene terapije kod pasa u jednom od prihvatilišta za napuštene pse u opštini Bar, Crna Gora. Lajšmanioza je dijagnostikovana na osnovu kliničke slike i seroloških nalaza, dobijenih komercijalnim *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) paketom reagenasa. Dodatnu procenu zdravstvenog stanja omogućile se rutinske hematološke i biohemijske analize krvi. Posle postavljanja dijagnoze, na osnovu kliničkih znakova i vrednosti nivoa IgG antitela protiv *Leishmania* spp. psi su podeljeni u tri grupe. Prvu grupu je činilo 14 pasa sa umerenim kliničkim znacima multiorganskog karaktera i visokim nivoom antitela, koji nisu u prethodnom periodu bili na terapiji. U drugoj grupi je bilo 9 pasa sa sličnim znacima bolesti i serološkim rezultatima, ali koji su dobijali kombinovanu terapiju miltefosinom, alopurinolom, i vitaminima B kompleksa. Treća grupa obuhvatila je 27 pasa sa blagim znacima bolesti i niskim nivoom antitela – ni kod ovih pasa nije primenjivana terapija. U višku seruma je određena zastupljenost pojedinih proteinskih frakcija elektroforezom na agaroznom gelu; kao i nivoi proteina akutne faze (engl., *acute phase proteins* – APP): serum amiloida A (SAA) - komercijalnim ELISA paketom reagenasa; ceruloplazmina (CER), haptoglobina (HPT), paraoksonaze-1 (PON-1) - spektrofotometrijski. Iz odnosa koncentracija pozitivnih i negativnih APP izračunati su njihovi indeksi. Ukupne tiolske grupe (TIOL) su takođe određene spektrofotometrijski. Ispitivanja faktora koji utiču na funkciju endotela uključilo je homocistein (Hcy) i matriksne metaloproteinaze (MMP). Koncentracija Hcy određivana je automatizovanim jednostepenim hemiluminiscentnim imunometrijskim testom. Zimografskom metodom analizirane su aktivnosti MMP. Kao važan faktor u formiranju imunskih kompleksa i

patogenezi III tipa preosetljivosti određen nivo ukupnih IgA uz *Western blot* tehnike. Za statističku analizu korišćene su metode deskriptivne statistike, χ^2 test, Kruskal-Wallis test sa *post hoc* analizom po Conover-u, Sperman-ova korelaciona, kao i multipla regresiona analiza.

Rezultati: Obe grupe pasa sa umerenom formom bolesti su imale viši nivo IgG protiv *Leishmania* spp. ($P < 0,001$), nižu hematokritsku vrednost ($P < 0,042$), niži broj leukocita ($P < 0,021$), višu koncentraciju uree ($P < 0,001$), kreatinina ($P < 0,001$), ukupnih proteina ($P < 0,001$), višu aktivnost alanin aminotransferaze (ALT) ($P < 0,001$) i nižu koncentraciju albumina ($P < 0,001$) u odnosu na pse sa blagom formom bolesti. Trigliceridi su bili najviši kod pasa sa umerenom formom bolesti i terapijom ($P < 0,002$) dok je aspartat aminotransferaza (AST) bila viša kod iste grupe pasa, ali samo u odnosu na pse sa blagom formom bolesti ($P < 0,001$). Razdvajanjem proteinskih frakcija pokazano je da obe grupe pasa sa umerenom formom imaju poliklonsku gamapatiju ($P = 0,001$). Koncentracija SAA se nije razlikovala između grupa, dok su koncentracije CER ($P = 0,010$) i HPT ($P = 0,008$) bile veće kod obe grupe pasa sa umerenom formom bolesti. Aktivnost PON-1 je bila niža kod pasa sa umerenom formom bez terapije u odnosu na pse sa blagom formom ($P = 0,048$). Na osnovu pet indeksa APP u čijem izračunavanju su kao pozitivni APP u različitim kombinacijama korišćeni SAA, CER i HPT, a kao negativan korišćen albumin, potvrđeno je da su promene najmanje izražene u blagoj formi bolesti. Aktivnost proMMP-2 je bila niža kod pasa sa umerenom formom bez terapije u odnosu na one sa blagom formom bolesti ($P = 0,038$), aktivnost proMMP-9 se nije razlikovala između grupa, ali je aktivnost MMP-9 bila niža u obe grupe sa umerenom formom u odnosu na blagu formu ($P = 0,001$). Koncentracija Hcy je bila najniža ($P = 0,021$), a odnos PON-1/Hcy najviši kod pasa koji su terapiрани ($P = 0,023$). Koncentracija TIOL-a kao i odnos TIOL/Hcy se nije razlikovao između grupa. Nivo ukupnih IgA je bio viši kod pasa sa umerenom formom i terapijom u odnosu na pse sa blagom formom bolesti ($P = 0,014$). Takođe, aktivnost svih ispitanih MMP je negativno korelirala sa formom bolesti i aktivnošću AST, dok se kao nezavisni prediktor aktivnosti proMMP-2 i proMMP-9 pokazala alkalna fosfataza, a za MMP-9 je to bila ALT. Koncentracija Hcy je bila u negativnoj korelaciji sa formom bolesti kao i sa terapijom i sa svim biohemijskim parametrima koji pokazuju oštećenje ili poremećaj funkcije tkiva i organa. Jedini pozitivni prediktori koncentracije Hcy bili su broja eritrocita, odnosno koncentracija hemoglobina. Nivo IgA je bio u pozitivnoj korelaciji sa formom bolesti i sa većinom pokazatelja oštećenja tkiva dok je bio u negativnoj korelaciji sa koncentracijom albumina, MMP-9 i Hcy.

Zaključak: Uopšteno posmatrano, izvedena ispitivanja pokazuju da je kod pasa sa umerenom formom bolesti, bez obzira na tronedeljnu terapiju, postojalo teže oštećenje tkiva i jači humoralni odgovor na infekciju sa *Leishmania* spp. povezan sa većim stepenom sistemske inflamacije i težim stepenom disfunkcije endotela u odnosu na pse sa blagom formom bolesti. Takođe, rezultati studije ukazuju na opravdanost daljeg

proučavanja aktivnosti proMMP-2 i koncentracije Hcy, kao potencijalnih pokazatelja (dis)funkcije endotela, u smislu praćenja pozitivnih ishoda terapije.

Ključne reči: Lajšmanioza, psi, klinički oblici, proteini akutne faze, pokazatelji oštećenja endotela

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Patološka fiziologija

UDK broj: 619:616.933.161:636.7.045(043.3)

Summary

Leishmaniosis is a severe chronic disease of dogs and humans which is in the Mediterranean region caused by the protozoan *Leishmania infantum*. It is transmitted by sandflies belonging to the genus *Phlebotomus*. Dogs are the main reservoir of this pathogen. Montenegro is an endemic focus of canine leishmaniosis, particularly in the municipalities of Bar and Ulcinj. Stray dogs and dogs in animal shelters, for which there are no preventive measures, are particularly at risk. Canine leishmaniosis has been described in terms of clinicopathological findings and disturbances in the structure and function of tissues and organs during four typical progressive stages of the disease. Current research on various aspects of specific cellular and humoral immune responses is less well-represented. In addition, there is a need to increase the knowledge regarding the functional state of the vascular endothelium. Because it is directly "hit" by specific humoral immunity, further research would contribute to the understanding of the mechanisms of type III hypersensitivity and vasculitis, that is, local and systemic inflammation characteristic of the advanced stages of the disease. Therefore, the aim of this dissertation was to investigate the relationship between specific markers of tissue damage and vascular endothelial damage in canine leishmaniosis at different stages of the disease.

Material and methods: An observational cross-sectional study was performed on 50 dogs with clinical signs of leishmaniosis in different stages of the disease. The study was conducted on excess material collected after the diagnosis of leishmaniosis and during its therapy in dogs in one of the shelters for abandoned dogs in the municipality of Bar, Montenegro. Leishmaniosis was diagnosed based on the clinical picture and serological findings, obtained with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reagent package. Routine hematological and biochemical blood analyzes enabled an additional assessment of the state of health. After diagnosis, on the basis of clinical signs and values of IgG antibodies against *Leishmania* spp. the dogs are divided into three groups. The first group consisted of 14 dogs with moderate clinical signs of a multiorgan character and a high level of antibodies, which had not received therapy in the previous period. In the second group, there were 9 dogs with similar disease signs and serological results, but which received combined therapy with miltefosine, allopurinol, and B vitamins. The third group included 27 dogs with mild signs of the disease and a low level of antibodies - no therapy was applied to these dogs either. In the excess serum, the representation of certain protein fractions was determined by electrophoresis on agarose gel; as well as levels of acute phase proteins (APP): serum amyloid A (SAA) - with a commercial ELISA package of reagents; ceruloplasmin (CER), haptoglobin (HPT), paraoxonase-1 (PON-1) - spectrophotometrically. Their indices were calculated from the ratio of positive and negative APP concentrations. Total thiol groups (TIOL) were also determined spectrophotometrically. Examination of factors affecting endothelial function included homocysteine (Hcy) and matrix metalloproteinases (MMPs). The concentration of Hcy was determined by an automated one-step chemiluminescent immunometric test.

MMP activities were analyzed using the zymographic method. As an important factor in the formation of immune complexes and the pathogenesis of type III hypersensitivity, the level of total IgA was determined using Western blot techniques. Descriptive statistics, χ^2 test, Kruskal-Wallis test with *post hoc* analysis according to Conover, Spearman's correlation and multiple regression analysis were used for statistical analysis.

Results: Both groups with moderate leishmaniasis had higher levels of IgG against *Leishmania* spp. ($P < 0.001$), lower hematocrit ($P < 0.042$) and leukocyte count ($P < 0.021$), higher concentrations of urea ($P < 0.001$), creatinine ($P < 0.001$), total protein ($P < 0.001$), alanine aminotransferase (ALT) ($P < 0.001$), and lower albumin levels ($P < 0.001$) than dogs affected with the mild form of the disease. Triglycerides were the highest in the group consisting of treated dogs ($P < 0.002$), while the same group of dogs had higher aspartate aminotransferase activity (AST), but only in comparison with the group of dogs with the mild form of leishmaniasis ($P < 0.001$). Serum protein electrophoresis revealed the presence of polyclonal gammopathy in dogs with moderate leishmaniasis, regardless of whether they received therapy ($P = 0.001$). The concentration of SAA did not differ between the groups, while both groups with the moderate form had higher CER ($P = 0.010$) and HPT ($P = 0.008$) levels than the dogs with the mild form. The PON-1 activity measured in untreated dogs with moderate leishmaniasis was lower than that recorded in dogs with mild disease ($P = 0.048$). The five APP indexes, calculated by combining SAA, CER, and HPT, as the positive and albumin, as the negative APP, additionally confirmed that the changes were the least protruding in the mild form. Lower proMMP-2 levels were measured in untreated dogs with the moderate disease than in those with mild leishmaniasis ($P = 0.038$). The groups had similar proMMP-9 activity; nevertheless, MMP-9 activity was lower in both groups with moderate disease than in the group with mild leishmaniasis ($P = 0.001$). The Hcy concentration was the lowest ($P = 0.021$), and the PON-1/Hcy ratio was the highest among the treated dogs ($P = 0.023$). Serum TIOL levels and the TIOL/Hcy ratio did not differ between the groups. Total IgA was higher in the treated dogs with the moderate disease than in the dogs with the mild form ($P = 0.014$). Furthermore, the activity of all tested MMPs was negatively correlated with the disease severity and AST activity; alkaline phosphatase appeared as an independent predictor of proMMP-2 and proMMP-9 activities, while in the case of MMP-9, it was ALT. Hcy was in a negative correlation with the stage of the disease, treatment, and the biochemistry parameters indicating the damage or dysfunction of tissues and organs. The only positive predictors of Hcy concentration were erythrocyte number and hemoglobin concentration. IgA levels were positively correlated with the disease stage and the majority of the laboratory indicators of tissue damage, while a negative correlation existed with albumin, MMP-9, and Hcy levels.

In summary, the tests performed show that dogs with a moderate form of the disease had more severe tissue damage and a stronger humoral response to *Leishmania* spp. infection associated with a higher degree of systemic inflammation and a more severe degree of endothelial dysfunction compared with dogs with a mild form of the disease,

regardless of the three-week therapy. In addition, the results of this study indicate that further investigation of proMMP-2 activity and Hcy levels are warranted as potential indicators of endothelial (dys)function in terms of monitoring positive therapeutic outcomes.

Key words: Leishmaniosis, dogs, clinical stages, acute phase proteins, indicators of endothelial dysfunction

Scientific field: Veterinary medicine

Field of academic expertise: Pathophysiology

UDC: 619:616.933.161:636.7.045(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Istorijat ispitivanja lajšmanioze.....	3
2.2. Uzročnici lajšmanioze.....	5
2.3. Vektori koji prenose protozou <i>Leishmania</i> spp.....	7
2.4. Razvoj <i>Leishmania</i> spp u peščanoj mušici.....	10
2.5. Rezervoari <i>Leishmania</i> spp	12
2.6. Odgovor ćelija domaćina na infekciju <i>Leishmania</i> spp.....	13
2.7. Lajšmanioza kod ljudi.....	15
2.8. Lajšmanioza kod pasa.....	17
2.9. Epidemiologija i epizootologija lajšmanioze.....	18
2.9.1. Lajšmanioza u Crnoj Gori.....	18
2.9.2. Lajšmanioza u Srbiji.....	19
2.9.3. Lajšmanioza u Hrvatskoj.....	19
2.9.4. Lajšmanioza u Bosni i Hercegovini.....	20
2.9.5. Lajšmanioza u Severnoj Makedoniji.....	20
2.9.6. Lajšmanioza u Albaniji.....	21
2.10. Klinička slika lajšmanioze pasa.....	21
2.11. Dijagnostika lajšmanioze pasa.....	23
2.11.1. Laboratorijski pokazatelji lajšmanioze pasa.....	25
2.11.2. Značaj proteina akutne faze u dijagnostici lajšmanioze.....	31
2.11.3. Značaj molekula koji utiču na ili pokazuju funkciju endotela u patogenezi i dijagnostici lajšmanioze.....	36
2.12. Terapija lajšmanioze pasa.....	40
2.13. Kontrola i prevencija.....	43
3. CILJ I ZADACI.....	45
4. MATERIJAL I METODE.....	46
4.1. Životinje, kriterijumi za dijagnostiku lajšmanioze i eksperimentalne grupe.....	46
4.2. Uzorkovanje krvi za dijagnostičke testove.....	47
4.3. Hematološka ispitivanja.....	47
4.4. Određivanje nivoa antitela protiv <i>Leishmania</i> spp. u serumu.....	47
4.5. Određivanje osnovnih biohemijskih parametara u serumu.....	47
4.6. Određivanje koncentracije serum amiloida A u serumu.....	48

4.7. Određivanje koncentracije ceruloplazmina, haptoglobina i aktivnosti paraoksonaze-1 u serumu.....	48
4.8. Elektroforeza proteina seruma na agaroznom gelu.....	48
4.9. Određivanje matriks-metaloproteinaza -2 i -9 u serumu.....	49
4.10. Određivanje koncentracije homocisteina u serumu.....	49
4.11. Određivanje imunoglobulina A u serumu.....	49
4.12. Određivanje koncentracije tiola u serumu.....	50
4.13. Statistička obrada rezultata.....	50
5. REZULTATI.....	51
5.1. Anamnestički, klinički i serološki podaci ispitivanih grupa.....	51
5.2. Rezultati hematoloških i osnovnih biohemijskih analiza.....	57
5.3. Rezultati ispitivanja proteinskih frakcija seruma dobijenih elektroforezom u agaroznom gelu.....	60
5.4. Koncentracija proteina akutne faze.....	61
5.5. Aktivnost matriks metaloproteinaza.....	65
5.6. Koncentracija homocisteina.....	66
5.7. Koncentracija imunoglobulina A.....	68
5.8. Korelacije molekula koji utiču na ili pokazuju funkciju endotela.....	69
6. DISKUSIJA.....	75
6.1. Klinički i serološki podaci ispitivanih grupa.....	75
6.2. Rezultati hematoloških i osnovnih biohemijskih analiza.....	76
6.3. Elektroforeza proteina i koncentracije proteina akutne faze.....	77
6.4. Aktivnost matriks metaloproteinaza.....	77
6.5. Koncentracija homocisteina.....	78
6.6. Koncentracija IgA.....	80
7. ZAKLJUČCI.....	82
8. LITERATURA.....	83
Prilog 1 Izjava o autorstvu	
Prilog 2 Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
Prilog 3 Izjava o korišćenju	

1. UVOD

Lajšmanioza je teško, neretko fatalno oboljenje pasa i ljudi, izazvano jednoćelijskim parazitom – protozom iz roda *Leishmania*. Bolest prenose peščane mušice – papataći, nevidi ili flebotomusi (*Phlebotomus*), koje ubodom psa ili čoveka u kožu ubrizgavaju parazite, da bi se posle izvesnog vremena razvili simptomi bolesti. Rezervoar bolesti je uglavnom pas (insekti se inficiraju ubodom zaraženog psa i posle parazite prenose na druge pse i ljude), ređe čovek. Kod mediteranskog tipa bolesti osnovni lanac infekcije čine pas-flebotomus-pas, čovek se retko uključuje u lanac infekcije, za razliku od tropskog oblika u kome je čovek osnovni rezervoar.

Kod ljudi se bolest javlja u kožnom (kutana forma), kožno-sluzokožnom (mukokutana forma) i visceralnom obliku (kala-azar, “crna smrt”). Kod pasa se uglavnom javlja visceralna ili generalizovana forma, hroničnog toka, pri čemu veliki broj inficiranih životinja u dužem vremenskom periodu ne ispoljava nikakve simptome bolesti ili ispoljava nespecifične simptome, iako predstavljaju rezervoar koji može da inficira flebotomuse u zoni gde se nalaze.

Lajšmaniozu pasa izaziva *Leishmania infantum*, flagelarna protozoa koja invadira ćelije monocitno-makrofagnog sistema životinje i u njima se umnožava. Pod rizikom su najviše psi koji spavaju napolju, s obzirom da su papataći insekti koji napadaju noću. Pored pasa, rezervoar mogu da budu i druge vrste životinja – konji, mačke i glodari. Najveća žarišta su u severnoj Africi, Srednjoj i Južnoj Americi, jugoistočnoj Aziji, zatim u zemljama Mediterana, zato što vektorima pogoduju vlažna i topla staništa, odakle se bolest može širiti i u neendemska područja. Za infekciju je prijemčiv svaki pas nakon uboda ovog insekta, dok razvoj kliničke forme bolesti zavisi od imunološkog stanja jedinke, potencijalnih koinfekcija, ali i od patogenosti samog parazita, kao i od mogućih reinfekcija. Zbog ovoga, infekcija lajšmanijom i bolest lajšmanioza nisu sinonimi.

Lajšmanioza se smatra endemičnom bolešću u preko 70 zemalja sveta. U Evropi se do skora smatralo da je ova bolest ograničena samo na regiju Mediterana, da bi poslednjih desetak godina sve veći broj slučajeva lajšmanioze pasa bio prijavljen i u severnim zemljama kao što su Nemačka, Holandija, Velika Britanija, Poljska i sl.

Jedno od endemskih žarišta lajšmanioze najbližih Srbiji je Crna Gora. Bolest je česta u primorskom području u okolini Bara i Ulcinja, te regiji Podgorice, za razliku od severnih delova Crne Gore gde se bolest javlja mnogo ređe. Kod ljudi u Crnoj Gori dominantna je visceralna lajšmanioza, koja je prisutna u više od 99% registrovanih slučajeva. U istim regijama se sa najvećom učestalošću javlja i lajšmanioza pasa, pri čemu posebno zabrinjava veliki broj zaraženih pasa koji ne ispoljavaju jasne kliničke simptome, iako predstavljaju izvor infekcije za peščane mušice koje potom ugrožavaju zdravlje drugih pasa i ljudi. Naročito su ugroženi psi litalice, zatim psi u prihvatilištima, budući da kod njih primena preventivnih mera nije na zadovoljavajućem nivou. S obzirom da se radi o turističkim regijama u koje turisti sve češće dovode i svoje kućne ljubimce, mnogi

slučajevi lajšmanioze pasa potvrđeni u Srbiji pripisuju se boravku u nekom od endemskih područja, najčešće na crnogorskom primorju.

Klinički znaci bolesti kod pasa su nespecifični i neretko liče na simptome mnogih drugih bolesti koje se javljaju na istim područjima. Ako zanemarimo pse koji ne ispoljavaju nikakve simptome, iako su zaraženi i potencijalno opasni po okolinu, kod klinički bolesnih pasa se relativno često zapažaju promene na koži, mršavljenje, gubitak apetita, zamaranje, šepanje, letargija, polidipsija i poliurija, limfadenomegalija i splenomegalija, epistaksa, onihogrifoza, proliv i povraćanje, promene na očima itd. U endemskim područjima prevalenca obolelih pasa u sveukupnoj populaciji ponekad dostiže 30%, u populaciji asimptomatskih životinja višestruko više, sa seroprevalencijom od 5 do 70%. U poslednje vreme se lajšmanioza javlja i u regionima gde ranije nije bila prisutna, s jedne strane zbog kretanja pasa iz rizičnih područja u područja gde nije endemski prisutna i, s druge strane, zbog klimatskih promena koje doprinose širenju endemičnih područja. Tipičan primer je Srbija, gde se lajšmanioza nekoliko poslednjih decenija smatrala iskorenjenom, da bi poslednjih godina izveštaji o pojavi bolesti bili sve učestaliji, čak i na severu zemlje. Serološka studija u Crnoj Gori pokazuje da seroprevalenca ide od 6% u populaciji asimptomatskih pasa do blizu 60% u populaciji bolesnih pasa.

Da li će i u kom stepenu biti izraženi klinički znaci prvenstveno zavisi od imunskog odgovora životinje – kao i kod ljudi, bolest se češće ispoljava kod izgladnelih, stresu izloženih pasa. Asimptomatski psi imaju veću sposobnost eliminacije amastigota iz organizma, zahvaljujući dominaciji Th1 citokina (IFN- γ , TNF- α i IL-2). Kod obolelih pasa ćelijski imunski odgovor je oslabljen, jer prevladava sekrecija Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-10, i TGF- β).

Efikasna kontrola lajšmanioze zavisi od kontrole vektora – insekata i rezervoara – pasa. Ključni momenat je rano otkrivanje rezervoara – inficiranih pasa, koji se mogu na vreme podvrgnuti terapiji, kako bi se sprečilo širenje parazita na insekte, a time i na druge – zdrave pse i ljude. U tom pogledu su posebno važni psi litalice i prihvatilišta za pse litalice, u kojima se zbrinjava veliki broj pasa nepoznatog zdravstvenog stanja – kontrola ovih pasa bi u velikoj meri doprinela efikasnijem suzbijanju i sprečavanju ove bolesti, kako kod vlasničkih pasa, tako i kod ljudi.

2. PREGLED LITERATURE

Lajšmanioza je vektorski prenosivo oboljenje izazvano flagelarnom protozoozom iz roda *Leishmania*. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), lajšmanioza je jedna od sedam najvažnijih tropskih bolesti i predstavlja ozbiljan svetski zdravstveni problem, koji se manifestuje kroz širok spektar kliničkih formi s potencijalno smrtnim ishodom (Torres-Guerrero i sar., 2017). Bolest je raširena u tropskom i subtropskom području i potvrđena u 98 zemalja Evrope, Azije, Afrike i Amerike (Alvar i sar., 2012).

U svetu je lajšmanijom zaraženo između 12 i 15 miliona ljudi, a 350 miliona je u opasnosti od oboljevanja. Procenjuje se da se svake godine registruje od 1,5 do 2 miliona novih slučajeva lajšmanioze, koja je uzrok smrti kod čak 70.000 ljudi (Torres-Guerrero i sar., 2017).

2.1. Istorijat istraživanja lajšmanioze

Praistorijski fosilni ostaci predstavljaju izvor podataka o postojanju parazita sličnih lajšmaniji. U burmanskome ćilibaru iz perioda krede, u izumrloj peščanoj mušici *Palaeomyia burmitis* prisutan je fosilni ostatak nalik lajšmaniji, koji je kasnije svrstan u fosilni rod *Paleoleishmania* pod imenom *Paleoleishmania proterus*. Dodatne analize potvrdile su da je parazit u digestivni trakt mušice dospelo sa krvnim obrokom poreklom od reptila je potvrđeno da je parazit u probavni trakt peščane mušice unet sisanjem krvi reptila. Takođe, poznat je i fosil nazvan *Paleoleishmania neotropicum*, identifikovan u ostacima peščane mušice *Lutzomyia adiketis*, nađenim u dominikanskom ćilibaru starom više desetina miliona godina (Steverding, 2017).

Brojne dokaze o infekcijama parazitima roda *Leishmania* nude Ebersov papirus, glinene pločicama u biblioteci asirskog kralja Ašurbanipala, te egipatske i peruanske mumije. U persijskim spisima, *Abu Bekr Muhamed ibn Zakarija al-Razi* je 930. godine ostavio zapis o pojavi kožnih rana nalik kutanoj lajšmanijazi. Nadalje, veliki persijski filozof i lekar Avicena je u 11. veku precizno opisao kutane manifestacije lajšmanioze, nazvavši ih orijentalnim čirevima tj. "balkh sore" (Steverding, 2017).

Istorijski podaci govore da je do pojave lajšmanijaze u Južnoj Americi, prvenstveno u regijama Perua i Ekvadora, dolazilo i pre i tokom vladavine Inka (Medenica, 2016). Ostaci keramike iz predkolumbovskog perioda sadrže prikaz lica na kome se uočavaju deformacije slične onima koje se viđaju od obolelih od mukokutane lajšmanijaze (Tuon i sar., 2008). Takođe, rezultati morfoloških i molekularnih ispitivanja četiri ženske lobanje, nađene u pustinji San Pedro de Atakama, govore u prilog prisutva lajšmanijaze u 11. veku na teritoriji Južne Amerike, preciznije u severnom Čileu (Costa i sar., 2009).

Na područjima Bliskog istoka i Azije bolest je bila poznata kao „aleppo boil“, „jeriho boil“, „bagdad boil“, nazivima koji se i danas mogu sresti (Maxfield i Crane, 2021). U zapisima Dr *Alexander-a Russell-a* (1715–1768) iz 1756. godine, nastalim tokom njegovog boravka u Alepu, može se pronaći detaljan opis orijentalnih čireva. Dr *William-*

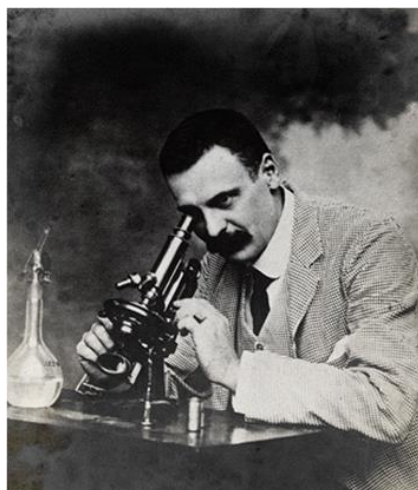
u *Twining*-u (1790–1835), vojnom hirurgu, pripadaju zasluge za jedan od najranijih izveštaja o kala-azaru. U svom članku iz 1827. godine on je opisao obolele u regionu Bengal, kod kojih se zapažala iscrpljenost, splenomegalija, malokrvnost i povremena temperatura (Steverding, 2017).

Ispitivanja koja je 1885. godine sproveo škotski lekar i prirodnjak *David Douglas Cunningham* (1843–1914), isključila su bakterijsku prirodu bolesti. Ova saznanja je trinaest godina kasnije upotpunio ruski vojni hirurg *Peter Borovsky* (1863–1932) zaključkom da je uzročnik parazitu (Güran, 2018). Sledeće saznanje o identitetu parazita dao je *William Boog Leishman* (1865–1926), major u britanskoj vojsci, kada je u maju 1903. godine, kada je na preparatu *post mortem* punkatata slezine kahektičnog vojnika koji je patio od hipotermije i hronične dizenterije, opisao mala ovalna telašca. Činjenica da je vojnik oboleo tokom službovanja u regionu Kalkute uputila ga je na zaključak da su u pitanju bili mrtvi i degenerisani oblici tripanosoma, što je otvorilo mogućnost da se kala azar može smatrati oblikom tripanozomoze (Ross, 1903).

Irski lekar *Charles Donovan* (1863–1951), profesor fiziologije na Medicinskom fakultetu u Madrasu, je tokom analize uzoraka slezine dobijenih za života, odnosno na obdukciji Indijaca s remitentnom groznicom i splenomegalijom, pronašao slična telašca, ali se kod njega javila sumnja da ona predstavljaju degenerisane tripanozome. Zatražio je ekspertizu od Dr *Charles Louis Alphonse Laveran*-a (1845–1922), tadašnjeg renomiranog parazitologa, koji je bio mišljenja da je u pitanju bio novi parazit iz roda *Piroplasma* (Steverding, 2017).



Slika 1. Sir William Boog Leishman
(Steverding, 2017)



Slika 2. Major Charles Donovan
(Steverding, 2017)

Britanski lekar *Ronald Ross* (1857–1932) je imao nešto drugačije mišljenje, u smislu da uzročnik ne pripada *Piroplasma*-ma i predložio je proširenje nomenklature potpuno novim rodnom *Leishmania*, a samog uzročnika nazvao *Leishmania donovani*, prema naučnicima koji su ga prvi identifikovali (Ross, 1903). Diskusija na ovu temu je bila

aktuelna u narednoj godini, da bi na njenom kraju bio opšte prihvaćen predlog Dr *Ross*-a (Steverding, 2017).

U 1908. godini nomenklatura uzročnika lajšmanijaze unapređena je diferencijacijom *Leishmania infantum*, kao uzročnika mediteranske visceralne lajšmanioze, od *Leishmania donovani* odgovornog za nastanak indijskog kala-azara. Za ovo otkriće zaslužan je Dr *Charles Jules Henry Nicolle* (1866–1936), koji je iste godine zajedno sa Dr *Charles Comte*-om (1869–1943), u Tunisu identifikovao parazit i kod pasa, te označio pse kao važne rezervoare za visceralnu lajšmaniozu (Akhoundi i sar., 2016; Steverding, 2017).

2.2. Uzročnici lajšmanioze

Uzročnici lajšmanioze pripadaju kraljevstvu *Protista*, klasi *Kinetoplastea*, podklasi *Metakineto-plastina*, redu *Trypanosomatida*, familiji *Trypanosomatidae*, podfamiliji *Leishmanianae* i rodu *Leishmania*. Paraziti odgovorni za lajšmanioze su heteroksenozni tj. poseduju morfološke i fiziološke karakteristike koje im omogućavaju kolonizaciju dva domaćina. Preciznije, kod sisara kao domaćina obitavaju u fagocitima retikuloendotelnog sistema, dok se kod flobotomina, njihovog drugog domaćina, nastanjuju u probavnom traktu (Akhoundi i sar., 2016). U morfološkom smislu, paraziti roda *Leishmania* predstavljaju jednoćelijske eukariotske organizme, sa jasno diferenciranim jedrom i ostalim organelama, uključujući kinetoplaste i flagelu. U zavisnosti od toga u kojem se domaćinu nalaze, a samim tim i u kojoj su fazi životnog ciklusa, razlikuju se dva strukturna oblika – amastigot i promastigot. Amastigot invadira mononuklearne fagocite sisara. Ovaj ovalni, intracelularni oblik je nepokretan, budući da ne poseduje spoljnu flagelu. Dimenzije su mu 3–6 µm dužine i 1–3 µm u širine. Na prednjem kraju se, uz kinetoplast i bazalno telo, može uočiti i kratka flagela, koja se ne pomalja van ćelije. Promastigot je forma u kojoj je parazit prisutan u crevnom sistemu peščane mušice. Ova vanćelijska forma ima dužine 15–30 µm i širine 5 µm, što je čini znatno većom od unutraćelijske. Dodatno, i izduženi vretenasti oblik je razlikuje od amastigota. Svakako najvažniju razliku u morfološkom pogledu predstavlja veća dužina flagela, koja odgovara dužini same ćelije, i koja prominira van nje, čime je obezbeđena pokretljivost promastigotu. Jedro je u locirano u središtu ćelije, a ispred njega su kinetoplast i bazalna tela (Suryawanshi, 2021).

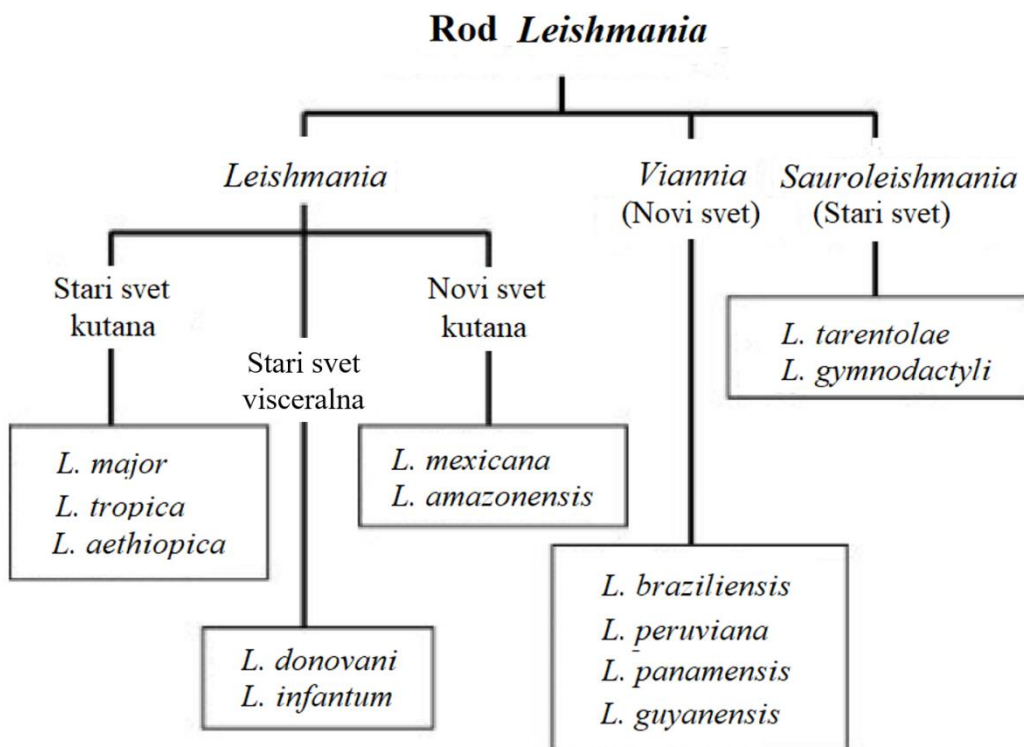
Staništa uzročnika lajšmanioze se geografski široko rasprostranjena. Prisutni su u tropskim i subtropskim područjima, uključujući Severnu, Srednju i Južnu Ameriku. Mogu se naći u regionu mediteranskog basena, jugoistočne Evropu, Bliskog istoka, srednjim i jugoistočnim delovima Azije, na indijskom potkontinentu, kako i u Africi. Takođe, postoje podaci da i Australija predstavlja njihovo stanište (Akhoundi i sar., 2016).

Klasifikacija uzročnika lajšmanioze je poprilično složena. Rod *Leishmania* obuhvata veliki broj morfološki sličnih kinetoplastičnih protozoa, uključujući nemali patogenih vrsta izazivača infekcija ljudi i životinja, čije kliničke manifestacije mogu varirati u širokom dijapazonu od blagih do fatalnih. Savremena nomenklatura parazita roda

Leishmania integriše biološke, imunološke, biohemijske i molekularne kriterijume (Croan i sar., 1997). Do sada je u različitim delovima sveta opisano više od 50 vrsta lajšmanija. Od oko 30 vrsta koje mogu inficirati sisare, za 21 je potvrđeno da su izazivači infekcija kod ljudi. Ukoliko se koristi geografska rasprostranjenost kao kriterijum, izazivači lajšmanioze se dele u dve osnovne grupe: lajšmanije Starog sveta, koje nastanjuju Evropu, Aziju i Africu, i lajšmanije Novog sveta, čija staništa predstvljaju regioni Amerike (Alemayehu i Alemayehu, 2017).

Bolest koju uzrokuju manifestuje se u četiri osnovna klinička oblika, što zavisi od toga gde je parazit lokalizovan, pa tako razlikujemo visceralnu, kutanu, difuzno-kutanu i mukokutanu lajšmaniozu (Akhoundi i sar., 2016).

Slika 3 predstavlja dalju klasifikaciju roda *Leishmania* na tri osnovna podroda: *Leishmania*, *Viannia* i *Sauroleishmania*. Neophodno je naglasiti da su na slici navedene samo vrste koje su bile predmet biomedicinskih studija, te da je potpuna klasifikacija znatno obimnija. Pripadnici podroda *Leishmania* i *Viannia* su uzročnici infekcija kod sisara, a *Sauroleishmania* kod reptila (Bates, 2007).



Slika 3. Klasifikacija parazita iz roda *Leishmania* (Kombinovano iz Bates, 2007 i Alemayehu i Alemayehu, 2017)

2.3. Vektori koji prenose protozou *Leishmania* spp.

Biološki vektor parazita roda *Leishmania* su pešćane mušice, poznate i pod nazivima papatači i nevidi. Ovi insekti pripadaju redu *Diptera* (sa dva krila), podredu *Nematocera*, familiju *Psychodidae* i podfamiliju *Phlebotominae* (Killick-Kendrick, 1999). Inicijalni taksonomski podaci o pešćanim mušicama zasnivali su se morfološkoj analizi mrtvih primeraka. Metodološka unapređenja, u smislu analize hromozoma, multivarijantne morfometrije, laboratorijske kultivacije i kolonizacije, funkcionalne i molekularne filogenske analize, kao i savremene instrumentalne analize, značajno su proširila spektar saznanja (Akhoundi i sar., 2016).

Najčešća podela pešćanih mušica je u dve velike grupe: pešćane mušice Starog sveta i pešćane mušice Novog sveta (Lewis, 1974). Između više od 800 priznatih vrsta pešćanih mušica, 464 vrste pronađene su u Novom svetu – Severnoj i Južnoj Americi i 375 u Starom svetu – Evropi, Africi i Aziji (Akhoundi i sar., 2016). Za 98 vrsta potvrđeno je da su vektori lajšmanioze kod ljudi: 42 vrste iz roda *Phlebotomus* u Starom svetu, i 56 vrsta iz roda *Lutzomyia* u Novom svetu (Marol i sar., 2013).

U Evropi, Africi i Aziji (Stari svet), uključujući i Australiju, potvrđeno je prisustvo tri roda pešćanih mušica: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* i *Chinius*, koje su pronađene u paleoartičkom, afrotropskom, malajskom, orijentalnom i australijskom regionu (Akhoundi i sar., 2016).

Rod *Phlebotomus* uključuje 13 podrodova. Oni su prisutni jedino u Starom svetu i praktično preovladavaju u paleoartičkom regionu koji je glavno umereno područje Starog sveta. Većina *Phlebotomus* vrsta stanovnici su semihumidnih i savanskih područja, ređe šuma. Dakle, geografska rasprostranjenost flebotomusa proteže se od mediteranskog, afrotropskog, srednje istočnog i orijentalnog regiona do središnje Azije.

Rod *Sergentomyia* podeljen je na 10 podrodova. Pripadnici ovog roda su široko rasprostranjeni u Starom svetu i dominantni su u tropskim područjima gde su vrste *Phlebotomus* mušica retke. Njihova distribucija obuhvata afrotropska, orijentalna i australo-azijska područja, indijsku podregiju, subsaharsku Afriku i Aziju (Akhoundi i sar., 2016). Dokazano je da pešćane mušice ovog reda nisu patogene za ljude već su vektori lajšmanija za reptile (Sadlova i sar., 2013).

Rod *Chinius* uključuje četiri poznate vrste. Geografska rasprostranjenost *Chinius* vrsta odgovara klasičnoj orijentalno-australijskoj regiji, a nalaze se u pećinama u visokim planinskim područjima (Akhoundi i sar., 2016).

Za razliku od Starog sveta, u Americi je potvrđeno prisustvo tri roda pešćanih mušica: *Lutzomyia*, *Warileya* i *Brumptomyia*, koje su pronađene u nearktičkom i neotropskom regionu.

Rod *Lutzomyia* je veliki rod, sa 434 vrste i nekoliko podgrupa. *Lutzomyia* je najvažniji rod u smislu raznolikosti vrsta i medicinske važnosti i pokazuje široku rasprostranjenost. Vrste ovog roda nalaze se samo u Novom svetu, s rasprostranjenošću koja se proteže od

južnih područja severne regije kroz neotropski region. Ove peščane mušice se nalaze uglavnom u šumskim područjima u Srednjoj i Južnoj Americi. Rod *Warileya* obuhvata šest vrsta, koje se uglavnom nalaze u neotropskoj ekozoni, a rod *Brumptomyia* 24 vrste, koje su široko rasprostranjene u Srednjoj i Južnoj Americi. Nema podataka da ijedna od ovih vrsta ubada ljude.

Tabela 1. Peščane mušice Starog sveta (Akhoundi i sar., 2016).

Rod <i>Phlebotomus</i>	Rod <i>Sergentomyia</i>	Rod <i>Chinius</i>
<i>Adlerius</i>	<i>Capensomyia</i>	<i>Junlianensis</i>
<i>Anaphlebotomus</i>	<i>Grassomyia</i>	<i>Barbazani,</i>
<i>Australophlebotomus</i>	<i>Neophlebotomus</i>	<i>Eunicegalatia</i>
<i>Euphlebotomus</i>	<i>Parrotomyia</i>	<i>Samarensis.</i>
<i>Idiophlebotomus</i>	<i>Parvidens</i>	
<i>Kasauliuls</i>	<i>Rondonomyia</i>	
<i>Larroussius</i>	<i>Sergentomyia</i>	
<i>Madaphlebotomus</i>	<i>Sintonius</i>	
<i>Paraphlebotomus</i>	<i>Spelaeomyia</i>	
<i>Phlebotomus</i>	<i>Vattieromyia</i>	
<i>Spelaeophlebotomus</i>		
<i>Synphlebotomus</i>		
<i>Transphlebotomus</i>		

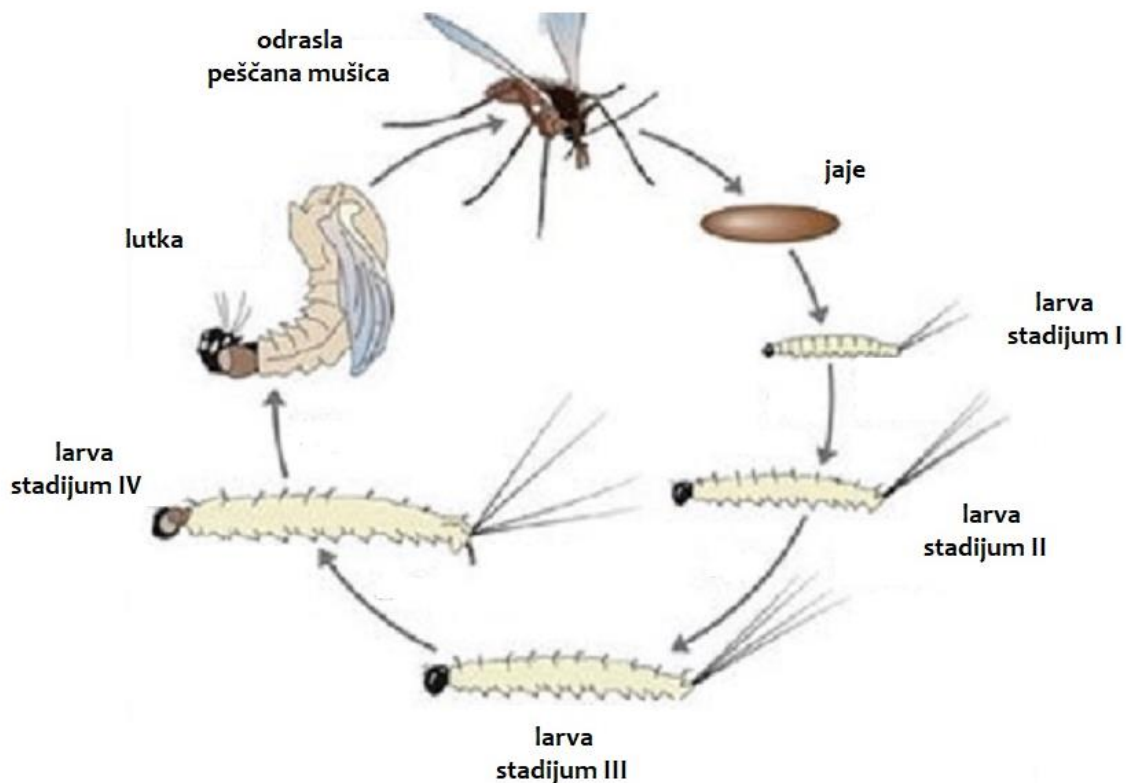
Tabela 2. Peščane mušice roda Lutzomyia (Akhoundi i sar., 2016)

Rod <i>Lutzomyia</i>		
<i>Coromyia</i>	<i>Micropygomyia</i>	<i>Psychodopygus</i>
<i>Dampfomyia</i>	<i>Nyssomyia</i>	<i>Sciopemyia</i>
<i>Evandromyia</i>	<i>Pintomyia</i>	<i>Trichophoromyia</i>
<i>Helcocytomyia</i>	<i>Pressatia</i>	<i>Trichopygomyia</i>
<i>Lutzomyia</i>	<i>Psathyromyia</i>	<i>Viannamyia</i>

Peščane mušice iz roda *Phlebotomus* su male, dužina tela retko prelazi 3 mm. Njihova boja varira od gotovo bele do gotovo crne. Postoje tri karakteristike koje omogućavaju brzo prepoznavanje: kada se odmaraju, pod uglom drže krila iznad trbuha, dlakave su i pre ugriza skoče na domaćina (Killick-Kendrick, 1999). Istraživanja su pokazala da je njihovo brzina malo manja od 1 m/s. Aktivne su noću, mada postoji nekoliko vrsta koje mogu ugristi i tokom dnevnog svetla. Za razliku od komarca, njihov napad je tih (Alkan i sar., 2013). Nastanjuju hladna i vlažna staništa, kao što su podrumi, staje, pećine, udubljenja u stenama, stablima ili na tlu, jazbinama glodara i drugih sisara, te u gnezdima ptica (Killick-Kendrick, 1999).

Ženke većine vrsta grizu na otvorenom prostoru, pa ih svrstavamo u egzofagične insekte. Ukoliko se tokom sazrevanja jaja odmaraju na otvorenom, svrstavamo ih u egzofilične, suprotno endofiličnim insektima, koji se odmaraju u zatvorenom prostoru (Alkan i sar., 2013). I mužjaci i ženke hrane se prirodnim izvorima šećera, dok se samo ženka hrani krvlju koja joj je potrebna za proizvodnju jaja (Alexander, 2000). Pojedine vrste se razlikuju po broju krvnih obroka uzetih tokom gonotrofnog ciklusa – neke će uzeti više od jednog krvnog obroka u različitim danima, dok će se druge hraniti samo jednom za svaku seriju jaja (Killick-Kendrick, 1999).

Razvojni ciklus peščane mušice odvija se u četiri faze, od jajeta, preko larve i lutke do odrasle jedinke i može zahtevati od mesec do mesec i po dana (Killick-Kendrick, 1999). Ženke polažu od 30 do 70 jaja što zavisi od vrste, veličine i prirode prethodnog krvnog obroka, prehrane larvi i drugih faktora. Jaja polažu na vlažnim, zaštićenim mestima, kao što su pukotine u stenama, podnožje drveća, rupe u stablima drveća, ispod lišća na šumskom tlu, jazbine za životinje, skloništa za životinje i slična mikrostanista, pojedinačno ili u skupinama (Lawyer i sar., 2017). Potrebno je 11–17 dana da se izlegu što zavisi od temperatura. Mikroskopske su veličine (0,3–0,5 mm dužine) i eliptičnog oblika (Claborn David, 2010). Larve se razvijaju tokom četiri razvojna stadijuma i u svakom sledećem su veće nego u prethodnom.



Slika 4. Šematski prikaz različitih faza životnog ciklusa peščane mušice od jajeta preko larve i lutke do odrasle jedinke (prevedeno iz Amro i Hamarsheh, 2020)

U prvom stadijumu larve imaju dve stražnje čekinje, dok u svim kasnijim stadijumima imaju četiri stražnje čekinje (Hussaini i sar., 2017). Prepoznatljive zadnje čekinje pomažu da se identifikuju larve peščane mušice (Claborn David, 2010). Na kraju četvrtog stadijuma larva postaje neprozirne bele boje i počinje transformacija u lutku. Prednja trećina tela larve postaje natečena, što se opisuje kao pre-pupa, pri čemu se u sledećih 24 sata pupiranje završava (Lawyer i sar., 2017). Nakon nekoliko dana iz lutke se razvijaju odrasle peščane mušice. Trajanje celog ciklusa, od polaganja jaja do odrasle peščane mušice, varira od 30 do 60 dana, što zavisi od vrste, temperature i dostupnosti hranljivih materija (Hussaini i sar., 2017).

Odrasle peščane mušice obično se pare u roku od nekoliko dana nakon izlaska iz stadijuma lutke, nakon čega ženka kreće u potragu za krvnim obrokom potrebnim za proizvodnju jaja. Hrane se u ranim jutarnjim i večernjim satima kada temperatura pada i raste vlaga, a prosečni životni vek im je oko 14 dana (Hussaini i sar., 2017).

2.4. Razvoj lajšmanija u peščanoj mušici

Životni ciklus lajšmanija odvija se između dva glavna morfološka oblika: unutarćelijskih amastigota u sisaru i pokretnih promastigota u vektoru – peščanoj mušici (Gossage i sar., 2003). Razvoj u vektoru počinje kada ženka peščane mušice proguta krvni obrok koji sadrži makrofage sa amastigotima, malim, nepokretnim, zaobljenim oblicima parazita

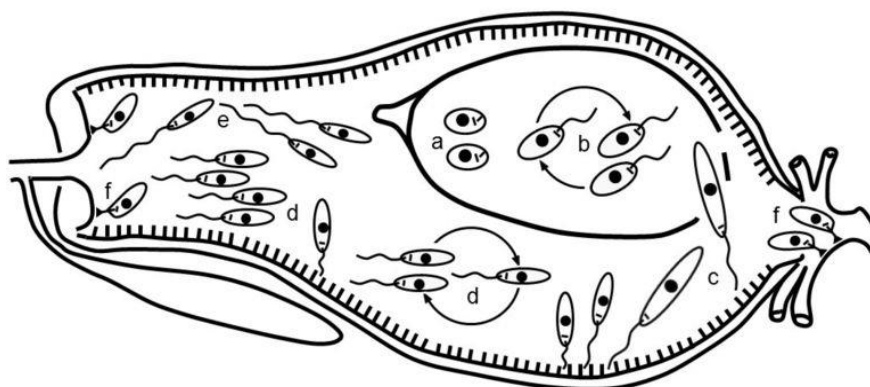
veliĉine 3–5 μm (Dostálová i Volf, 2012). Tokom "faze krvnog obroka" paraziti se nalaze na zadnjem kraju srednjeg creva zbog ĉega se ne mogu preneti. U zavisnosti od vrste parazita i vektora, tokom vremena sazrevanja mogu biti dodatni krvni obroci, mada većina parazita može da dovrši svoj razvoj u okviru jednog ciklusa sisanja krvi (Bates, 2007).

Promena uslova u kojima se nalaze, konkretno smanjenje temperature i povećanje pH, pokreće morfološku transformaciju i razvoj parazita u vektoru (Dostálová i Volf, 2012). Unutar srednjeg creva amastigoti se pretvaraju u procikliĉke promastigote, slabo pokretne forme sa kratkom flagelom. U ranoj fazi infekcije paraziti se razmnoŹavaju i morfološki transformišu unutar krvnog obroka okruŹenog peritrofiĉnom membranom. Ovaj ćelijski omotaĉ, izgraĊen od hitina, proteina i proteoglikana, kod većine insekata odvaja lumen creva od epitela srednjeg creva, ĉime zapravo pruŹa zaštitu epitelu od patogena i mehaniĉkog oštećenja (Sadlova i Volf, 2009). Nekoliko sati nakon uzimanja krvnog obroka, prva prepreka sa kojom se parazit susreće u srednjem crevu pešĉane mušice su digestivni enzimi, ĉije delovanje mora savladati (Pruzinova i sar., 2015).

Nakon dva do tri dana, umnoŹavanje parazita se usporava, i dolazi do njihove diferencijacije u izduŹene i vrlo pokretljive nektomonad promastigote. Ove specifiĉne morfološke karakteristike omogućavaju da se nektomonad promastigoti uspešno evakušu i pričvrste za resice srednjeg creva, nakon perforacije peritrofiĉne membrane od strane enzima pešĉane mušice. Na ovaj naĉin je nektomonad promastigotima omogućen opstanak u srednjem crevu, te spreĉeno da budu izbaĉeni sa ostacima svarenog krvnog obroka.

U periodu od ĉetvrtog do sedmog dana nektomonad promastigoti se transformišu u leptomonad promastigote, koje se brzo dele i migriraju ka prednjem delu srednjeg creva (Dostálová i Volf, 2012). Leptomonadi se ili veŹu na hitinski sloj stomodealnog zaliska i diferenciraju u haptomonade, ili se transformišu u metacikliĉke promastigote, infektivni oblik koji je prilagoĊen za prenos na sledećeg domaćina sisara (Sadlova i sar., 2017). Metacikliĉki promastigoti su relativno malih dimenzija, ali vrlo pokretljivi zahvaljujući prisustvu relativno dugih flagela. Paraziti pričvršćeni na stomodealni zalistak oštećuju hitinsku sluznicu i epitelne ćelije zaliska, ometajući njegovu funkciju i olakšavajući refluks parazita iz srednjeg creva, a samim tim i nove koliĉine leptomonada spremnih za transformaciju u metacikliĉke promastigote. Na ovaj naĉin ostvareni su svi preduslovi za uspešan prenos infekcije (Dostálová i Volf, 2012).

Sa tako sloŹenim životnim ciklusom, paraziti moraju savladati nekoliko nepovoljnih prepreka pre nego što uspešno završe svoj razvoj u mušici. Prirodne prepreke ukljuĉuju proteolitiĉke enzime koje luĉe pešĉane mušice, peritrofiĉnu membranu koja okruŹuje krvni obrok i imuni odgovor pešĉane mušice (Dostálová i Volf, 2012).



Slika 5. Šematski prikaz razvoja lajšmanije u digestivnom traktu peščane mušice. Oznake: a-amastigoti; b-prociklični promastigoti; c-nektomonad promastigoti; d- leptomonad promastigoti; e-metaciklični promastigoti; f-haptomonad promastigoti (prevedeno iz Dostálová i Volf, 2012).

2.5. Rezervoari *Leishmania* spp

Po definiciji, rezervoar predstavlja jednu ili više vrsta koje omogućavaju održavanje parazita u prirodi, pri čemu svaka vrsta ima posebnu ulogu u prenosu u određenom vremenu i prostoru. Rod *Leishmania* je primer u kojem se parazit održava u nekoliko vrsta sisara (Roque i Jansen, 2014).

Da bi neka zaražena životinja bila domaćin i rezervoar, tj. da bude odgovorna za prenos parazita na ljude i druge životinje neophodno je da bude izvor krvnih obroka za vektora peščanu mušicu. Identifikacija novih vrsta kao potencijalnih domaćina i rezervoara može biti veoma izazovna budući da zahteva kompleksan ksenodijagnostički pristup. (Quinnell i Courtenay, 2009; Molina i sar., 2012). Sposobnost domaćina da prenose parazit menja se tokom infekcije, tako da jedna vrsta tokom života može imati različite uloge u epizootiologiji parazita. Razlikujemo „domaćine održavanja“ koji mogu biti zaraženi i održavati infekciju, i „domaćine prenosnike“ koji uz održavanje infekcije pokazuju i karakteristike koje pogoduju prenosu (Roque i Jansen, 2014).

U regionu Mediteranskog basena, pas zauzima posebno značajno mesto kao rezervoar pre svega vrste *Leishmania infantum*, čiji je vektor peščana mušica. Ljudi se zaraze kada žive na istom prostoru sa rezervoarima i vektorima (Ayele i Seyoum, 2016). Lajšmanije mogu zaraziti čoveka, guštere, glodare i mesojede, a pogođeni su prvenstveno psi i domaće životinje koje borave na otvorenom (Ayele i Seyoum, 2016). Sekundarnim domaćinom mogu se smatrati i domaće mačke, kao i crni pacovi, kod kojih je ksenodijagnostikom potvrđena sposobnost prenošenja infekcije (Antoniou i sar., 2013).

Mnogi stanovnici u svojim dvorištima u kojima se nalaze psi, koji predstavljaju rezervoare za *Leishmania infantum*, uzgajaju i stoku. Budući da su svi faktori koji utiču

na prenos parazita skoncentrisani na malom prostoru i domaće životinje mogu biti potencijalni rezervoari u prenosu lajšmanije (Alexander i sar., 2002).

U Evropskim zemljama lajšmaniozu izaziva *L. infantum*, koja je potvrđena i kod kopitara (Leonel i sar., 2021). Kožne lezije kod konja prijavljene su u Nemačkoj, Španiji i Portugalu (Reuss, 2013). Prva infekcija sa *L. infantum* kod konja u Južnoj Americi zabeležena je u Brazilu, kod dve životinje sa kožnim lezijama i lokomotornim problemima (Leonel i sar., 2021). Ispitivanjem goveda u endemskom području Bangladeša, potvrđeno je prisustvo antitela protiv *Leishmania* parazita i u isto vreme odsustvo DNK *Leishmania*, što ukazuje da goveda ne igraju ulogu domaćina rezervoara (Alan i sar., 2011). Uporednim ispitivanjem lajšmanioze kod ljudi, koza, krava i bivola u Nepal, na području u kojem je prisutna visceralna lajšmanioza, potvrđena je infekcija kod 6,1% ljudi, 5% krava, 4% bivola i 16% koza. Iako je analizom utvrđeno da prisustvo *Leishmania* vrsta, prvenstveno kod koza, može biti faktor rizika za infekciju ljudi, ne znači nužno da ove životinje predstavljaju domaćina rezervoara (Bhattarai i sar., 2010).

Novija istraživanja u endemskim žarištima lajšmanioze pokazala su da potencijalni rezervari ove zoonoze mogu biti i druge vrste životinja kao što su zečevi, torbari divlji kanidi, šišmiši, primati i drugi sisari (Medkour i sar., 2019).

2.6. Odgovor ćelija domaćina na infekciju *Leishmania* spp

Životni ciklus lajšmanije kod sisara počinje kada inficirana ženka peščane mušice unese metaciklične promastigote u domaćina tokom sisanja krvi (Liu i Uzonna, 2012). Da bi parazit opstao, mora da savlada odbrambene mehanizme organizma domaćina i spreči aktivaciju imunskog odgovora (Olivier i sar., 2005).

Iako paraziti inficiraju različite vrste ćelija domaćina, makrofagi i dendritične ćelije su najvažnije ćelije koje regulišu ishod infekcije. S obzirom na činjenicu da je patologija bolesti vrlo promenljiva, u zavisnosti od vrste lajšmanije, vrlo je teško generalizovati specifične mehanizme modulacije na svim sojevima i svim domaćinima. To je važno jer je u većini studija u kojima je istražena uloga dendritičnih ćelija i makrofaga tokom infekcije, do infekcije došlo jednom vrstom parazita u jednom domaćinu, što sprečava komparaciju više vrsta i sojeva.

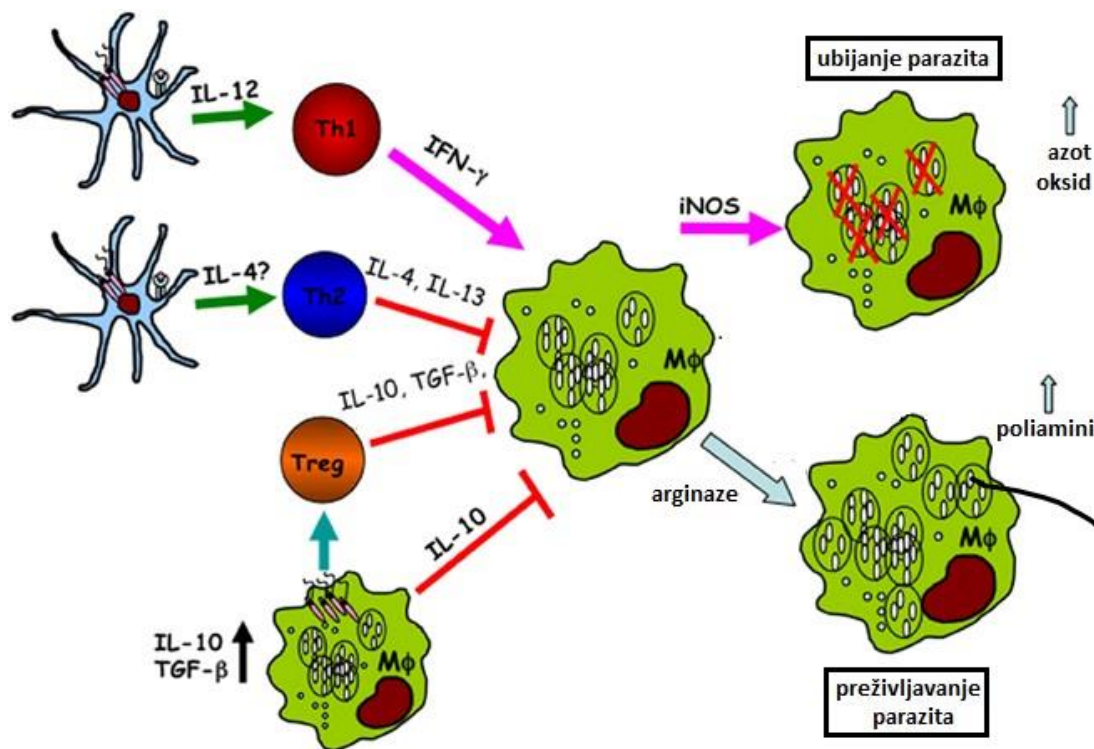
Ipak, lajšmanioza predstavlja odličan primer polarizacije imunskog odgovora kao zaštitnog ili štetnog, i to u zavisnosti od imunskog sistema individue (Sacks i Noben-Trauth, 2002). Kod miševa je jasno pokazano da je polarizacija imunskog odgovora koji razvijaju rezistentni sojevi miševa povezana sa aktivacijom Th1 limfocita i porastom IgG2a i IgE antitela, dok je kod osetljivih sojeva prisutna aktivacija Th2 limfocita i porast IgG1, IgA i IgE antitela (Sacks i Noben-Trauth, 2002). Kod pasa je polarizacija imunskog odgovora ispitivana kod asimptomatskih i klinički obolelih pasa, ali još uvek nije u potpunosti razjašnjena koja podklasa antitela je povezana sa napredovanjem bolesti.

Nakon infekcije, makrofagi i dendritične ćelije fagocituju lajšmanije, što dovodi do različitih ishoda. Aktivacija makrofaga je podeljena na dva funkcionalno različita spektra:

klasičnu i alternativnu aktivaciju (Slika 6). Inficirane dendritične ćelije proizvode IL-12, što je kritično za razvoj CD4⁺ Th1 ćelija, koje proizvode IFN- γ . IFN- γ deluje na zaražene makrofage što dovodi do njihove aktivacije (klasična aktivacija), povećanja aktivnosti inducibilne azot oksid sintaze, te proizvodnje azot oksida i drugih slobodnih radikala važnih za intracelularno ubijanje parazita. Nasuprot tome, proizvodnja IL-4 podržava razvoj CD4⁺ Th2. Th2 ćelije proizvode IL-4 i IL-13, što dovodi do alternativne aktivacije makrofaga i proizvodnje poliamina koji pogoduju proliferaciji unutarćelijskog parazita.

Prirodno prisutne regulatorne T ćelije (T_{reg}) i zaraženi makrofagi takođe proizvode imunoregulatorne citokine, uključujući IL-10 i TGF- β , koji dodatno deaktiviraju inficirane ćelije, što dovodi do smanjenog ubijanja parazita (Liu i Uzonna, 2012). Kritična ravnoteža između Th1 (ili proinflamatornog odgovora domaćina) i Th2 (ili antinflamatornog odgovora), određuje ishod bolesti kod lajšmanijoze. Ovaj ishod diktiraju relativni nivoi IL-12 i IL-10 koji su proizvedeni klasičnom i alternativnom aktivacijom makrofaga. Prethodne studije su takođe pokazale da makrofagi mogu sami regulisati imunološke ishode putem usmeravanja odgovora T limfocita. Na primer, infekcija makrofaga sa virulentnim agensom indukuje odgovor Th2, koji favorizuje parazit, umesto Th1 odgovora koji odgovara domaćinu (Gannavaram i sar., 2016).

Kod pasa sa očuvanim imunološkim odgovorom može se očekivati dobra prognoza jer se njihov imunološki odgovor bazira na stimulaciji Th1 limfocita i produkciji citokina. Ovi pacijenti ostaju klinički zdravi ili sa blagim simptomima i niskim nivoom antitela. Kod njih se infekcija lajšmanijom ograničava na diseminaciju parazita u limfne čvorove. Ponekad takvo stanje prođe bez lečenja. Pacijenti sa slabim ćelijskim, a jakim humoralnim odgovorom koji je baziran na stimulaciji Th2 limfocita, najčešće imaju lošu prognozu zato što postoji tendencija diseminacije po čitavom organizmu. Kod njih se razvija nespecifična poliklonska aktivacija B-limfocita i poliklonska hiper-gamaglobulinemija. Ovakav prenaplašen humoralni imunološki odgovor dovodi do pokretanja hipersenzitivnih mehanizama koji oponašaju kliničke znake multisistemskih autoimunih bolesti, dovode do nastanka uveitisa, glomerulonefritisa, poliartritisa, vaskulitisa, ulkusa po koži, imunski posredovane hemolitičke anemije, trombocitopenije, splenomegalije, limfadenomegalije itd. (Miletić i sar., 2017).



Slika 6. Povezanost dendritičnih ćelija odnosno makrofaga i ishoda infekcije sa *Leishmania* spp. (prerađeno iz Liu i Uzonna, 2012)

Najvažniji mehanizam uništavanja lajšmanija u makrofagima je stvaranje slobodnih kiseonikovih i azotnih radikala koje je stimulirano Th1 citokinima. Ukoliko se razvija Th2 odgovor, u nedostatku dovoljne stimulacije makrofaga, lajšmanije uz pomoć sopstvene metaloproteinaze gp63, inhibišu enzime odgovorne za nastanak oksidativnog stresa i uspešno izazivaju sistemsku infekciju (Olivier i sar., 2012).

Neosporno je da psi podložni oboljevanju od visceralne lajšmanioze pokazuju jak poliklonalni B-ćelijski odgovor, ali se još uvek pouzdano ne zna koja je IgG supklasa povezana sa rezistencijom odnosno sklonošću za oboljevanje od lajšmanijaze (Gonçalves i sar., 2019). Takođe, Th2 odgovor je povezan sa jačim humoralnim imunskim odgovorom, vaskulitisom i težom kliničkom slikom (Gizzarelli i sar., 2020).

2.7. Lajšmanioza kod ljudi

Lajšmanioza obuhvata čitav spektar poremećaja i oboljenja izazvanih protozom *Leishmania* spp., koju na ljude prenose zaražene peščane mušice iz porodice *Psychodidae* (Ramírez i sar., 2016). Preko dvadeset vrsta *Leishmania* može izazvati infekciju ljudi (Foulet i sar., 2007). Bolest je od izuzetnog značaja za javno zdravlje – široko je rasprostranjena, zaraženo je više od 12 miliona ljudi širom sveta, svake godine registruje se 2 miliona novih slučajeva, a 350 miliona ljudi izloženo je riziku (Alvar i sar., 2008). Od 200 zemalja koje su 2020. godine Svetskoj zdravstvenoj organizaciji prijavile prisustvo lajšmanioze, 98 zemalja su endemične (WHO 4).

Bolest se povezuje sa neuhranjenošću, lošim uslovima života, raseljavanjem stanovništva, i nedostatkom resursa što se odražava na slabljenje imuniteta, a pogođeni su uglavnom siromašni ljudi Afrike, Azije i Latinske Amerike (WHO 1). Globalne klimatske promene takođe utiču na širenje bolesti. Promena temperature i vlažnosti vazduha imaju direktan uticaj na vektora i pogoduju njegovoj distribuciji u neendemična područja (WHO 2). U poslednjih nekoliko decenija povećanje broja obolelih primećeno je kod turista i poslovnih ljudi koji učestvuju u međunarodnom saobraćaju. Zabeleženo je pritom prisustvo bolesti i kod ljudi koji nikada nisu putovali u endemska područja, što se, između ostalog, dovodi u vezu sa međunarodnom razmenom krvnih proizvoda (Steverding, 2017).

Svetska zdravstvena organizacija navodi da se lajšmanioza ubraja u sedam najvažnijih tropskih bolesti, predstavlja ozbiljan zdravstveni problem širom sveta, a ogleda se u velikom spektru kliničkih manifestacija od kojih mnoge rezultiraju smrtnim ishodom. U zavisnosti od vrste lajšmanije i imunskog odgovora domaćina, mogu se razviti različiti simptomi bolesti. Tako se prema kliničkim manifestacijama bolest može opisati kao: kožna, koja može biti lokalizovana i diseminovana, visceralna ili kala-azar, i mukokutana (Torres-Guerrero, 2017). Iako se radi o različitim kliničkim manifestacijama, kod svih oblika zajedničko je da počinju sličnim promenama na koži domaćina (Scorza i sar., 2017).

Kožna ili kutana lajšmanioza je najčešći oblik ove bolesti. Procenjuje se da se u svetu na godišnjem nivou zabeleži između 600.000 i milion novih slučajeva. Gotovo 95% slučajeva kožne lajšmanioze zabeleženo je u Americi, mediteranskim zemljama, Bliskom istoku i srednjoj Aziji (WHO 2). Kod kožne lajšmanioze, protozoe inficiraju makrofage koji se nalaze u koži domaćina, a kada se jedna ćelija „napuni“ parazitima, dolazi do pucanja i oslobođeni amastigoti dovode do zaraze susednih makrofaga (Steverding, 2017). Kožne lezije se razvijaju polako tokom nekoliko sedmica ili meseci, ponekad čak i nakon nekoliko godina. Ovaj oblik lajšmanioze se karakteriše čirevima koji osim što ostavljaju doživotne ožiljke mogu dovesti i do invaliditeta (WHO 2). Promene na koži se u početku manifestuju u obliku papula i nodula, da bi kasnije nastale ulcerozne lezije koje mogu trajati mesecima i godinama. Iako je bolest bezbolna, ulcerozne lezije koje se nađu u blizini zgloba ili se zaraze bakterijama mogu postati bolne (CDC). Od slučajeva prijavljenih Svetskoj zdravstvenoj organizaciji tokom 2018. godine (WHO 2), čak 85% je registrovano u samo 10 zemalja Azije (Avganistan, Iran, Irak, Pakistan, i Sirija), severne Afrike (Tunis i Alžiru) i Južne Amerike (Bolivija, Brazila i Kolumbija).

Za razliku od kutane lajšmanioze, kod visceralne lajšmanioze razvija se najteži oblik bolesti (Steverding, 2017). Iako se procenjuje da se u svetu godišnje javi između 50.000 i 90.000 novih slučajeva, Svetskoj zdravstvenoj organizaciji se prijavljuje samo između 25 i 45%, pri čemu je najveći broj zabeležen u istočnoj Africi, Indiji i Brazilu (WHO 2). Bolest će se razviti u visceralni oblik kada se oslobođeni amastigoti šire krvotokom i inficiraju ćelije retikuloendotelnog sistema jetre, slezine, koštane srži, limfnih čvorova i creva (Steverding, 2017). Razdoblje infekcije kreće se od nekoliko nedelja do nekoliko

meseci. Teški slučajevi visceralne lajšmanioze, ukoliko se ne leče, dovode do smrtnog ishoda, bilo direktno bilo indirektno, zbog komplikacija usled bakterijskih infekcija ili krvarenja. Kada se radi o teškim, uznapredovalim slučajevima, visceralna lajšmanioza često se naziva kala-azar, što na hindu jeziku znači crna groznica (CDC). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije za 2018. godinu više od 95% novozabeleženih slučajeva visceralne lajšmanioze su se pojavile u 10 zemalja. Polovina su bile afričke (Somalija, Etiopija, Kenija, Sudan i Južni Sudan), četiri azijske (Indija, Nepal, Kina i Irak), a slučajevi su se pojavljivali i u Brazilu (WHO 2).

Mukokutana lajšmanioza se retko javlja, svega od 1 do 10%, a kada se javi to je obično nakon već prisutne kutane lajšmanioze (Zijlstra, 2014). Kada je početna lezija kože zacelila, bolest počinje da se širi na sluznice usta, nosa i grla nakon čega dolazi do uništavanja septuma usana, nepca i nosa (Steverding, 2017). U preko 90% slučajeva javlja se u Južnoj Americi (Bolivija, Brazil, Peru) te u Etiopiji (WHO 2).

2.8. Lajšmanioza kod pasa

Pseća lajšmanioza je hronična zoonoza, koja se uglavnom prenosi između životinje i čoveka posredstvom ženke peščane mušice. U evropskim područjima je kao glavni uzročnik lajšmanioze kod pasa, identifikovana *Leishmania infantum*, a bolest potencijalno može biti kobna, kako za pse tako i za ljude (Ribeiro i sar., 2018).

U endemskim regijama pas se smatra glavnim rezervoarom ove zoonotske bolesti, a glavni prenos parazita na pse i ljude je ubod ženke peščane mušice, koja tokom krvnog obroka proguta parazita da bi ga prenela u sledećem krvnom obroku (Naucke i sar., 2012).

Poseban epidemiološki značaj širenja i održavanja bolesti imaju i tzv. netradicionalni načini prenosa u slučajevima kada izostane biološki vektor (Ribeiro i sar., 2018). Na primer, potvrđeno je da se infekcija može preneti polnim putem, transplacentarno i putem krvi. Polni prenos je pokazan prilikom parenja prirodno inficiranih mužjaka koji imaju lezije na genitalnim organima (Naucke i sar., 2012). Do transplacentarnog prenosa dolazilo je kod simptomatskih ili asimptomatskih prirodno zaraženih ženki, kada su paraziti iz krvotoka majke preko placente prelazili u krvotok fetusa odn. živorođene ili mrtvorodene štenadi (Naucke i sar., 2012; Ribeiro i sar., 2018). Transfuzija predstavlja veliki rizik zbog toga što životinje davaoci najčešće ne pokazuju kliničke znake bolesti, iako je parazit prisutan u krvi životinje, te zbog dugog vremena inkubacije (Freitas i sar., 2006). Razmatraju se i drugi načini prenosa kao što su transplantacijom organa, kontaminiranim iglama, te direktnim prenosom sa psa na psa, ranama ili ugrizima (Ribeiro i sar., 2018). Ova saznanja posebno su važna za neendemske zemlje u kojima nema poznatih bioloških vektora, a u kojima se povećava broj zaraženih pasa (Naucke i sar., 2012).

2.9. Epidemiologija i epizootologija lajšmanioze

Lajšmanioza pasa koju uzrokuje parazit *Leishmania infantum*, predstavlja opasnu, potencijalno fatalnu zoonozu u regijama Evrope, Afrike, Azije i Amerike (Baneth i sar., 2008). Slučajevi pseće lajšmanioze zabeleženi su u 50 od 88 zemalja, u kojima je ljudska lajšmanioza endemska (Morales-Yuste i sar., 2012). Glavni rezervoar infekcije kod ljudi je pas, a peščana mušica je biološki vektor ove protozoarne bolesti (Baneth i sar., 2008). Na širenje lajšmanioze širom sveta utiču specifični ekološki i klimatski faktori koji pogoduju rastu i razvoju vektora (Alonso i sar., 2010). Procenjuje se da je najmanje 2,5 miliona pasa zaraženo u jugoistočnoj Evropi, dok se u Južnoj Americi broj zaraženih pasa procenjuje na milion (Bourdeau i sar., 2014, Baneth i sar., 2008).

Iako se smatralo da je pseća lajšmanioza ograničena uglavnom na mediteransku regiju (Kaszak i sar., 2015), primećeno je da se bolest širi ka severu Evrope (Bourdeau i sar., 2014). Nedavno su zabeleženi brojni slučajevi lajšmanioze pasa i u severnim zemljama, poput Nemačke, Holandije, Ujedinjenog Kraljevstva i Poljske (Kaszak i sar., 2015). Širenje bolesti na sever Evrope prvenstveno se povezuje sa boravkom pasa i njihovih vlasnika u endemskim područjima tokom turističke sezone (Grimm i sar., 1993). Takođe, širenje se pripisuje i klimatskim promenama i globalizaciji (Bourdeau i sar., 2014).

Klinički slučajevi lajšmanioze ljudi i pasa u Srbiji se uglavnom objašnjavaju boravkom u nekom od endemskih područja u neposrednom okruženju. Njima se smatraju primorska područja Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije, zatim Severna Makedonija koja nema izlaz na more ali se graniči sa zemljama koje imaju status endemičnih. Anamnestički pokazatelji govore da je do najvećeg broja infekcija došlo tokom boravka u Crnoj Gori i Severnoj Makedoniji (Marčić i sar., 2020).

2.9.1. Lajšmanioza u Crnoj Gori

Deo teritorije Crne Gore, a posebno primorje i basen Skadarskog jezera, odlikuje mediteranska klima sa blagim i kišovitim zimama, te dugim i toplim letima koji pogoduje rastu i razvoju peščane mušice, što predstavlja značajan preduslov za razvoj lajšmanioze (Pavićević i sar., 2014). Tokom četvorogodišnjeg istraživanja na prostoru opštine Bar potvrđeno je prisustvo pet vrsta flebotomina sa dominantnom vrstom *Phlebotomus neglectus* (60% svih prikupljenih peščanih mušica), zatim *P. tobbi* (16%), *Sergellomyia minuta* (12%), *P. papatasi* (11%) i, na kraju, jedan posto *P. perfiliewi* (Ivović i sar., 2003).

Povećana gustina vektora, poremećaji ekosistema, kao i rezervoari infekcije dovode do širenja endemskih žarišta i infekcije. Crna Gora se ubraja u endemske zemlje viscelarne lajšmanioze, a od 2005. godine godišnje se registruje od 1–3 slučaja oboljevanja ljudi (Andrić i sar., 2012). U periodu od 1992. do 2013. godine, od lajšmanioze obolelo je 66 osoba (40 muškaraca i 26 žena), od čega je kod 65 (98%) bolesnika dijagnostikovano visceralni oblik bolesti, dok je jedan pacijent imao kožnu lajšmaniozu. Najveći broj obolelih bio je iz primorskog regiona Crne Gore – Bara i Ulcinja (Medenica i sar., 2015).

Serološko ispitivanje pasa na antigene *Leishmania infantum* na prostoru Crne Gore vršeno je u periodu od 2006. do 2010. godine, i to metodom indirektno imunofluorescencije (IFAT) i direktnim aglutinacionim testom (DAT). Pregledana su 433 uzorka seruma pasa sa kliničkim znacima, 68 uzoraka asimptomatskih pasa u dobroj kondiciji, od kojih su 43 službeni psi vojske i policije, i uzorci 23 psa iz azila. Pozitivan nalaz potvrđen je kod 258 uzoraka simptomatskih pasa (59,58%) i kod 5,9% asimptomatskih pasa. Od ukupnog broja pozitivnih uzoraka, 72% je sa teritorija jugoistočnih opština (Bar, Ulcinj) i Podgorice (Pavićević i sar., 2014).

2.9.2. Lajšmanioza u Srbiji

Pojava lajšmanioze u Srbiji zabeležena je nakon drugog svetskog rata kada je poprimila epidemijski karakter. Prvi slučaj zabeležen je 1945. godine, a nakon poslednje velike epidemije 1953. godine broj novih slučajeva počeo se smanjivati. Nakon pojave prvih slučajeva pokrenuto je i istraživanje peščane mušice 1947. godine. Tada je zabeleženo prisustvo sedam vrsta flebotomina: *Phlebotomus papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. simici*, *P. sergenti* i *P. balcanicus* (Vaselek i sar., 2017). Novije epidemiološko istraživanje visceralne lajšmanioze u Srbiji sprovedeno je u periodu od 2001. do 2007. godine i obuhvatilo 134 osobe sumnjive na lajšmaniozu. Mikroskopskim pregledom preparata koštane srži potvrđena su 22 slučaja. Većina obolelih osoba boravila je na odmoru na crnogorskom primorju (Dakić i sar., 2009).

U Srbiji je u periodu od 2009. do 2013. godine rađeno istraživanje prisustva različitih bolesti kod 734 pasa. Serološkim ispitivanjem prisustva specifičnih antitela protiv *Leishmania* spp. pregledano je 220 uzoraka krvi pasa, pri čemu je kod 33 rezultat bio pozitivan (Savić i sar., 2014). Kako osim domaćih pasa i divljač može imati presudnu ulogu u održavanju i širenju lajšmanioze, urađeno je i istraživanje lajšmanioze kod zlatnog šakala. U periodu od 2010. do 2013. godine prikupljeni su uzorci sa 12 lokaliteta širom Srbije, pri čemu je slezina izabrana kao tkivo za otkrivanje patogena. Korišćenjem molekularne metode testirano je ukupno 216 uzoraka slezine, od kojih je 15 (6,9%) bilo pozitivno (Ćirović i sar., 2014).

2.9.3. Lajšmanioza u Hrvatskoj

Prisustvo lajšmanioze kod ljudi i pasa u središnjem i južnom delu hrvatskog primorja dokumentovana je još početkom 20. veka (Mulić i sar., 2009). Dalmacija se smatra jedinom endemskom regijom u Hrvatskoj, a sporadični slučajevi oboljevanja u ostalim regijama povezani su sa boravkom u južnom primorju (Bosnić i sar., 2006). U trogodišnjem entomološkom istraživanju (2002–2004) na 10 lokaliteta u Dalmaciji identifikovano je pet vrsta peščanih mušica: *Phlebotomus tobbi*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. mascittii* i *Sergentomyia minuta* (Bosnić i sar., 2006).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravlje, u periodu od 1954. do 2006. godine, zabeleženo je ukupno 124 slučaja visceralne i kožne lajšmanijaze (Mulić i sar., 2009). Između 2007. i 2009. godine, serološkim ispitivanjem na prisustvo specifičnih IgG antitela na *Leishmania infantum* obuhvaćeno je 2035 osoba i dokazano da je 231 osoba

bila seropozitivna. Istraživanjem je utvrđeno da je seropozitivnost bila znatno veća kod stanovnika obalnih područja i ostrva, za razliku od stanovnika iz kopnenog dela, a najosetljivija grupa bila su deca do 9 godina starosti (Šiško-Kraljević i sar., 2013).

Lajšmanioza pasa u Hrvatskoj prvi put je prepoznata kao problem u južnim primorskim delovima, u području između Trogira, granice Crne Gore, granice Bosne i Hercegovine i Jadranskog mora na jugu, kao i na srednjim i južnim dalmatinskim ostrvima (Živičnjak i sar., 2005). U Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, od 1997. godine prisustvo infestacije dokazano je parazitološkim i serološkim metodama na uzorku od više stotina pasa (Živičnjak i sar., 2005). Tokom januara i februara 2003. godine, sprovedeno je istraživanje u središnjem delu Splitsko-dalmatinske županije, a obuhvatilo je 68 pasa iz grada Splita i 238 pasa koji žive u 12 naselja u zaleđu grada. Od ukupno 306 analiziranih uzoraka, u 46 je dokazano prisustvo antitela. Istraživanje je pokazalo da sa starošću pasa raste šansa da dođe do serokonverzije (Živičnjak i sar., 2005).

2.9.4. Lajšmanioza u Bosni i Hercegovini

U Bosni i Hercegovini nema mnogo podataka o ovoj bolesti, a prvi slučajevi zabeleženi su 1949. i 1954. godine (Colella i sar., 2019). Priručnik Svetske zdravstvene organizacije za upravljanje i nadzor lajšmanioze u Evropi iz 2017. godine navodi da je sporadična pojava visceralne lajšmanioze prisutna u južnoj i jugoistočnoj Hercegovini (WHO 5, 2017). Istraživanjem koje je sprovedeno u periodu između 2014. i 2016. godine, a obuhvatilo je prostor Balkana, u Bosni i Hercegovini identifikovano je 6 vrsta papatača među kojima je najrasprostranjeniji *Phlebotomus neglectus*, sa udelom od 89,78% (Dvorak i sar., 2021).

Na području Tuzle, 2013. godine ispitana su 134 psa na različite vrste parazita. Pozitivno je bilo 58 (43,28%), a između 9 vrsta parazita lajšmanioza je potvrđena kod 2,24% pasa (Omeragić i sar., 2015). Procena izloženosti infekciji kod kućnih ljubimaca u Bosni i Hercegovini bila je zadatak istraživanja sprovedenog 2017. godine, koje je obuhvatilo 408 pasa i pet mačaka. Svi uzorci su testirani kvantitativnim molekularnim metodama, pri čemu su pozitivni rezultati dobijeni kod 3,1%. Serološkim testiranjima na uzorcima 180 pasa pokazano je 16,7% pozitivnih (Colella i sar. 2019).

2.9.5. Lajšmanioza u Severnoj Makedoniji

Regionalna kancelarija Svetske zdravstvene organizacije za Evropu, u Priručniku za upravljanje i nadzor lajšmanioze iz 2017. godine, svrstava Republiku Severnu Makedoniju u zemlje endemske za visceralnu lajšmaniozu. Epidemiološka razmatranja naglašavaju da više od polovine slučajeva dolazi iz središnjeg regiona zemlje, dok je koinfekcija lajšmanioze sa HIV-om retka (WHO 6, 2017). U epizootološke svrhe sprovedena je 2015. godine serološka studija na ukupno 1134 uzorka seruma pasa. Prisustvo antitela potvrđeno je kod 70 pasa (6,1%), dok je 15 uzoraka proglašeno "granično pozitivnim". Iste godine u Severnoj Makedoniji zabeleženo je i 12 slučajeva lajšmanioze kod ljudi (Stefanovska i sar., 2016). Iako Severna Makedonija ne izlazi na

more, graniči se sa nekim mediteranskim zemljama endemičnim za lajšmaniozu. U istraživanju peščane mušice na prostoru Balkana, između 2014. i 2016. godine, identifikovano je čak 10 vrsta flebotomina, među kojima se po prvi put našla i *Phlebotomus alexandri* (Dvorak i sar., 2021).

2.9.6. Lajšmanioza u Albaniji

Prvi slučaj zoonotske visceralne lajšmanioze u Albaniji zabeležen je 1938. godine. Albanija pripada mediteranskim zemljama endemskim za visceralnu lajšmaniozu i jedna je od najviše pogođenih. Za razliku od drugih zemalja, bolest se uglavnom javlja u dečjem uzrastu (Velo i sar., 2003). Analiza anamnestičkih podataka 1210 dece starosti do 14 godina, kojima je između 1995. i 2009. godine u Univerzitetskoj bolnici u Tirani dijagnostikovana lajšmanioza, pokazala je da je većina obolele dece (61%) pripadala dobnoj grupi od jedne do četiri godine (Petrela i sar., 2010).

Prema podacima WHO, u periodu između 1998. i 2016. godine prijavljen je 1631 slučaj visceralne lajšmanioze i 124 slučaja kutane lajšmanioze (WHO 7, 2017). Slučajevi visceralne lajšmanioze uglavnom se javljaju u urbanim naseljima, a prema podacima Instituta za javno zdravlje u Tirani u periodu od 1995. do 2014. godine oko 80% slučajeva bilo je iz rubnih područja Skadra i Lješa na severu, Tirane u središtu i Lušnja, Fjer, Berat i Vlora na jugu. Kožna lajšmanioza više je zabeležena iz okruga Lušnja, Elbasan, Kruje, Tirana i Berat (Velo i sar., 2017).

Lajšmanioza pasa prvi put je zabeležena 1977. godine, a prvi parazit izolovan je 1989. godine (Velo i sar., 2003). Generalno posmatrano, saznanja o epidemiologiji parazitskih infekcija životinja veoma su ograničena. U periodu od marta 2010. godine do aprila 2011. godine sprovedeno je ispitivanje u četiri klinike za male životinje u Tirani, kada su analizirana 602 psa na različite patogene. Otkriveno je 8 patogena, među kojima i *Leishmania infantum* sa prevalencijom od 5,1% (Hamel i sar., 2016). Glavni vektor lajšmanioze ljudi i pasa u Albaniji je *Phlebotomus neglectus* (Velo i sar., 2017).

2.10. Klinička slika lajšmanioze pasa

Klinička slika lajšmanioze razlikuje se u zavisnosti od razvoja bolesti, zahvaćenosti različitih organa, kao i od imunog odgovora domaćina (Baneth i sar., 2008). Kod nekih pasa dugi niz godina neće doći do pojave kliničkih znakova, ponekad može doći i do spontanog izlečenja, dok će kod drugih doći do progresivnog toka bolesti i smrtnog ishoda (Ribeiro i sar., 2018).

Većina zaraženih pasa su asimptomatski nosioci bolesti, a period inkubacije može trajati od 3 meseca do 7 godina pre prve pojave kliničkih znakova (Miró i sar., 2008). Nekoliko faktora utiče na razvoj bolesti, među kojima su rasa, uzrast i genetska predispozicija. Primećeno je da rase poput rotvajlera, nemačkog ovčara, boksera i koker španijela imaju veću predispoziciju u odnosu na goniča sa Ibice. Sklonost ka razvoju bolesti imaju psi mlađi od 3 i stariji od 8 godina (Solano-Gallego i sar., 2011).

Budući da je pseća lajšmanioza sistemska bolest, te može obuhvatiti bilo koji organ, tkivo ili telesnu tečnost, klinički znaci su često nespecifični (Naucke i sar., 2016). Znaci koji najčešće upućuju na lajšmaniozu pasa su: gubitak telesne mase, kožne i očne lezije, alopecija, anoreksija, krvarenje iz nosa, limfadenopatija, lokomotorni problemi i mišićna atrofija, koja je posebno izražena na glavi pa psi često izgledaju starije nego što jesu. Prepoznatljiv znak bolesti je i preterani rast noktiju, te hiperkeratoza jastučića šapa. Bolest najviše inficira slezinu, jetru i koštanu srž, dok su hronična upala creva i hronična bubrežna bolest najčešći indirektni uzrok smrti (Ayele i sar., 2016).

Dermatološki poremećaji prisutni su kod 80–90% pasa, limfadenomegalija u 62–90%, očna bolest u 16–81%, splenomegalija u 10–53% i abnormalan rast noktiju (onihogrifoza) u 20–31% obolelih (Petersen, 2020). Drugi klinički znaci poput lezija sluznice usne šupljine, jezika i genitalnih organa, osteolitičkih i osteoproliferativnih lezija kostiju, oticanja zglobova sa erozivnim i neerozivnim poliartritisom, hroničnog hepatitisa, hroničnog recidivirajućeg kolitisa, neurološke bolesti zbog meningitisa i atrofičnog miozitisa ili polimiozitisa mišića masetera, autoimunih poremećaja i kardiovaskularnih poremećaja kao što su perikarditis, sistemski vaskulitis, tromboembolija i sindrom hiperviskoznosti seruma su nešto ređe zabeleženi (Solano-Gallego i sar, 2009).

LeishVet grupa veterinarskih istraživača iz evromediteranskog regiona, osnovana tokom Trećeg Svetskog *Leishforum*-a 2005. godine u cilju boljeg razumevanja lajšmanioze kod pasa, ustanovila je sledeći sistem klasifikacije bolesti (Solano-Gallego i sar., 2009):

- Faza I tj. blaga bolest – psi sa blagim kliničkim znacima kao što su periferna limfadenomegalija ili papularni dermatitis, serološki nalaz kod ovih pasa je negativan ili pokazuje nizak nivo antitela.
- Faza II tj. umerena bolest – osim znakova navedenih u I fazi, psi mogu ispoljiti difuzne ili simetrične kožne lezije poput ekfolijativnog dermatitisa, onihogrifožu, ulceracije na *planum nasale*, jastučićima šapa, koštane izbočine, čvoriće po sluzokožama, anoreksiju, gubitak težine, groznicu i epistaksu. Nivo antitela se kreće u rasponu od niskog do visokog.
- Faza III ili teška bolest – pored znakova navedenih u I i II fazi, psi mogu imati znakove koji potiču od stvaranja imunih kompleksa, koji dovode do vaskulitisa, artritisa, uveitisa i glomerulonefritisa. Psi u ovoj fazi imaju srednji do visoki nivo antitela.
- Faza IV ili veoma teška bolest – kod pasa sa kliničkim znacima navedenim u fazi IV dolazi do plućne tromboembolije i/ili nefrotskog sindroma u terminalnom stadijumu bubrežne bolesti. Serološka analiza pokazuje srednji ili visok nivo antitela (Solano-Gallego i sar., 2011).

Vaskularne promene privlače posebnu pažnju, prvenstveno kod kutane, ali i kod visceralne lajšmanioze. Postoji više izveštaja o limfocitnom vaskulitisu u koži i sluzokoži visceralnih organa (Ridley i Ridley, 1984; Veress i el Hassan, 1986; Mirejovský i sar.,

1986; Esch, 2013; Handjani i sar., 2017). Mirejovsky i sar. (1986) ukazuju na postojanje fibrinoidnog vaskulitisa kod kutane lajšmanioze, a Veress i el Hassan (1986) na vaskulitis bez tragova fibrinoidne nekroze i tromboze u arterijama i venama kože i sluzokoža. Handjani i sar. (2017) ističu da je prisustvo limfocitnog vaskulitisa odlika hroniciteta i razlog slabijih rezultata u početnoj fazi terapije primenom antimonijata.

U eksperimentalno izazvanoj lajšmaniozi na različitim vrstama životinja potvrđena je proliferacija endotela krvnih sudova i pojava akutnog vaskulitisa sa fibrinoidnom nekrozom (Barygeson i sar., 1970; Meleny, 1925. cit. Handjani i sar., 2017). Handjani i sar. (2017) pritom ukazuju na vaskularnu permeabilnost, vaskulitis i vaskularne tromboze kod velikog broja obolelih osoba sa kutanom lajšmaniozom. U endotelnim ćelijama i perivaskularnim prostorima je potvrđeno prisustvo IgG i IgE, što se dovodi u vezu sa imunim odgovorom na prisustvo parazita, odnosno taloženjem imunih kompleksa (Ridley i Ridley, 1984).

Pojava vaskulitisa kao posledice deponovanja imunskih kompleksa u lajšmaniozi predstavlja osnovu za pretpostavku o disfunkciji endotela (Buckley i sar., 2005; Koutinas i Koutinas, 2014). Povezanost vaskulitisa i nastanka kožnih lezija, epistakse, poremećaja funkcije mišića odnosno meningoencefalomijelitisa (Koutinas i Koutinas, 2014) mogu dodatno ukazivati na značaj ispitivanja disfunkcije endotela kod pasa inficiranih *Leishmania* spp.

Promenjena funkcionalnost endotela je istovremeno i uzrok i posledica mnogih oboljenja (bolesti mozga, srca i krvnih sudova, rast i metastaziranje tumora, hronične bubrežne insuficijencije, virusnih infekcija), što se ogleda u promenama koncentracije odgovarajućih biomarkera u krvi (Goncharov i sar., 2017).

Osim u patogenezi vaskulitisa, imunološki mehanizmi su odgovorni i za teško oštećenje bubrega. Kod pasa sa glomerulonefropatijom utvrđene su promene u tipu membranoproliferativnog glomerulonefritisa tipa 1, sa ekspanzijom mezangijuma i povlačenjem podocita. Navedene lezije su povezane sa nalazom antigena *Leishmania infantum*, IgG antitela na *L. infantum* i u manjoj meri sa proteinom komplementa C3b. Razvoj glomerulonefritisa se definitivno može pripisati taloženju imunih kompleksa u kapilarima glomerula bubrega i aktivaciji komplementa (Esch, 2013).

2.11. Dijagnostika lajšmanioze pasa

Rana dijagnostika bolesti od krucijalnog je značaja za kontrolu ove opasne zoonoze, kako bi se izbeglo dalje prenošenje bolesti, poboljšala prognoza i sprečile nepotrebne eutanizije (Ribeiro i sar., 2018).

Zbog dugotrajnog, hroničnog razvoja bolesti koja uključuje niz sistemskih promena više organa, lajšmaniozu pasa je neophodno razlikovati od mnogih drugih bolesti, kao što su, na primer, različiti oblici anemija, oštećenja jetre i bubrega različite etiologije, demodikozna, kožne neoplazije, dermatofiloza, pioderma i sl., što diferencijalnu dijagnozu čini komplikovanom (Ayele i sar., 2016). Precizna dijagnoza zahteva sveobuhvatan

pristup koji uključuje anamnezu, klinički pregled, informacije o epizootiološkoj situaciji i različite laboratorijske analize (Bourdeau i sar., 2014). Poseban oprez je, naravno, potreban u endemičnim područjima, gde se na lajšmaniozu može posumnjati i u stanjima kada su znaci diskretni ili neprimetni. Povremena preventivna laboratorijska ispitivanja u takvim slučajevima olakšavaju rano otkrivanje infekcije i značajno doprinose efikasnom izlečenju.

Za otkrivanje lajšmanioze kod pasa postoji nekoliko metoda: parazitološke tj. metode otkrivanja prisustva parazita; serološke, odnosno metode određivanja nivoa antitela protiv lajšmanije; molekularne, zasnovane na umnožavanju DNK parazita; te metode ispitivanja ćelijski posredovanog imuniteta, koje se ne primenjuju često u rutinskoj dijagnostici. Bez obzira na princip na kome se zasnivaju, potrebno je napomenuti da veliki broj dijagnostičkih metoda ne pokazuje optimalnu osetljivost i specifičnost (Veras i sar., 2014).

Laboratorijska ispitivanja su veoma važan deo dijagnostike zbog velikog broja asimptomatskih pasa i nepostojanja jasnih kliničkih znakova (Ribeiro i sar., 2018). Hematološki i biohemijski parametri krvi, iako nedovoljno specifični za dijagnostiku lajšmanioze pasa, mogu biti vrlo važni pokazatelji za procenu napretka bolesti i doprineti razumevanju patogeneze (Carvalho Nicolato i sar., 2013). Kliničku sliku može da upotpuni analiza parametara vezanih za hematopoezu, bubrežnu funkciju i nalaz elektroforeze proteina seruma. Humoralni odgovor, koji se razvija tokom infekcije, doprinosi oštećenju organa poput bubrega, kože i očiju, može se relativno jednostavno proceniti na osnovu promena u elektroforetskom profilu proteina plazme (Ribeiro i sar., 2018).

Najčešći biohemijski nalazi kod pasa sa lajšmaniozom su serumska hiperproteinemija sa hiperglobulinemijom i hipoalbuminemijom, koji su često praćeni izraženim smanjenjem albuminsko/globulinskog količnika. Hiperglobulinemija kod pasa iz endemskih regija, bez vidljivih znakova bolesti, trebala bi da bude važna indikacija za ispitivanje asimptomatskog prisustva lajšmanioze. Kada se zna da je bubrežna insuficijencija usled imunski posredovanog glomerulonefritisa jedan od glavnih prirodnih uzroka smrti, potrebno je ispitati prisutvo proteinurije, te odrediti nivo pokazatelja oštećenja bubrega u krvi i urinu, pre svega odnos između sadržaja proteina i kreatinina u urinu (Petersen, 2020). Iako biohemijski nalazi kod zaraženih pasa mogu da pokažu promene u aktivnosti aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze i alkalne fosfataze, vrednosti jetrenih enzima obično su unutar granica referentnih vrednosti.

Jedan od važnijih laboratorijskih nalaza je i anemija, koja može biti uzrokovana krvarenjem, hemolizom, bubrežnom bolešću, hipoplazijom ili aplazijom koštane srži i smanjenjem fluidnosti membrane eritrocita, pri čemu 50 do 70% bolesnih pasa ima normocitnu i neregenerativnu anemiju, što ukazuje na hronične upalne procese i oštećenje eritropoeze zbog infekcije izazvane promenama u koštanoj srži i bubrezima (Ribeiro i sar., 2018).

Dokazivanje parazita se zasniva na mikroskopskoj identifikaciji amastigota na razmazima aspirata slezine, limfnih čvorova i koštane srži. Osetljivost pregleda citološkog razmaza posle tankoinglene biopsije koštane srži je oko 60–80%, limfnog čvora 30–40%, dok se nalaz iz slezine smatra metodom izbora za parazitološku dijagnostiku lajšmanioze pasa (Ribeiro i sar., 2018). Iako je ova metoda veoma specifična i jeftina, identifikacija parazita kod asimptomatskih i pasa sa blagom kliničkom slikom koji imaju nisko parazitsko opterećenje često daje lažno negativne rezultate. Bolju specifičnost pokazuje druga metoda, koja kao pretkorak uključuje kultivaciju parazita, što je od posebne prednosti u smislu izolacije i karakterizacije parazita, kao i određivanje vrste u endemskom području. Ovom metodom parazit se identifikuje uzgojem fragmenata tkiva ili aspirata u *Novy-MacNeal-Nicolle* medijumu (Ayele i sar., 2016). Paraziti izolovani iz različitih tkiva prisutni su u obliku amastigota, a tokom kultivisanja transformišu se u oblik promastigota. Iako kultivisanje nudi veću osetljivost u odnosu na direktno posmatranje amastigota, prisutna su i ograničenja u smislu dugog trajanja ispitivanja, čak 4 nedelje, kao i ograničene dostupnosti specifičnih podloga za izolaciju promastigota, zbog čega je metoda uglavnom ograničena na specijalizovane laboratorije (Veras i sar., 2014).

Infekcija *Leishmania* spp. može se potvrditi i različitim serološkim testovima, kako za potvrdu prisustva antigena, tako i za potvrdu prisustva specifičnih antitela. Kako je pored potvrde infekcije podjednako važan uvid u odgovor organizma na infekciju, kao i uvid u stepen oštećenja pojedinih organa direktno i indirektno izazvanih infekcijom, dijagnostički postupak se u praksi najčešće uključuje i određivanje laboratorijskih pokazatelja lajšmanioze.

2.11.1. Laboratorijski pokazatelji lajšmanioze pasa

Za efikasnu dijagnostiku lajšmanioze važna je analiza specifičnih markera, koji pored pravovremenog postavljanja sumnje na ovu bolest i usmeravanja dijagnostičkog postupka, omogućavaju praćenje toka bolesti i efikasnosti preduzete terapije. Nažalost, istraživanja su pokazala da nijedan marker nije dovoljno specifičan, posebno u proceni otpornosti i osetljivosti na bolest, u prvom redu zbog individualnog odgovora organizma na infekciju. Naime, imunološki odgovor uključuje složenu mrežu regulatornih interakcija više citokina, hemokina i ćelija imunog sistema, zbog čega se ishod odgovora na infekciju ne može lako predvideti. Da bi se pouzdano procenili intenzitet infekcije i ishod bolesti, potrebno je razmotriti više laboratorijskih, imunoloških i parazitskih pokazatelja (Maia i sar., 2018).

U kliničkoj praksi najveću pažnju privlače imunološki biomarkeri osetljivosti i otpornosti na lajšmaniozu, kako kod ljudi tako i kod pasa. Serološke metode kojima se dijagnostikuje pseća lajšmanioza baziraju se na otkrivanju specifičnih antitela protiv parazita lajšmanije (Ribeiro i sar., 2018), a obično se koriste imuno-fluorescentni test IFAT (*immunofluorescence antibody test*) i ELISA (*enzim linked immunosorbent test*). Kod simptomatskih pasa nivoi specifičnih antitela (IgG1 i IgG2) veoma su visoki i lako se otkrivaju, za razliku od pasa sa ranom i asimptomatskom infekcijom (Mettler i sar., 2005).

Rezultat koji pokaže visok nivo antitela potvrđuje lajšmaniozu. Međutim, nizak nivo antitela ne isključuje u potpunosti prisustvo infekcije, stoga je neophodno ponoviti analizu drugim dijagnostičkim metodama (citologija, histopatologija, molekularne metode), kako bi se infekcija potvrdila ili isključila.

Lajšmanioza pasa često je povezana sa specifičnim nezaštitnim humoralnim odgovorom. Prisustvo anti-lajšmanija antitela nije potvrda infekcije jer može odražavati i izloženost parazitu bez nužnog uspostavljanja infekcije. U početnoj i kasnoj fazi infekcije, kao i kod pasa bez kliničkih znakova, proizvodnja specifičnih antitela je mala, dok je postepeni porast nivoa antitela povezano sa nekontrolisanim širenjem parazita (Maia i sar., 2018). Inače, detaljno su istraživane potklase psećih IgG kako bi se povezali sa vrstama Th odgovora i kliničkim ishodom infekcije. Uglavnom su istraženi odgovori na IgG1 i IgG2 i povezanost sa Th1 i/ili Th2 zaštitinim odgovorima. Rezultati su pokazali i značajnu povezanost između IgG, IgA, IgM i IgE i kliničkih znakova bolesti (Maia i sar., 2018).

Indirect fluorescent antibody test (IFAT) i *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* u svakodnevnoj kliničkoj praksi imaju poseban značaj. IFAT je metoda indirektno imunofluorescence, koja koristi antigen promastigota, a titar razlikovanja pozitivnih i negativnih rezultata varira od 1:40 do 1:160 između različitih laboratorija (Solano-Gallego i sar., 2009). Za titre antitela $\geq 1:160$ sa specifičnošću od 100% IFAT test se smatra metodom "zlatnog standarda" za serološku dijagnostiku lajšmanioze pasa (Proverbio i sar., 2013). U ELISA testu antitela iz uzorka vezuju se sa antigenima amastigota i promastigota, što ovu metodu čini najprikladnijim za serološku dijagnozu ove bolesti i kod simptomatskih i kod asimptomatskih pasa (Mettler i sar., 2005). U zavisnosti od toga koje antigene koristi, rastvorljive ekstrakte mastigota, rekombinantne ili pročišćene proteine, pokazaće različitu osetljivost i specifičnost. ELISA sa rekombinantnim peptidima pokazaće veliku specifičnost, ali može imati nedovoljnu osetljivost za identifikaciju asimptomatskih nosilaca. Ukoliko je zasnovana na rekombinantnim antigenima (K9, K26 i K39) pokazuje visoku i osetljivost i specifičnost kod zaraženih pasa (Solano-Gallego i sar., 2009).

Pored ove dve metode, u dijagnostici pseće lajšmanioze u upotrebi su i imunohromatografski testovi koji koriste rekombinantni antigen K39 – rK39 (Otranto i sar., 2004). Ovi testovi su brzi, jednostavni za upotrebu na terenu, daju pouzdane rezultate, i ne zahtevaju posebnu opemu i pripremu uzorka (Proverbio i sar., 2013).

Molekularne metode imaju sve veći značaj u dijagnostici lajšmanioze. Lančana reakcija polimeraze (*polymerase chain reaction, PCR*) predstavlja jednostavan molekularni metod za otkrivanje lajšmanije u različitim kliničkim uzorcima, za identifikaciju vrste, sojeva i genotipa parazita (Albuquerque i sar., 2017). PCR dijagnostika temelji se na otkrivanju specifičnih DNK parazita, a može se sprovoditi na DNK izdvojenom iz tkiva, krvi, telesnih tečnosti i histopatoloških nalaza. Najveću osetljivost i specifičnost je pokazao kod uzoraka uzetih iz koštane srži, limfnih čvorova, slezine i kože, a razvoj PCR metodologije omogućio je i kvantifikaciju opterećenja parazitima u tkivima zaraženih

pasa (Solano-Gallego i sar., 2009). Dijagnoza lajšmanioze pasa uz upotrebu PCR tehnike pokazala je osetljivost od 90% do 100% u klinički sumnjivim i potvrđenim slučajevima prisustva parazita, dok kod rane dijagnoze i otkrivanja parazita u subkliničkim slučajevima ima manju osetljivost, do 80% (Albuquerque i sar., 2017).

Razvoj lajšmanioze kod pasa zavisi i od urođenog imunološkog odgovora domaćina. Urođeni imunološki odgovor igra važnu ulogu u zaštiti od parazita i utiče na razvoj dugotrajnog adaptivnog odgovora. Čelijski imuni odgovor povezan je sa aktiviranjem T ćelija koje proizvode interferon-gama (IFN- γ), faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) i IL-2. Th1 odgovor je pri tome odgovoran za aktivaciju makrofaga i istovremeno unutarćelijsko ubijanje parazita, dok je aktivna bolest povezana sa mešanim Th1/Th2 odgovorom. Imunološki odgovor specifičan je za svaki organ ili tkivo, pa tako i Th1, Th2 ili mešani Th1/Th2 imunološki odgovori povezani su sa nepostojanjem ili prisutnošću kliničkih znakova i lokalnim opterećenjem parazitima (Reis i sar., 2009; Maia i Campino, 2012; Hosein i sar., 2017; Maia i Campino, 2018). Osetljivost ili otpornost kod infekcije lajšmanijom kod pasa posredovana je ćelijskim imunološkim odgovorima, a za procenu njihove efikasnosti na raspolaganju je nekoliko metoda (Maia i Campino, 2018). Pre objašnjenja njihovih principa neophodno je podsetiti se najznačajnijih karakteristika imunološkog odgovora.

Ubodom zaražene peščane mušice dolazi do inokulacije lajšmanija u kožu, pri čemu se aktiviraju ćelije urođenog imunološkog sistema, a glavnu ulogu igraju dendritičke ćelije i makrofagi. Pojačana ekspresija IL-4 ili prekomerna proizvodnja IL-4, IL-13 i TNF- α povezana je sa velikim opterećenjem parazitama i klinički izraženom bolesti. Povećano opterećenje povezuje se i sa povećanjem regulacije IL-10 i TNF- α u koži zaraženih pasa (Barbosa i sar., 2011; Papadogiannakis i Koutinas, 2015; Maia i Campino, 2018).

U ćelijama koštane srži specifičan imunološki odgovor se karakteriše lučenjem IFN- γ i IL-2, IL-4 i IL-12 kod asimptomatskih i simptomatskih pasa. Progresija bolesti ipak se povezuje sa proinflamatornim okruženjem i povišenom ekspresijom TNF- α i IFN- γ . U ovom smislu važno je postojanje izražene pozitivne korelacije između nivoa IL-4 i težine bolesti. Kod upalnih procesa uključen je IL-12 koji aktivira makrofage i pojačava njihovu mikrobicidnu aktivnost. U ćelijama koštane srži dolazi do njegove ekspresije nakon lečenja pasa meglumin antimonijatom i alopurinolom (Barbosa i sar., 2011; Maia i Campino, 2012; Maia i Campino, 2018).

U kontekstu regulacije imunološkog odgovora tokom infekcije poseban značaj imaju proizvodnja citokina i drugih medijatora u jetri. Proizvodnja IL-4 i TNF- α u jetri veća je nego u slezini kod inficiranih asimptomatskih i simptomatskih pasa. Pri tome, kod zaraženih pasa sa izraženim kliničkim znacima hepatociti stvaraju manje IL-10 i TGF- β 1. U interakciji sa Kupferovim ćelijama, parazit *Leishmania infantum* najverovatnije izaziva stanje koje stimuliše imunološku toleranciju i preživljavanje parazita (Michelin i sar., 2011; Maia i Campino, 2018).

Ravnoteža između proinflamatorne i antiinflamatorne ekspresije citokina u limfnim čvorovima određuje nivo opterećenja parazitima i karakteristike kliničke slike. U limfnim čvorovima zabeleženi su prirodno visoki IL-2, IL-12, TNF- α i IFN- γ , dok su kod pasa koji pokazuju kliničke znake bolesti značajno povećane ekspresija IL-10 i TGF- β , što ukazuje na ulogu ovih citokina u razvoju bolesti (Alves i sar., 2009; Barbosa i sar., 2011; Maia i Campino, 2012; Maia i Campino, 2018).

Proizvodnja IFN- γ u limfocitima periferne krvi inficiranih pasa, stimuliranih ili nestimuliranih rastvorljivim antigenom lajšmanije (SLA), povezuje se sa otpornošću na bolest, asimptomatskim statusom ili blagom bolešću. Sa druge strane njegov nedostatak uočen je kod simptomatskih pasa, bolesnih pasa sa snažnim humoralnim odgovorom, visoke parazitemije i teške kliničke slike. Dugotrajnim tretmanom meglumin antimonijatom i alopurinolom povećava se njegova koncentracija, čije bi praćenje stoga moglo biti značajno za praćenje imunološkog statusa pasa sa lajšmaniozom. Analiza nivoa nekoliko drugih citokina obično daje nekonzistentne rezultate (Solano-Gallego i sar., 2016; Martínez-Orellana i sar., 2017; Maia i Campino, 2018).

Ispitivanja patofiziološkog i kliničkog značaja proizvodnje citokina i hemokina u ćelijama slezine, odnosno drugih tkiva, donela su rezultate čije je tumačenje izazovno. U nekim slučajevima ekspresija IL-10 u ćelijama slezine povezana je sa povećanjem opterećenja parazitom i napredovanjem bolesti. Međutim, zabeležena je parazitološka i klinička progresija koja nije praćena značajnim promenama u ekspresiji ovog citokina. U funkcionalnom smislu, pojačana ekspresija TNF- α i IFN- γ u ćelijama slezine je neophodna za smanjenje opterećenja organizma parazitima. Posledično, povećanje TNF- α može predstavljati značajan pokazatelj napredovanja infekcije, dok visoka ekspresija IFN- γ ukazuje za najlošiju prognozu bolesti. Kod visokih nivoa IFN- γ u slezini dolazi i do ranog povećanja ekspresije IL-4, što je još jedan od pokazatelja povećanog opterećenja parazitima (Nascimento i sar., 2013; Maia i Campino, 2018).

Ćelijski imunitet može se proceniti Montenegro testom ili kožnim lajšmanija testom (LST) koji se zasniva na imunološkoj reakciji „odloženog“ tipa. Lajšmanijski antigen, u formi suspenzije inaktiviranih parazita, inokulira se intradermalno. Test je pozitivan ukoliko nakon 48–72 sata dođe do otvrdnuća promera 5 mm na mestu inokulacije. Tokom aktivne bolesti LST test je negativan, a nalaz je pozitivan tokom supkliničke infekcije, rane faze kliničke bolesti ili nakon uspešnog lečenja (Maia i Campino, 2018).

Testovi za procenu imuniteta uključuju ispitivanje proliferacije limfocita i analize za merenje IFN- γ u limfocitima periferne krvi. Test proliferacije limfocita sastoji se od stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi rastvorljivim antigenom lajšmanije uz dodatak mitogena. Rezultat testa tj. ćelijska poliferacija se izražava kao indeks stimulacije (SI) koji je zapravo odnos količina IFN- γ izmerenih u stimulisanim i nestimuliranim ćelijama koje predstavljaju negativnu kontrolu. Pozitivnim rezultatom se smatraju SI vrednosti jednake ili veće od dva. Snažan proliferativni odgovor pokazuju asimptomatski

i rezistentni psi, dok osetljive i bolesne životinje ne reaguju na stimulaciju (Maia i Campino, 2018).

Korisno sredstvo za procenu infekcije sa *Leishmania* spp. predstavlja test oslobađanja INF- γ *releasing assay* (IGRA) koji omogućava brzi skrining izlučivanja IFN- γ u punu krv nakon stimulacije sa SLA. Pozitivne rezultate pokazuju asimptomatskih zaraženi psi, odnosno oni sa blagom kliničkom slikom ili malim opterećenjem parazita. Negativni rezultati se susreću kod pasa sa visokim opterećenjem parazitom (Maia i Campino, 2018).

Funkcionalna sposobnost makrofaga da eliminišu *Leishmania* spp. može se proceniti analizom stvorenog azot oksida (NO). Test je izuzetno značajan budući da je NO, nastao u makrofagama, glavni efektorski molekul koja posreduje unutarćelijsko ubijanje lajšmanija amastigota apoptozom. Otkriveno je da citokini poput IFN- γ i TNF- α izlučeni aktiviranim T ćelijama aktiviraju inducibilnu NO sintazu i pospešuju stvaranje NO, što olakšava eliminaciju i kontrolu opterećenja parazitom (Maia i Campino, 2018).

Kod vektorski prenosivih bolesti se, osim biomarkera bolesti, koriste i pokazatelji izloženosti samim vektorima, što je od suštinskog preventivnog značaja, u smislu procene rizika od zaraze, te kontroli širenja vektora. Uročnici lajšmanioze prilikom uboda zaraženih flebotomina dospevaju u krvotok domaćina sisara putem pljuvačke flebotomine. Pljuvačne žlezde mušice luče molekule koji su potentni imunogeni i imunomodulatori, što za posledici ima sintezu specifičnih antitela. Njihov nalaz, shodno tome, predstavlja važan epidemiološki odnosno epizootiološki marker za praćenje izloženosti vektorima u endemskim područjima (Collin i sar., 2009; Teixeira i sar., 2010; Martín-Martín i sar., 2014; Maia i Campino, 2018).

Individualne razlike u sklonosti ka razvoju bolesti, upućuju da predispozicija za nastanak infekcije i bolesti može biti genetski uslovljena. Genetski markeri koji se povezuju sa regulacijom nivoa pro- i antiinflamatornih citokina mogu biti odgovorni za „fenotipsku“ varijabilnost podložnosti pasa na infekciju sa *L. infantum*, odnosno ćelijski imunološki odgovor na prisutnost parazita. Interesantan primer predstavljaju polimorfizmi u genu *Slc11a1* koji se povezuju sa povećanom predispozicijom za pseću lajšmaniozu kod različitih rasa pasa. Pomenuti gen kodira transporter jona koji je povezan sa kontrolom umnožavanja amastigota *Leishmania*-e i aktivacijom makrofaga (Sanchez-Robert i sar., 2005; Sanchez-Robert i sar., 2008; de Vaconcelos i sar., 2017; Maia i Campino, 2018).

Veliki značaj imaju i rutinski dijagnostički testovi kojima se potvrđuju promene poput anemije ili poremećaja funkcije bubrega i jetre. Psi sa klinički manifestnom lajšmaniozom kao najčešće hematološko odstupanje imaju blagu do umerenu normocitnu i normohromnu neregenerativnu anemiju, karakterističnu za hroničnu inflamaciju. Njena pojava se može pripisati poremećajima u koštanoj srži koji smanjuju obim eritropoeze, ali i smanjenom stvaranju eritropoetina usled hronične bubrežne bolesti. Ređe može biti prisutna makrocitna hipohromna regenerativna anemija, zbog intenzivnije hemolize (Reis i sar., 2006; Paltrinieri i sar., 2016; Maia i Campino, 2018).

Prisustvo parazita u više organa ima za posledicu reakciju akutne faze, što često kod pasa sa lajšmaniozom dovodi do neutrofilije. Infekcija uzrokuje oksidativni stres, poremećaj ravnoteže između visokoreaktivnih kiseoničnih i azotnih slobodnih radikala i antioksidativnih jedinjenja u neutrofilima (Torrecilha i sar., 2016; Maia i Campino, 2018). U leukocitnoj formuli nije neobično prisustvo manje izraženih promena poput monocitoze, limfopenije, eozinopenije ili leukopenije. Za razliku od pomenutih promena, pojava trombocitopenije je mnogo češća. Tekođe, opisani su i različiti hemostatski poremećaji koji mogu obuhvatiti trombocitopatiju, hiperprotrombinemiju, oslabljenu sekundarnu hemostazu i fibrinolizu, serumsku hiperviskoznost i hiperfibrinogenemiju (Ciaramella i sar., 1997; Reis i sar., 2006; Paltrinieri i sar., 2010; Meléndez-Lazo i sar., 2018; Maia i Campino, 2018).

Napredovanje bolesti može se dovesti u vezu sa promenjenim serumskim „proteinskim profilom“ tj. hiperproteinemijom, hipoalbuminemijom i smanjenim količnikom između koncentracija albumina i globulina (A/G), povećanim nivoom proteina koji pripadaju α - i β -globulinima, kao i poliklonskom hipergamaglobulinemijom. Uobičajeni podaci u laboratorijskim nalazima kod pasa sa lajšmaniozom su i povećani nivoi proteina akutne faze: C-reaktivnog proteina (CRP), feritina, haptoglobina i serum amiloida A (SAA). Osim disproteinemije, tokom napredovanja bolesti se može pratiti promena parametara koji ukazuju na poremećaj funkcije jetre i bubrega (Ciaramella i sar., 1997; Koutinas i sar., 1999; Paltrinieri i sar., 2016; Meléndez-Lazo i sar., 2018; Maia i Campino, 2018). Proteinurija bez bubrežne azotemije sekundarna je u odnosu na taloženje imunoloških kompleksa na glomerularnom nivou, dok azotemija vidljiva u ranom stadijumu bolesti može biti povezana sa sistemskom hipertenzijom (Maia i Campino, 2018).

Profil enzimskih promena u serumu pasa sa lajšmaniozom takođe nije specifičan. Zabeležena je porast aktivnosti enzima poreklom iz skeletnih mišića, kao što su kreatin kinaza (CK) i laktat dehidrogenaza (LDH). Takođe, nisu retke ni promene u aktivnosti matriks metaloproteinaza ili paraoksonaze-1 (Ciaramella i sar., 1997; Koutinas i sar., 1999; Meléndez-Lazo i sar., 2018; Maia i Campino, 2018).

Rutinski laboratorijski testovi su nezaobilazni tokom praćenja toka lajšmanioze, kao i za prognostičke procene (Maia i Campino, 2018). Tako na primer, sa lošom prognozom obolelih pasa povezuje se kontinuirana limfopenija (Geisweid i sar., 2012). Napredak bolesti povezuje se i sa gubitkom funkcionalnosti neutrofila, koje ilustruju smanjena

reaktivnost i kapacitet oksidativnih efektorskih mehanizama, te intenzivna apoptoza (Almeida i sar., 2013).

U kliničkoj praksi, laboratorijski parametri pokazuju izuzetan značaj i za praćenje toka lečenja i oporavka nakon lečenja. Kao odgovor na lečenje lajšmanioze očekivano je smanjenje koncentracije globulina, odnos A/G ostaće nizak kod pasa sa trajnim oštećenjem glomerula i proteinurijom, kod kojih perzistira hipoalbuminemija. Nalaz elektroforetske analize proteina seruma nakon mesec dana lečenja donosi više informacija. Očekivano je progresivno smanjenje globulinske frakcije posle dve do 6 nedelja ako se za lečenje koristi antimonijat, odnosno unutar 3 meseca terapije marbofloksacinom. Najkraći period za koji se može očekivati da elektroforetski profil bude kao kod zdravih pasa je između tri i četiri meseca (Rossi i sar., 2014; Paltrinieri i sar., 2016).

Pouzdana procena efikasnosti terapije moguća je najranije jednu do dve nedelje od njenog početka, i pružaju je promene koncentracija proteina akutne faze. Važno je naglasiti da eventualne promene ostalih rutinskih kliničko-patoloških parametara ne poseduju dovoljnu osetljivost i specifičnost za ovu namenu. Već tokom dve nedelje nakon lečenja antimonijatom uočava se početak opadanja koncentracija CRP i SAA, koje se za mesec dana vraćaju na vrednosti u okviru ili bliske referentnim intervalima. Analiza koncentracije proteina akutne faze značajna je i za procenu efikasnosti dugotrajne terapije, o čemu svedoči pad koncentracija haptoglobina i CRP kod terapije alopurinolom. Ukoliko se meglumin antimonijat kombinuje sa alopurinolom smanjenje proteinurije započinje u rasponu od četiri do 8 nedelja, a dinamika obnavljanje funkcije bubrega nakon tretmana zavisi od stepena oštećenja prisutnog u trenutku postavljanja dijagnoze (Maia i Campino, 2018).

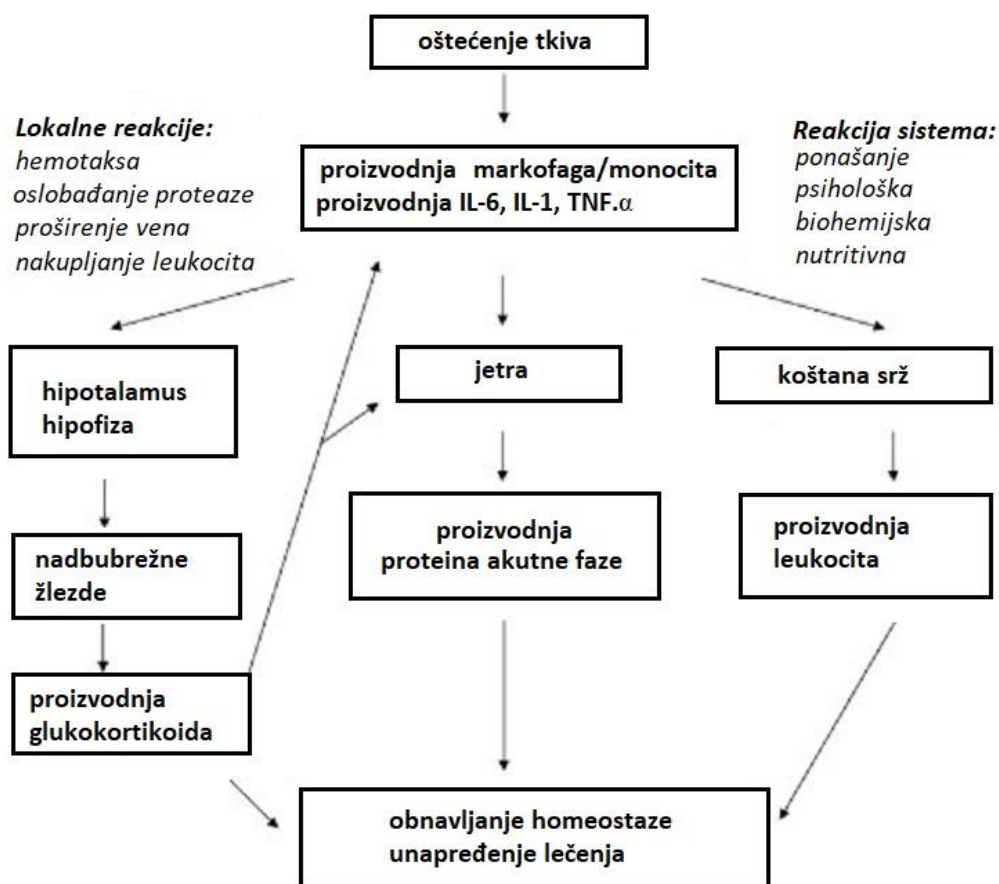
2.11.2. Značaj proteina akutne faze u dijagnostici lajšmanioze

Sve promene koje se događaju u organizmu ubrzo nakon bilo kakve ozlede tkiva, a sa ciljem ponovnog uspostavljanja homeostaze, potpadaju pod pojam “odgovor akutne faze” (Martinez Subiela i Ceron, 2005). Odgovor akutne faze obuhvata širok raspon patofizioloških odgovora kao što su pireksija, leukocitoza, hormonske promene i katabolizam proteina u mišićima, koji se kombinuju kako bi se smanjilo oštećenje tkiva (Jain i sar., 2011).

Odgovor akutne faze pokreću tkivni makrofagi, krvni monociti i dendritične ćelije na mestu oštećenja tkiva (Cray, 2012). Molekulski okidač odgovora akutne faze predstavlja lokalno povećanje nivoa proinflamatornih citokina, kao što su IL-1, IL-6 i TNF- α , oslobođenih kao odgovor na ozledu tkiva (Schmidt i sar., 2015; Cray, 2012). Oni signaliziraju hepatocitima da intenziviraju sintezu proteina akutne faze, koji zatim, pojačavajući hemotaksu, ispoljavaju druge imunomodulatorne efekte. U najvećoj količini proteini akutne faze se stvaraju u jetri, premda postoje dokazi da ih mogu sintetisati i druga tkiva. Važan aspekt delovanja pomenutih proinflamatornih citokina su i njihovi efekti u koštanoj srži koji za posledicu imaju leukocitozu.

Osim efekata na imunološki sistem, porast nivoa citokina ima i neuroendokrinološke efekte koji za posledice imaju promene u ponašanju, odnosno fiziološkim i nutritivnim karakteristikama. Dejstvom IL-6 stimuliše se sinteza kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) u hipotalamusu. Posledično, dolazi do porasta oslobađanja adreno-kortikotropnog hormona (ACTH) iz hipofize, a zatim i do intenziviranja sinteze i sekrecije glukokortikoida u srži nadbubrežne žlezde (Slika 9). Povišenje nivoa glukokortikoida se povezuje sa sintezom i oslobađanjem proinflamatornih citokina, hiperglikemijom i sintezom proteina akutne faze.

Odgovor akutne faze smatra se delom urođenog odbrambenog sistema domaćina, koji prethodi stečenom imunološkom odgovoru. Tokom ovog odgovora, u jetri dolazi do povećane proizvodnje i oslobađanja određenih proteina plazme, poznatih kao proteini akutne faze (Schmidt i sar., 2015; Jain i sar., 2011). U humanoj medicini se proteini akutne faze već decenijama koriste kao pokazatelji upale, infekcije i traume, dok je u veterinarskoj medicini sa ovom praksom otpočeto dosta kasnije (Martínez-Subiela i sar., 2002). Poslednjih godina je postignut značajan napredak u poznavanju biohemije i kliničkoj primeni proteina akutne faze kao biomarkera kod kućnih ljubimaca i farmskih životinja (Eckersall i Bell, 2010). Odgovor akutne faze je u evolutivnom smislu visoko-konzerviran patofiziološki mehanizam, budući da je prisutan kod predstavnika većine životinjskih vrsta „od riba do sisara“. Međutim, neophodno je imati na umu da se protein kome pripada dominantna uloga među proteinima akutne faze razlikuje u zavisnosti od vrste. Bez obzira na ovo potencijalno ograničenje, sve veći broj studija na životinjama svedoči o značaju ovih proteina kako za dijagnozu, tako i za praćenje toka i prognozu bolesti koje karakteriše inflamatorna komponenta (Cray, 2012).



Slika 7. Šematski prikaz odgovora akutne faze (prevedeno iz Cray, 2012)

Proteini kojima tokom odgovora akutne faze dolazi do ubrzane sinteze i oslobađanja, te i porasta koncentracije u krvi, zajednički se nazivaju pozitivni proteini (reaktanti) akutne faze. Njihovi najznačajniji predstavnici su CRP, haptoglobin, i ceruloplazmin. Ukoliko su promene koncentracije suprotnog smera tj. snižavaju se, takvi proteini se ubrajaju u negativne proteine (reaktante) akutne faze. Kao primeri ovakvih proteina navode se albumin i prealbumin, budući da je za njih karakteristično da im se tokom reakcije akutne faze smanjuje obim sinteze (Martinez Subiela i Ceron, 2005). Za preciznu klasifikaciju proteina akutne faze neophodno je zajedno razmotriti i stepen i dinamiku poremećaja u njihovoj homeostazi. Glavnim proteinima akutne faze bi bilo opravdano smatrati proteine čija se sinteza ubrzava u rasponu od 10 do 1000 puta tokom 24 do 48 sati od inflamatornog stimulusa. Za umerene proteine akutne faze karakterističan je viši bazalni nivo u poređenju sa glavnim, te su porasti u njihovim koncentracijama manje izraženi, tj. kreću se između pet do 10 puta i to tokom tri ili više dana trajanja reakcije akutne faze. Ukoliko je porast nivoa još manje izražen, i neretko ne prelazi dvostruko povećanje, govori se o blagim proteinima akutne faze. U kontekstu ovakvog sistema klasifikacije treba uzeti u obzir da na dinamiku koncentracije može uticati i vrsta samog stimulusa odnosno nokse koja je izazvala oštećenje tkiva, ali i specifičnosti metode korišćene za analizu koncentracije proteina (Cray, 2012).

CRP je protein akutne faze koji je identifikovan u krvi ljudi i ostalih primata koji su bili inficirani sa *Streptococcus pneumoniae*. Utvrđeno je da polisaharidna “C komponenta” bakterijskog zida intereaguje sa proteinom čija je koncentracija u krvi rasla tokom infekcije i koji je stoga nazvan C-reaktivnim proteinom (Cray, 2012). Uloga CRP kao proteina akutne faze je kompleksna. Snažan je aktivator sistema komplementa čime doprinosi eliminaciji uzročnika inflamatornog odgovora. Sa druge strane, zapaženu ulogu ima i u mehanizmima koji spečavaju da inflamatorni odgovor postane “nepotrebno jak” tako što utiče na funkcije neutrofila, inhibira hemotaksu i pospešuje sintezu citokina sa antiinflamatornim efektima. Smatra se glavnim proteinom akutne faze kod pasa, budući da se njegova koncentracija u serumu može povećati brzo kod brojnih bolesti koje uključuju inflamatorni odgovor. Koncentracije dosežu vrhunac nakon 24–48 časova i mogu čak premašiti vrednosti od 100 mg/L kod bolesnih životinja, dok se kod zdravih pasa navode koncentracije do 10 mg/L (Schmidt i sar., 2015; Muñoz-Prieto i sar., 2017).

Serum amiloid A (SAA) predstavlja glavni pozitivni protein akutne faze kod pasa i mačaka, pri čemu se poseban naglasak stavlja na njegov prognostički potencijal. Njegove glavne biološke funkcije vezane su za transport holesterola, hemotaksu leukocita, pospešivanje sinteze proinflamatornih citokina, imunomodulaciju i opsonizaciju, a povezuju se i sa aktivnošću enzima koji razgrađuju vanćelijski matriks. Takođe, smatra se odgovornim za promene u transportu i morfološkim karakteristikama lipoproteina koje se događaju tokom reakcije akutne faze (Cray, 2012; Schmidt i sar., 2015). Tokom reakcije akutne faze porast koncentracije SAA je veoma intenzivan, budući da postaje uočljiv već nakon četiri do pet sati, a kreće se u rasponu od pet do 1000 puta (Gruys i sar., 2005).

Ceruloplazmin (Cp), protein koji se prilikom elektroforeze proteina seruma lokalizuje u zoni α_2 globulina, takođe predstavlja značajan pozitivni protein akutne faze kod pasa (Cerón i Martínez-Subiela, 2004). Za ovaj glikoprotein vezana je skoro celokupna količina bakra prisutnog u krvi. Tokom reakcije akutne faze uloga Cp je nezaobilazna u antioksidativnoj zaštiti. Sprečava oksidativna oštećenja posredovana slobodnim jonima gvožđa ili delovanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta koji se oslobađaju iz fagocitnih ćelija tokom upalnih stanja (Cray, 2012). Porast serumske koncentracije ceruloplazmina kod pasa, dostiže maksimu, oko četvrtog dana od insulta a njegova koncentracija se obično udvostručuje u odnosu na fiziološku vrednost. Merenje ovog proteina pruža vredne informacije o statusu upale i pokazao se korisnim za praćenje ishoda lečenja lajšmanioze kod pasa (Cerón i Martínez-Subiela, 2004).

Haptoglobin (HP) se sastoji od 2α i 2β podjedinice. Postoje različiti podtipovi i oni mogu varirati zavisno od vrste. Tokom različitih autoimunih, zaraznih ili naslednih bolesti, oslobođeni hemoglobin vezuje se za HP. Zanimljivo je da se HP nalazi kod sisara i riba, ali ne i kod ptica i žaba, gde je identifikovan drugi protein koji veže hemoglobin nazvan PIT54 (Cray, 2012). Kod pasa i mačaka HP je umereni protein akutne faze koji će se tokom odgovora povećati 2 do 10 puta, a vrhunac će dostići dva do tri dana nakon stimulacije. HP inhibira hemotaksu neutrofilnih granulocita i fagocitozu, a ima i

indirektan bakteriostatski učinak vezujući hemoglobin i ubrzavajući njegovo uklanjanje iz cirkulacije te na taj način ograničavajući dostupnost hemoglobinskog gvožđa za rast bakterija. Takođe, na taj način ograničava ili sprečava oksidativna oštećenja posredovana hemskim gvožđem (Schmidt i sar., 2015). Testovi za HP kod životinja često izvode na osnovu peroksidazne aktivnosti kompleksa hemoglobina i haptoglobina (Cray, 2012).

U pozitivne proteine akutne faze spada i alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) – visoko glikozilirani protein koji ima sposobnost vezivanja heparina, serotoninina, steroida i histamina. Ovaj protein je takođe uključen u antiinflamatorni odgovor i opisano je da može da veže lipopolisaharid (LPS). Testovi za AGP kod životinja obično se izvode putem radijalne imunodifuzije, što ovaj konkretni protein akutne faze čini nezavidnim za upotrebu kao brzi dijagnostički test (Cray, 2012). AGP, prethodno poznat kao orosomukoid, deluje imunomodulatorno tokom reakcije akutne faze stimulišući sintezu IL-10. Smatra se glavnim proteinom akutne faze kod mačaka, a umerenim kod pasa (Schmidt i sar., 2015).

U negativne proteine akutne faze spada albumin, najzastupljeniji protein u krvi, koji čini 35–50% proteina u plazmi zdravih pasa i mačaka. Odgovoran je za oko 75% onkotskog pritiska plazme i glavni je izvor aminokiselina koje telo životinje može iskoristiti kada je to potrebno (Pathan i sar., 2012). Tokom inflamatornog odgovora koncentracija albumina smanjuje se za više od 25%, što ga svrstava u grupu negativnih proteina akutne faze (Schmidt i sar., 2015). Smanjenje se može pripisati gubitku proteina zbog bubrežne bolesti ili inflamatorne bolesti creva ili edema, kao i zbog smanjene sinteze u hepatocitima usled desjtav proinflamatornih citokina ili zbog pothranjenosti.

Transferin (TN) je protein koji ima ulogu transportu gvožđa kroz cirkulaciju. Kod sisara je takođe negativan protein akutne faze. Kod ptica je pokazano da raste tokom odgovora akutne faze (Cray, 2012).

Paraoksonaza-1 (PON-1) je enzim koji se smatra negativnim proteinom ili reaktantom akutne faze. Vezan za lipoproteine visoke gustine (High density lipoproteins - HDL) i predstavlja vezu između inflamacije i oksidativnog stresa. Njegova fiziološka uloga je zaštita molekula lipida od oksidativnog stresa odnosno peroksidacije (Taler-Verčič i sar., 2020). Njegovo smanjenje se ne beleži uvek kod pasa sa lajšmaniozom, ali može postati izrazito kada je oksidativni stres posebno jak (Paltrinieri i sar., 2016).

Nekoliko autora sugerisalo je da se jedan protein akutne faze ne bi smeo isključivo koristiti za praćenje procesa bolesti (Cray, 2012). Kada se proteini akutne faze koriste za procenu bolesnih životinja u odnosu na zdrave, vrednosti pojedinačnih reaktanata često nisu dovoljno osetljive. Kombinacijom pozitivnih i negativnih proteina (reaktanata) akutne faze u indeksu postižu se bolji rezultati u proceni zdravstvenog stanja životinja (Gruys i sar., 2005). Ovaj indeks uključuje pozitivne i negativne proteine akutne faze, kao i proteine akutne faze koji se brzo i sporo povećavaju, formirajući tako sveobuhvatan indeks koji bi korelirao s težinom upalnog procesa (Cray, 2012). Index akutne faze (API) se zasniva na (Toussaint i sar., 1995) na sledećem odnosu:

brzi pozitivan APR x spori pozitivan APR

spori negativan APR x brzi negativan APR

U dosadašnjim istraživanjima lajšmanioze pasa API je računat na dva različita načina. U jednom slučaju (APP Indeks – 1) je kombinovan jedan pozitivan i jedan negativan protein akutne faze, dok su u drugom slučaju (APP Indeks – 2) kombinovana dva pozitivna i jedan negativan protein akutne faze (Martinez-Subiela i Ceron, 2005) prema sledećim formulama:

$$\text{APP Indeks - 1} = \frac{\text{pozitivan APP (g/100ml)}}{\text{negativan APP (g/100 ml)}} \times 10^6$$

$$\text{APP Indeks - 2} = \frac{\text{pozitivan APP (g/100ml)} \times \text{pozitivan APP (g/100ml)}}{\text{negativan APP (g/100 ml)}} \times 10^6$$

2.11.3. Značaj molekula koji utiču na ili pokazuju funkciju endotela u patogenezi i dijagnostici lajšmanioze

Matriks-metaloproteinaze: Oštećenje tkiva i organa kod pasa sa lajšmaniozom nastaje usled taloženja imunskih kompleksa u zidove krvnih sudova. Zbog toga potvrda oštećenja endotela ima značaj u razumevanju patogeneze odnosno dijagnostici lajšmanioze. Aktivnost pojedinih matriks-metaloproteinaza (MMP) može ukazivati na oštećenje endotela. Familija MMP predstavlja proteolitičke enzime koji razgrađuju većinu komponenti ekstraćelijskog matriksa i bazalne membrane u mnogim patološkim procesima, kao što su hronično zapaljenje i lezije tkiva (Andonovska i sar., 2008). Takođe, funkcija MMP je vezana za homeostazu krvnih sudova, ali i njihovo remodeliranje tokom patoloških procesa (Masciantonio i sar., 2017). Kod ljudi postoje 23 MMP čija je aktivnost regulisana brojnim mehanizmima u koje su uključeni enzimi nazvani – tkivni inhibitori MMP – TIMP. Aktivnost MMP se menja tokom inflamacije. Povećava se pod dejstvom citokina TGF- β (engl: *transforming growth factor- β*) (Seomun i sar., 2008) i TNF- α (engl: *tumour necrosis factor TNF- α*) (Mäkelä i sar., 1998), dok se smanjuje pod dejstvom interleukina (IL)-10 (Stearns i sar., 2003). Za sada je pokazano da interferon (IFN)- γ može imati stimulatorne i inhibitorne efekte na sintezu i aktivnost MMP (Harris i sar., 2007; Fontana i sar., 2010). Aktivnost MMP povezuje se sa kutanim manifestacijama (Jacintho i sar., 2018), odnosno nastankom neuroloških komplikacija lajšmanioze kod pasa (Melo i sar., 2012).

Poznato je da serumska proMMP-9 potiče iz leukocita, proMMP-2 iz endotelih ćelija, a da trombociti za svoju membranu imaju vezana oba enzima (Spariosu et al., 2021). MMP-2 i 9 su važne za migraciju leukocita jer razgrađuju kolagen tipa IV u bazalnoj membrani. Melo i sar. (2011) su ispitivali aktivnost MMP-2 i MMP-9 kod zdravih pasa i pasa sa visceralnom lajšmaniozom. Kod zaraženih jedinki su ustanovili veći nivo MMP-9, proMMP-9 i proMMP-2, bez povećanja aktivnosti MMP-2. S druge strane, i donekle u kontradikciji sa izloženim nalazom je rezultat prospektivne studije koji je pokazao da je kod ljudi inficiranih sa *L. chagasi* porast nivoa MMP-9 u serumu bio indikator uspeha terapije i prediktor pozitivnog kliničkog ishoda (de Oliveira i sar., 2013).

Aktivnost MMP-2 i MMP-9 se vezuje za mnoge ćelije. Među ranim znacima lajšmanioze kod pasa, javlja se dermatitis. U koži pasa sa dermatitisom usled infekcije lajšmanijom, pokazana je veća aktivnost MMP-9 i donekle MMP-2 (Jacintho i sar., 2018). Ipak, najviše podataka vezano za aktivnost MMP i patogenezu dermatitisa se može pronaći u analizama kože čoveka. Slično kao kod pasa, pokazano je da se visoka aktivnost MMP-9 u tkivima može povezati sa većim oštećenjem tokom infekcije (Campos i sar., 2014; Sayuri Murase i sar., 2018). Analiza aktivnosti MMP-2 je nešto složenija. Naime, u koži osoba koje nisu adekvatno odgovorile na terapiju anti-lajšmaniotičnim lekovima, nivo citokina koji stimulišu aktivnost MMP-2 i sama aktivnost ovog enzima su bile više nego kod onih koji su imali pozitivan odgovor i zaceljenje oštećenog tkiva (Maretti-Mira i sar., 2011). Istovremeno, u koži osoba koje su pozitivno odgovorile na terapiju, rasla je koncentracija IL-10, a smanjivala se aktivnost MMP-2 (Maretti-Mira i sar., 2011). Nasuprot tome, u drugoj studiji, pokazano je da pacijenti kod kojih se može pokazati visoka transkripcija MMP-2 imaju pozitivan odgovor na terapiju (Sayuri Murase i sar., 2018).

Karakteristična mikroskopska lezija kod visceralne lajšmanioze je nakupljanje limfocita i makrofaga sa amastigotima *Leishmania*-e u limfatičnim organima što dovodi do limfadenomegalije. Iako ekspresija MMP u limfnim čvorovima lajšmaniotičnih životinja do sada nije ispitivana, pokazano je da je ekspresija ovih enzima povećana u limfatičnim tkivima pacijenta koji boluju od limfoma. Najveća aktivnost je lokalizovana na mestima ekspanzivnog rasta i povezana je sa prisustvom limfoblasta, makrofaga i neutrofila (Sakata i sar., 2004). Stoga je moguće pretpostaviti da je i limfatično tkivo izvor MMP kod pasa sa lajšmaniozom.

Interesantno je da i sama *Leishmania* spp. na svom apikalnom kraju ima metaloproteinazu (gp63) koja razlaže makromolekule vanćelijskog matriksa domaćina omogućavajući sopstvenu migraciju (McGwire i sar., 2003). Na kraju, za interpretaciju aktivnosti MMP u patološkim stanjima treba imati na umu da i smanjena i povećana aktivnost MMP mogu doprineti patološkoj degradaciji tkiva i poremećaju zarastanja rana.

Homocistein: Jedan od posebno važnih biomarkera oštećenja endotela je homocistein (Hcy). U humanoj medicini naglašava se korelacija između povišenog sadržaja Hcy i koronarne bolesti. Nakupljanje Hcy najverovatnije dovodi do direktnog oštećenja endotela krvnih sudova i pojave hroničnog upalnog procesa, koje za posledicu ima

oštećenje slobodnim kiseonikovim radikalima i taloženje lipoproteina male gustine (LDL), što dodatno otežava protok u krvnim sudovima (Mulvihill, 2004).

Hiperhomocisteinemija (HHcy) se u humanoj medicini dovodi u vezu sa rizikom od razvoja ateroskleroze i tromboze arterija i vena, te prediktorom srčanih bolesti, moždanog udara i poremećaja cirkulacije u vezi sa hiperholesterolemijom (Ganguly i Alam, 2015). Povezanost HHcy i pojave ateroskleroze se može sagledati kroz najmanje tri mehanizma: direktnim oštećenjem endotelnih ćelija od strane HHcy, prokoagulantno narušavanje hemostazne ravnoteže i oksidacijom LDL.

HHcy možemo očekivati kod osoba sa nedostatkom vitamina B₁₂, B₆ i B₉ (folna kiselina), kao i kod nekih naslednih nedostataka u aktivnosti enzima koji su uključeni u metabolizam Hcy. Pomenuti vitamini B kompleksa su neophodni kao kofaktori za enzime koji razlažu Hcy. Vitamin B₆ je kofaktor enzima cistationin β-sintaze i cistationaze, koji pretvaraju Hcy u cistein, a B₁₂ za metionin sintazu koji pretvara Hcy u metionin. Istraživanja su pokazala da vegetarijanci koji ishranom ne unose zadovoljavajuće količine B vitamina imaju veće cirkulišuće vrednosti Hcy, te da se ishranom mesom unose značajne količine B₆ i B₁₂ vitamina koje pozitivno utiču na smanjenje nivoa Hcy u krvi (Ganguly i Alam, 2015; Martí-Carvajal i sar., 2017).

Literaturno su dostupni i podaci o povećanom nivou Hcy kod pasa sa srčanim i bubrežnim oboljenjima, hipotiroidizmom, gastrointestinalnim poremećajima (Benvenuti i sar., 2020), međutim nivo nije ispitivan kod infekcije sa *Leishmania* spp. Zanimljivo je, pri tome, da su Patterson i sar., (2013), kod bolesnih pasa sa sistemskim inflamatornim odgovorom uzvrdili statistički značajno niže vrednosti Hcy u poređenju sa zdravim psima, što se razlikuje od zapažanja u humanoj medicini. Ovakvi nalazi zavređuju dublju analizu budući da se Hcy može smatrati i markerom inflamacije, o čemu govore studije koje su pokazale da zapaljenje dovodi do povećanja koncentracije Hcy u krvi, a posledično i do oštećenja endotela krvnih sudova (Wu, 2007).

Imunoglobulini: Kod pasa postoji svih 5 klasa imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD i IgE. Iako su od 80-ih godina prošlog veka dostupni komercijalni antiserumi za dokazivanje imunoglobulina kod pasa, tek su 1995 godine definisane 4 podklase imunoglobulina G i nazvane su IgG₁, IgG₂, IgG₃ i IgG₄ prema analogiji sa humanim podklasama imunoglobulina (Day i Mazza, 1995). Osnovni kriterijum za podelu je bila njihova relativna zastupljenost i elektrofretska pokretljivost (Day i Mazza, 1995). Kod ljudi i pasa koncentracija IgG podklasa je sledeća: IgG₁>IgG₂>IgG₃>IgG₄. Ka anodi migriraju IgG₂ i IgG₄, a ka katodi IgG₁ i IgG₃ (Day, 2007). Od 2007 kada je Michael Day naveo da funkcionalne karakteristike podklasa IgG kod pasa nisu definisane, pa sve do danas, situacija se nije izmenila. Naime, nepoznat je afinitet pojedinih podklasa ka proteinskim/ugljenohidratnim antigenima, mogućnosti da vežu komplement, izvedu opsonizaciju ili budu posrednici u citotoksičnom efektu. Takođe, nema direktnih dokaza koji tip imunskog odgovora (Th1/Th2), niti je jasno koji citokini favorizuju nastanak pojedinih podklasa imunoglobulina (Day, 2007). Međutim, najveći problem leži u

nedovoljno dobroj karakterizaciji specifičnosti antiseruma prema pojedinim podklasama IgG, tako da se rezultati brojnih istraživanja sa reagensima različitih proizvođača mogu donekle smatrati i upitnim (Day, 2007).

Kada se razmatra lajšmanioza pasa, jasno je da je simptomatska infekcija povezana sa visokom koncentracijom specifičnih imunoglobulina klase IgG, IgE i IgA, i da iza tog porasta leži Th2 odgovor. Na modelu miša je pokazano da postoji nespecifična poliklonska aktivacija B limfocita (Deak i sar., 2010), a sa velikom verovatnoćom se može smatrati da je odgovor kod pasa isti. U četiri od 17 radova objavljenih do 2007 godine pokazano je da kod pasa sa simptomatskom lajšmaniozom dominira IgG₁ odgovor, dok je u većini ostalih radova utvrđeno da dominira IgG₂ odgovor (Day, 2007). Međutim, ovakvi rezultati se mogu smatrati i upitnim budući da su u studijama umesto monoklonskih korišćena poliklonska antitela, koja, kao što je već rečeno, mogu biti nedovoljno specifična za pojedine klase imunoglobulina (Day, 2007). Korišćenjem monoklonskih antitela utvrđeno je da se kod pasa obolelih od lajšmanioze povećava koncentracija svih podklasa imunoglobulina, ali najmanje IgG₂ (Quinell i sar., 2003). Poslednjih nekoliko godina se slična ispitivanja nastavljaju te je definisana molekulska masa antigena koje prepoznaju IgG₁ i IgG₂ antitela kod lajšmanioze (Elmahallawy i sar., 2021). Takođe, pomoću adekvatnih monoklonskih antitela utvrđeno je da se kod biglova, eksperimentalno inficiranih *Leishmania infantum*, oko desete nedelje, javlja porast titra svih podklasa IgG, uz dominaciju IgG₁ (Olías-Molero i sar., 2020).

U studijama na miševima, pokazano je da se IgA stvara kod osetljivih sojeva i da učestvuje u formiranju imunskih kompleksa tokom infekcije *Leishmania* spp. (Perez-Aguilar i sar., 2011). Kod pasa obolelih od lajšmanioze je pokazano da je titar IgA bolji marker sistemske distribucije parazita u odnosu na IgG ili IgE (Reis i sar., 2006). Takođe je pokazano da imunske komplekse najviše stvaraju IgA antitela, što ih čini važnim faktorom u razvoju glomerulonefritisa (Aparecida de Carvalho i sar., 2021) i da se ti kompleksi javljaju kod 95% prirodno inficiranih pasa (Margarito i sar., 1998).

Bez obzira na veliki broj studija koje prepoznaju važnost humoralnog imunskog odgovora kod lajšmanioze pasa, kao i činjenicu da depozicija imunskih kompleksa dovodi do nastanka oštećenja mnogih tkiva i organa, nedostaju eksperimentalni podaci o povezanosti koncentracije imunoglobulina i reaktanata akutne faze, odnosno drugih biomolekula koji utiču na ili pokazuju izmenjenu funkciju endotela.

Enzimi: Važno je naglasiti da na disfunkciju endotelijuma mogu ukazati i neki od parametara čiji se nivo rutinski određuje. Kao primeri se navode aspartat aminotransferaza (AST), alkalna fosfatfaza (ALP) i γ -glutamil transferaza (GGT) (Goncharov i sar., 2017).

Kako je vaskulitis povezan sa inflamacijom (Guillevin i Dörner, 2017), može se pretpostaviti da ga prate promene u koncentraciji proteina akutne faze (Ceron i sar., 2018). Kod pasa sa lajšmaniozom, nezavisno od toga da li su inficirani prirodnim putem ili eksperimentalno, uočen je porast koncentracije "pozitivnih" i sniženje koncentracije

"negativnih" proteina akutne faze. Međutim, nedovoljno precizno je procenjeno u kojoj meri su opisane promene povezane sa vaskulitisom.

2.12. Terapija lajšmanioze pasa

Lečenje lajšmanioze pasa zbog složene patogeneze, širokog spektra kliničkih znakova, te teško predvidive progresije razvoja bolesti od blage do multiorganske, predstavlja izazov za doktore veterinarske medicine. Svi lekovi koji se koriste za lečenje lajšmanioze pasa inicijalno vode poreklo iz kliničkih istraživanja na ljudima, nakon kojih su oblici i doziranje prilagođeni veterinarskim zahtevima (Oliva i sar., 2010).

Ciljevi farmakoterapije lajšmanioze pasa su smanjenje količine parazita prisutnih u organizmu psa, korekcija oštećenja funkcija organa, imunomodulacija, u smislu potenciranja ćelijskog odnosno amelioracije neefikasnog, a prenatlašenog humoralnog imuniteta, poboljšanje kliničke slike, kao i sprečavanje recidiva. Prema navodima međunarodnih smernica za dijagnozu i kliničku klasifikaciju lajšmanioze (Paltrinieri i sar., 2010; Oliva i sar., 2010) odluka o započinjanju farmakoterapije zavisi od toga u kom se stadijumu oboljenja nalazi pas:

- Stadijum A (izloženi psi) – u ovoj fazi nije potrebno lečenje. Ukoliko se ipak utvrdi nizak nivo antitela, potrebno ih je serološki „pratiti” dva do četiri meseca.
- Stadijum B (inficirani psi) – potrebno je primeniti anti-lajšmanijski tretman ukoliko je došlo do povećanja nivoa antitela nekoliko nedelja nakon prve serološke analize.
- Stadijum C (bolesni psi) – psi kod kojih je izražena klinička slika te je potrebno primeniti anti-lajšmanijske lekove, a ukoliko klinička slika zahteva lečenje se može proširiti i drugim lekovima.
- Stadijum D (teško bolesni psi) – potrebno je osim anti-lajšmanijskih lekova primeniti i druge lekove u zavisnosti od toga koji su organi zahvaćeni.
- Stadijum E – psi koji nisu reagovali na lečenje kao i psi kod kojih je došlo do recidiva nakon završetka primenjenog tretmana.

Evropske konvencije po pitanju farmakoterapije lajšmanioze pasa pod „prvom“ terapijskom linijom podrazumevaju metilglukamin antimonijat u kombinaciji sa alopurinolom, dok drugu liniju činimiltefosin sa alopurinolom (Santos i sar., 2019). Osim navedenih lekova, primenjuju se i aminosidin (paromomicin), amfotericin B, pentamidin, marbofloksacin i domperidon.

Cilj delovanja metilglukamin antimonijata (sinonimi: N-metilglukamin antimoniate, metilglukamin antimonat, meglumin antimonat, glukantim) je pospešivanje fagocitne sposobnosti makrofaga i tokom prve 4 nedelje lečenja značajno redukuje količinu parazita prisutnu u organizmu psa (Manna i sar., 2015). Lečenje ovim agensom karakteriše i smanjenje nivoa specifičnih antitela u serumu, kao i do privremeno obnavljanje narušene efikasnosti imunskog odgovora. Terapijska doza je 100 mg/kg jednom dnevno tokom 4 nedelje, pri čemu je, zbog farmakokinetičkih karakteristika, preporučeno doziranje dva puta dnevno po 50 mg/kg. Kao neželjeni efekti se mogu pojaviti bol i otok na mestu aplikacije, koje može pratiti povećanje telesne temperature, kao i nespecifične gastrointestinalne tegobe poput gubitka apetita i proliva, dok su kao veoma retki zabeleženi slučajevi hroničnog pankreatitisa. Ukoliko terapija uključuje i alopurinol, navedena terapijska doza glukantima se ordinira u trajanju od 1 do 2 meseca, dok se alupurinol dozira u količini 10 mg/kg na 12 sati tokom nekoliko meseci.

Prvobitna indikacija za miltefosin (alkil-fosfoholin) je lečenje karcinoma kod ljudi, dok se sa primenom u farmakoterapiji lajšmanioze započelo kasnije počelo se sa primenom za lečenje lajšmanioze. Ovaj lek antilajšmanijska svojstva bazira na interferencijama u signalnim putevima i sintezi ćelijskih membrana, što za krajnji ishod ima smrt parazita. Terapijski režim uobičajeno traje 28 dana i uključuje dozu od 2 mg/kg telesne težine jednom dnevno. Primenom miltefosina postiže se poboljšanje kliničke slike i izraženo smanjenje opterećenje organizma parazitima. Usled čestih relapsa kliničkih manifestacija kada nakon monoterapije miltefosinom, preporuka je da se primenjuje zajedno sa alupurinolom koji se dozira na isti način kao i kada se primenjuje kao dopuna metilglukamin antimonijatu. Proliv i povraćanje se navode kao neželjeni efekti terapije miltefosinom, ali su retki i njihov intenzitet ne zahteva promene terapijskog režima (Oliva i sar., 2010).

Alopurinol predstavlja analog purina koji se kod ljudi koristi za lečenje gihta, zahvaljujući svojoj sposobnosti da inhibira ksantin oksidazu i redukuje hiperurikemiju (Yasur-Landau i sar., 2016). Paraziti roda *Leishmania* nemaju metaboličke puteve neophodne za sintezu purina, te je neophodno da ih preuzimaju od domaćina. Kada se u organizam infestiranog psa unese alopurinol, amastigoti ih usled analogije sa purinom preuzimaju iz krvi. Zatim se unutar amastigota alopurinol transformiše u 4-amino-pirazol-piramidin, koji deluje toksično. Ordinirane doze najčešće se kreću između 5 i 20 mg/kg na svakih 12 sati. Terapija može trajati između dva i 24 meseca, u zavisnosti od težine kliničke slike, stepena redukcije količine parazita u organizmu, kao i individualne tolerancije leka (Oliva i sar., 2010; Solano-Gallego i sar., 2011). Ksantinurija i urolitijaza su primeri neželjenih pojava specifičnih za dugotrajno lečenje alupurinolom (Ribeiro i sar., 2018).

Aminozidin, poznat i pod imenom paromomicin, pripadnik je grupe aminoglikozidnih antibiotika. Premda su bakterijske infekcije njegovo primarno indikaciono područje, pokazao se uspešnim i u lečenju infekcija izazvanih protozoama iz roda *Leishmania* (Fernández i sar., 2011). Antilajšmanijske efekte ostvaruje putem nekoliko mehanizama – izaziva promene u propustljivosti membrane, interferira u molekularnim mehanizmima

koji se odvijaju na ribozomima, te uzrokuje oštećenja mitohondrija (Roatt i sar., 2014). U svrhu lečenja lajšmanioze pasa koristi se zajedno sa meglumin antimonatom. Najčešće terapijski režim kombinuje 5 mg/kg, aminozidina supkutano, jednom dnevno, tokom tri nedelje, sa 60 mg/kg meglumin antimonatom intramuskularno, na 12 sati tokom mesec nedelje (Oliva i sar., 2010). Iako se postižu poboljšanja u kliničkoj slici i smanjenju nivoa antitela, najčešće je upitan efekat na smanjenje parazitarog opterećenja organizma. Najčešći neželjeni efekti su ototoksičnost i poremećaji funkcija jetre (Roatt i sar., 2014).

Osobina amfotericina B, standardnog agensa u lečenju gljivičnih infekcija, da deluje tako što se vezuje na sterole prisutne u membranama gljivičnih ćelija, iskorišćena je i u terapiji lajšmanioze pasa. Ligand za amfotericin B je ergosterol prisutan u membrani lajšmanije, a nakon vezivanja leka menja se propustljivost ćelijske membrane parazita, što za krajnju posledicu ima smrt ćelije (Ordóñez-Gutiérrez i sar., 2007). Primenjuje se intravenski, rastvoren u fiziološkom rastvoru uz dodatak sojinog ulja kao emulgatora. Cena i složena priprema su glavni ograničavajući faktori za rutinsku primenu (Oliva i sar., 2010). Takođe, terapija amfotericinom B se povezuje sa vazokonstrikcijom u bubrezima, te posledičnim smanjenjem glomerulske filtracije koje može progredirati ka brubrežnoj insuficijenciji, hipokalijemiji i azotemiji. Radi preveniranje ovako teških neželjenih efekata neophodno je pažljivo praćenje bubrežnih funkcija tokom terapije (Fernández i sar., 2015).

Pentamidin je aromatični diamidin, a koristio se kao druga linija za lečenje humane lajšmanioze. Njegov precizan način delovanja nije do kraja objašnjen. Anti – lajšmanijsko delovanje se ispoljava uticajem na biosintezu poliamina i potencijal mitohondrijske membrane. Za lečenje pasa primenjivao se tokom osamdesetih godina prošlog veka. Iako je primećeno poboljšanje kod lečenih pasa, tokom primene leka uočene su nuspojave kao što su prolivi, povraćanje, hipersalivacija, sistemska hipotenzija i anafilaktički šok (Oliva i sar., 2010).

Marbofloksacin pripada grupi sintetičkih fluorohinolona treće generacije i obično se primenjuje u lečenju gram-pozitivnih i gram-negativni bakterijskih infekcija. Marbofloksacin inhibira bakterijski enzim DNK-girazu. Primećeno je da ukoliko se primenjuje u dozi od 2 mg/kg peroralno, tokom 28 dana dolazi do poboljšanja kliničke slike kod lajšmanioze pasa (Oliva i sar., 2010).

Domperidon se u humanoj medicini koristi kao antiemetik, gastro-kinetički lek ili za povećanje proizvodnje mleka. U veterinarskoj medicini bi se mogao koristiti kao želučani prokinetički lek, čije je sekundarno dejstvo povećanje nivoa prolaktina u serumu. Prolaktin se luči iz hipofize i stvara u limfocitima, a smatra se proinflamatornim citokinom. Stimuliše ćelijski imunitet (Th1) povećanjem proizvodnje INF- γ , IL2, IL12 i TNF- α . Imunoterapija je održiv pristup lečenju bolesnih pasa jer je ćelijski imunitet glavni obrambeni mehanizam protiv *L. infantum* (Travi i Miro, 2018). Domperidon je antagonist dopaminskog D2 receptora za koji se pokazalo da pojačava urođeni ćelijski posredovan imuni odgovor. Aktivnost domperidona kao leka protiv lajšmanije

najverovatnije se odvija kroz stimulativni učinak na imunološki odgovor posredovan Th1+ ćelijama koje utiču na progresiju bolesti (Sabaté i sar., 2014). Ispitivanja su pokazala da primenjen u dozi od 1 mg/kg, svakih 12 sati tokom mesec dana dovodi do smanjenja titra antitela i kliničkih znakova kod većine lečenih pasa, a da pri tom nije bilo nuspojava (Oliva i sar., 2010).

Na poboljšanje i efikasnost lečenja utiču i nova saznanja o odnosima domaćina i parazita te o različitim imunološkim odgovorima domaćina. Naučnici istraživanja baziraju na novim formulacijama postojećih lekova ili povezivanjem sa imunostimulansima i imunoterapeuticima, a rezultati ukazuju da bi moglo doći do poboljšanja lečenja u budućnosti (Ribeiro i sar., 2018).

2.13. Kontrola i prevencija

Kompleksne (pat)biološke interakcije unutar lanca parazit–vektor (peščana mušica)–ljudski ili životinjski rezervoar čine veoma izazovnim aktivnosti na kontroli i prevenciji ove infekcije. Njihove strategije bazirane su na ranoj dijagnostici i efikasnom lečenju, te kontrola vektora i domaćina rezervoara, uz nezaobilazno učešće šire društvene zajednice (WHO 3).

Imajući u vidu činjenicu da je za parazite iz roda *Leishmania* vektorski put infestacije ključan, najveća efikasnost se može očekivati od mera kontrole fokusiranih na sprečavanje kontakta sa peščanim mušicama (Ribeiro i sar., 2018). Tehnike kontrole mogu biti primena insekticida direktno na psima, korišćenje insekticidima tretiranih zaštitnih mreža, korišćenje lične zaštitne opreme i slično (WHO 3). Insekticidi koji su se našli primenu u prevenciji su sintetički piretroidi, permetrin ili deltametrin. Tokom primene okovratnika impregniranih deltametrimom insekticid se oslobađa i deponuje u potkožnom masnom tkivu, odakle se tokom narednih desetak dana postepeno otpušta u sistemsku cirkulaciju. Alternativno, insekticidi se mogu primeniti i kao prašak odnosno sprej, no iako su efekti trenutni odnosno snažni, nedostatak predstavlja njihovo kraće trajanje. Ukoliko je planirano da pas određeno vreme boravi u endemičnom području, primena insekticida je preporučljiva pre, tokom, i nakon boravka. Relativno jednostavna preventivna mera je da u sezoni kada su peščane mušice aktivne, psi budu u zatvornom od ranih večernjih do ranih jutarnjih časova. Takođe, preventivne aktivnosti postaju efikasnije i kada se preduzmu mere za uklanjanje mikrostaništa pšeničnih mušica držanje pasa u zatvorenom prostoru od sumraka do zore tokom sezone peščanih mušica, i uklanjanje mikrostaništa pogodnih za peščane mušice, kao što su gomile drva i kamenja na mestima gde psi borave (Solano-Gallego i sar., 2011). Zapašivanje prostora insekticidima je nije opravdano primenjivati s obzirom na razlike u osetljivosti između vrste peščane mušice, kao i teškoća u otkrivanju njihovih staništa (Otranto i sar., 2013).

Vakcinacija može doneti ohrabrujući napredak u kontroli lajšmanioze pasa. Njome se postiže smanjenje verovatnoće oboljevanja kod pasa, te potencira specifičan i trajan imunitet koji suštinski usporava dalje razmnožavanje i širenje parazita, te i same lajšmanioze (Moreno, 2019). Zbog specifičnosti samog parazita, ali složenih puteva

prenosa, bilo je posebno izabrati antigen zadovoljavajuće imunogenosti, ali i ukombinovati ga sa odgovarajućim adjuvansom. Uspešnost vakcina baziranih na oslabljenim promastigotima je bila nezadovoljavajuća, te je bilo neophodno razviti vakcine „druge generacije“ koje su koristile „cele“ parazite ili njihove ekskretorne-sekretorne (ES) produkte (Otranto i sar., 2013).

Do danas su odobrene 3 vakcine, jedna u Brazilu i dve u Evropi:

- *Leish-Tec*[®] (Hertape Calier, Brazil), bazirana na rekombinantnom proteinu A2, sa saponinom kao pomoćnom komponentom,
- *Canileish*[®] (Virbac, Francuska), napravljena sa ES antigenima *Leishmania infantum*, i QA-21 kao pomoćnom komponentom, i
- *Letifend*[®] (Laboratorios Leti, Španija), napravljena na temelju fuzijskog proteina Q, bez adjuvansa.

Vakcinisane životinje je neophodno pratiti klinički, serološki i parazitološki, kako bi se procenila efikasnost vakcinacije, ali i detektovali promene u „imunokompetentnosti“ po pitanju parazita iz roda *Leishmania*. Upotreba sve tri vakcine pokazala je sličnu uspešnost od 68 do 72% i zaštitu između 92 i 98 % (Moreno, 2019).

U mnogim zemljama koje su endemske za lajšmaniozu postojale su inicijative da se u cilju kontrole bolesti primenjuje eutanazija zaraženih pasa (Travi i sar., 2018). Međutim, one nisu naišle na naučnu podršku iz nekoliko razloga. Prvi je odsustvo naučnih dokaza koji govore u prilog ovakvom načinu smanjenja zaraze. Takođe, epizootiološki podaci govore da psi nisu jedini domaćini/rezervoari u životnom ciklusu lajšmanija. Osim toga, relativno brzo odstranjeni psi mogu biti zamenjeni mladim psima koje može karakterisati veća osetljivost na infekciju. Vrlo velika zabrinutost može se pripisati i eventualnim greškama prilikom selekcije pasa, povezanih sa osetljivošću i specifičnošću seroloških analiza. Ne treba zaboraviti ni socio-ekonomski aspekt, efekat na vlasnike pasa i cenu preparata za eutanaziju (Dantas-Torres i sar., 2019). Zbog navedenih činjenica u tim regionima su inicijative za eutanaziju zamenjene strategijama koje kombinuju vakcinaciju i primenu insekticida (Ribeiro i sar., 2018).

3. CILJ I ZADACI

Lajšmanioza je jedna od najtežih zoonoza, čija se prevalenca i kod ljudi i kod pasa sve više povećava uprkos višegodišnjoj primeni različitih terapijskih i preventivnih mera. U endemičnim područjima psi su rezervoar parazita koji predstavlja veliku pretnju po zdravlje ljudi. Najveći problem predstavljaju latentno inficirani psi koji ne ispoljavaju jasne znake bolesti, čime je višestruko otežano njihovo rano otkrivanje, i pravovremeno zbrinjavanje ili uklanjanje iz ambijenta kako bi se sprečio kontakt sa vektorima-peščanim mušicama. Potrebno je bolje poznavanje patogeneze, posebno mehanizama odgovornih za eliminaciju parazita iz organizma, odnosno na vrstu i efikasnost odgovara domaćina na primenjenu terapiju.

Premda je kod pacijenata sa kutanom i visceralnom lajšmaniozom potvrđena pojava vaskulitisa, disfunkcija endotela nije detaljnije ispitana. U cilju boljeg poznavanja mehanizma endotelne oštećenja kod pasa sa klinički manifestnom lajšmaniozom i uloge pojedinih markera inflamacije i oštećenja endotela, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Kod pasa koji su na osnovu kliničke slike i/ili boravka u endemičnom području pod sumnjom na infekciju sa *Lieshmania* spp., registrovati kliničke znake i prikupiti dijagnostičke serološke, hematološke i biohemijske nalaze, odnosno anamnestičke podatke o lečenju kombinacijom miltefosina, alopurinola i vitamina B kompleksa.
2. U višku seruma prikupljenog za napred navedena laboratorijska ispitivanja odrediti nivoe:
 - proteina akutne faze: serum amiloida A, ceruloplazmina, haptoglobina i paraoksonaze-1.
 - molekula koji utiču na ili odslikavaju funkciju endotela: zimogene i aktivne forme matriks-metaloproteinaza-2 i -9, homocisteina i imunoglobulina A.
3. Na osnovu kliničkih nalaza i nivoa antitela protiv *Lieshmania* spp. podeliti pse u sledeće grupe:
 - nelečeni psi sa umerenom formom bolesti.
 - lečeni psi sa umerenom formom bolesti.
 - psi sa blagom formom bolesti.
4. Uporediti između grupa vrednosti seroloških, hematoloških i biohemijskih parametara, nivoe proteina akutne faze i molekula koji utiču na ili odslikavaju funkciju endotela.
5. Ispitati korelaciju između vrednosti pokazatelja akutne faze inflamacije i endotelne oštećenja kod tri grupe pasa, te proceniti značaj endotelne oštećenja kod pasa sa lajšmaniozom.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Životinje, kriterijumi za dijagnostiku lajšmanioze i eksperimentalne grupe

Ispitivanje je obavljeno u privremenom prihvatilištu za pse lualice Udruženja za zaštitu životinja i prirode „Sunčani sat“ iz Bara, Republika Crna Gora, i to u periodu od novembra do decembra, kada vektor, peščana mušica, nije aktivan. Prihvatilište se nalazi u rubnom delu prigradskog naselja Paladini, na nadmorskoj visini od 250 metara. Svi psi su bili slobodni, u ograđenom prostoru od 2500 m² podeljenom na nekoliko sektora, u kojima su psi odvajani u zavisnosti od ponašanja i veličine. U navedenim prostorima su se nalazile drvene kućice sa posudama za vodu i hranu. Za piće je korišćena voda sa obližnjeg planinskog izvora, a za ishranu industrijske granule, uz nekoliko obroka od kuvanih kostiju, testenine i pirinča nedeljno. Zdravstvenu zaštitu pasa je vršila lokalna veterinarska služba. Svi psi su periodično podvrgavani dehelmintizaciji i vakcinaciji protiv besnila odnosno drugih zaraznih bolesti. Takođe, većina pasa je bila sterilisana.

Ispitivanje je obavljeno tako što su prikupljeni anamnestički podaci vezani za terapiju, a zatim i podaci o kliničkoj odnosno serološkoj dijagnostici lajšmanioze. Od diskretnih znakova bolesti bili su prisutni gubitak sjaja dlake, perutanje kože, ranice po telu i ređa dlaka. Takođe, uočavani su i ozbiljniji znaci poput kaheksije, blefarokonjunktivitisa, onihogrifoze, alopecije, epistakse, atrofije muskulature i otoka limfnih čvorova.

Koristeći se međunarodnim kriterijumima za određivanje kliničkog stadijuma lajšmanioze (Solano-Gallego i sar., 2009) formirane su tri grupe pasa:

- Grupa sa umerenom formom bolesti bez terapije. Kod pasa se uočavala periferna limfadenopatija, papularni dermatitis, ekfolijativni dermatitis, onihogrifoza, ulceracije, anoreksija, gubitak u težini, groznica i epistaksa. Nivo antitela na *Leishmania* spp. je bio umereno povišen;
- Grupa sa umerenom formom bolesti sa terapijom. Psi su imali slične kliničke i serološke nalaze kao u prethodnoj grupi. Međutim, tokom tri nedelje su dobijali jednom dnevno terapiju u kojoj su kombinovani miltefosin (2 mg/kg dnevno, *per os*), alopurinol (10 mg/kg, *per os* na 12 sati), i komercijalni dodatak ishrani koji je sadržao kompleks B vitamina (Anima Strath[®], Bio-Strath, Switzerland);
- Grupa sa blagom formom bolesti. Kod pasa su bili prisutni diskretniji znaci praćeni niskim nivoom antitela na *Leishmania* spp.

Za ispitivanja na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (FVMUB) i Centru za medicinsku biohemiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (CMB UKCS), Etička komisija za zaštitu dobrobiti ogleđnih životinja na FVMUB donela je odluku (broj 01/2021) da se u istraživačke svrhe može koristiti višak biološkog materijala prikupljen u svrhe dijagnostike i praćenja zdravstvenog stanja pacijenta.

4.2. Uzorkovanje krvi za dijagnostičke testove

Nakon punkcije *v. cephalica antebrachii* uzorci su prikupljeni u dve epruvete, jednu sa EDTA kao antikoagulantom i drugu bez ikakvih dodataka. Uzorak sa EDTA je poslužio za hematološka ispitivanja. Nakon koagulacije krvi, epruveta bez dodataka je centrifugirana 15 minuta na 1500 g kako bi se izdvojio serum, i u njemu odredili nivoi antitela na *Leishmania* spp. i osnovnih biohemijskih parametara. Pomenuta laboratorijska ispitivanja urađena su u Veterinarskoj ambulanti Popović u Baru, Republika Crna Gora. Preostale količine seruma su zamrznute na -20°C te dostavljene Laboratoriji za eksperimentalnu biohemiju FVMUB i CMB UKCS.

4.3. Hematološka ispitivanja

Hematološka ispitivanja su uključila broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, prosečnu zapreminu eritrocita (eng. *mean corpuscular volume* (MCV)), prosečnu koncentraciju hemoglobina u eritrocitu (eng. *hemoglobin concentration per red blood cell* (MCHC)), broj leukocita, leukocitnu formulu i broj trombocita. Za analizu je korišćen hematološki analizator BC 2800® (Mindray Ltd, UK).

4.4. Određivanje nivoa antitela protiv *Leishmania* spp. u serumu

Nivo IgG protiv *Leishmania* spp. testiran je komercijalnim *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) paketom reagenasa proizvođača NovaTec Immundiagnostica GmbH, Germany. Princip testa se zasnivao na stvaranju kompleksa između antigena *Leishmania* spp. kojima su bila obložena udubljenja na polistirenskoj mikrotitatskoj pločici i specifičnih IgG iz seruma psa. Nakon ispiranja, u udubljenja su dodavana sekundarna antitela obložena peroksidazom, koja su se specifično vezivala na IgG u kompleksu sa antigenom.

Ovako stvoreni trokomponentni kompleksi su zatim vizualizirani dodatkom rastvora tetrametilbenzidina, koji je u reakciji katalizovanoj peroksidazom prelazio u žuto obojeni proizvod. Intenzitet obojenja je bio direktno proporcionalan koncentraciji IgG protiv *Leishmania* spp. koja je zatim određivana korišćenjem kalibracione jednačine. Prilikom analize korišćeni su inkubator NeoMedica NEI 1925®, washer Mindray MW 12A® i čitač Rayto RT-6100®.

4.5. Određivanje osnovnih biohemijskih parametara u serumu

U uzorcima seruma određeni su sledeći osnovni biohemijski parametri urea, kreatinin, ukupni proteini, albumin, holesterol, trigliceridi, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza (ALP) i gama-glutamil transferaza (GGT). Parametri su analizirani spektrofotometrijskim metodama, korišćenjem komercijalnih test paketa (BioSystems S.A., Spain) na analizatoru BA-88A Semi-Auto Chemistry Analyzer® (Mindray, China).

4.6. Određivanje koncentracije serum amiloida A u serumu

Koncentracija SAA je određivana komercijalnim ELISA paketom reagenasa proizvođača Abcam, UK. Princip analize se zasnivao na tzv. “sendvič” tehnici tj. stvaranju kompleksa između: antitela specifičnih na pseći SAA, koja su bila adsorbovana na udubljenja polistirenske mikrotitarske pločice, molekula SAA iz seruma, i još jedne vrste antitela specifičnih na pseći SAA, koja su bila obeležena peroksidazom, a u udubljenja su dodavana kao rastvor. Dodavanjem benzidinskog derivata i delovanjem peroksidaze formirao se kompleks žute boje, čiji je intenzitet bio direktno proporcionalan količini SAA u serumu. Intenzitet obojenja je očitavan na ELISA čitaču (Elx800[®], Biotek), a koncentracija SAA izračunavana na osnovu kalibracione jednačine.

4.7. Određivanje koncentracije ceruloplazmina, haptoglobina i aktivnosti paraoksonaze-1 u serumu

Koncentracija CER je određena metodom zasnovanom na njegovom oksidaznom delovanju na p-fenilendiamin i nastanku jedinjenja čiji je intenzitet obojenja direktno proporcionalan koncentraciji CER u serumu. Apsorbancija je merena spektrofotometrijski na instrumentu Cecil 2021 2000 series[®] (Cecil Instrumentation Services Limited, Velika Britanija), a koncentracija CER izračunavana pomoću kalibracionog faktora (Janjić, 2021; Spariosu, 2022).

Koncentracija HPT u serumu je merena standardizovanom metodom zasnovanoj na peroksidaznoj aktivnosti kompleksa hemoglobina i haptoglobina, zahvaljujući kojoj je po dodatku gvajakola i vodonik peroksida dolazilo do stvaranja obojenog kompleksa, čija je apsorbancija merena korišćenjem spektrofotometra Cecil 2021 2000 series[®] (Cecil Instrumentation Services Limited, Velika Britanija). Nakon toga je iz jednačine standardne krive izračunata koncentracija HPT (Janjić, 2021; Spariosu, 2022).

Prilikom određivanja serumske aktivnosti PON-1 korišćen je 4-nitrofenil acetata kao supstrat. Intenzitet obojenja nastalog proizvoda, 4-nitrofenola, meren je spektrofotometrijski (Cecil 2021 2000 series[®], Cecil Instrumentation Services Limited, Velika Britanija), a aktivnost izračunavana preko molarnog apsorpcionog koeficijenta (Janjić, 2021; Spariosu, 2022).

4.8. Elektroforeza proteina seruma na agaroznom gelu

Gelovi za elektroforezu pripremani su kao 1% rastvor agaroze u razblaženom barbituratnom puferu (pH 8,6). Uzroci razređeni fiziološkim rastvorom su postavljeni na gel, te je usledilo 45 minutno horizontalno razdvajanje u SAS-MX[®] kadici (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) ispunjenoj barbiturnim puferom, uz korišćenje napona od 80V. Nakon toga gelovi su sušeni na 60°C, obojeni sa *Comassie brilliant blue* (CBB) i odbojavani u smeši metanola, sirćetne kiseline i vode, skenirani, i denzitometrisani pomoću TotalLab TL120[®] software-a. Koncentracije α_1 , α_2 , β , i γ globulinskih frakcija dobijene su množenjem denzitometrijske površine frakcije i koncentracije ukupnih proteina (Janjić, 2021; Spariosu, 2022).

4.9. Određivanje matriks-metaloproteinaza-2 i -9 u serumu

Za analizu nivoa zimogenih i aktivnih MMP-2 i -9 korišćena je tehnika zimografije nakon vertikalne elektrofореze na 8% poliakrilamidni gel sa dodatkom 2% želatina. Zajedno sa uzorcima na gelove su postavljani Perfect™ Color Protein Ladder (EurX, Gdańsk, Poland), kako bi se procenila molekulska masa proteina korišćen je, i 10% rastvor seruma teleta, kao pozitivna kontrola. Za razdvajanje je primenjivan napon od 80V u trajanju od 15 minuta, nakon čega je povećan na 120V i državan na toj vrednosti jedan sat. Nakon elektrofореze gelovi su inkubirani u puferu (10 mM CaCl₂, 50 mM Tris, pH 7,5–8,0) koji je omogućio optimalne uslove za želatinolitičko delovanje ispitivanih matriks-metaloproteinaza. Nakon inkubacije i bojenja sa CBB, gelovi su odbojavani u smeši metanola, sirćetne kiseline i vode do pojave jasnih belih traka na plavo obojenoj pozadini gela. Nakon skeniranja, intenzitet traka je izmeren denzitometrijski (TotalLab TL120® software) te izražena kao relativna vrednost nakon normalizovanja prema aktivnosti pozitivne kontrole, koja je uzeta za jediničnu (Spariosu, 2022).

4.10. Određivanje koncentracije homocisteina u serumu

Koncentracija homocisteina (Hcy) u serumu određivana je jednostepenom hemiluminiscentnim imunoodređivanjem na mikročesticama. Nakon redukcije S-adenozil-Lhomocistein hidrolaza prevodi Hcy u S-adenozil homocistein, koji se sa svojim akridinijumom obeleženim analogom "takmiči" za reakciju sa monoklonskim antitelom mikročestice. Prisustvo akridinijuma omogućava stvaranje jedinjenja sa hemiluminiscentnim svojstvima u završnoj fazi. Izmereni nivo hemiluminiscencije obrnuto je srazmeran nivou Hcy. Za analizu je upotrebljen komercijalni paket reagenasa (Abbott Diagnostics, Germany) na analizatoru ARCHITECT® ci8200 Integrated System (Beletić, 2014).

4.11. Određivanje imunoglobulina A u serumu

Nivo imunoglobulina A (IgA) određivan je u serumu Western blot metodom. Nakon razblaženja dvadeset puta sa fiziološkim rastvorom, uzorci su duplo razblaženi puferom (125 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,02% bromfenol plavo, 10% betamerkapto-etanol), tako da je u finalnoj zapremini bilo 10 µg proteina. Nakon zagrevanja pet minuta na 95°C usledilo je razdvajanje proteina metodom vertikalne elektrofореze na 10% gelu poliakrilamida, uz korišćenje komercijalnog obojeni markera molekulske masa (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Korišćenjem instrumenta Trans-Blot Turbo Transfer System® (Biorad, California, USA) razdvojeni proteini su "preneti" sa gela na poliviniliden-difluoridnu membranu, sa prečnikom pora od 0,4 µm. Membrana je zatim inkubirana sat vremena u puferu za "blokiranje" (Tris-Buffered Saline, TBS, 0,1% Tween 20) sa dodatkom 5% humanog albumina. Odgovarajuće poliklonsko primarno antitelo specifično za IgA psa (Goat anti-Canine IgA Heavy Chain, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) je rastvoreno u odnosu 1:500 sa 0,1% TBS-Tween-om, sa dodatkom 3% humanog albumina. Zatim je membrana inkubirana i ovom rastvoru preko noći, na 4°C, i

uz konstantno mešanje. Potom je isprana u 0,3% TBS-Tween-u tri puta po 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Rastvor sekundarnog antitela napravljen je u odnosu 1:20000 i membrana je u njemu inkubirana dva sata, na sobnoj temperaturi i pri konstantnom mešanju. Nakon ponovljenog ispiranja, dodat je hemiluminiscentni reagens te je membrana skenirana na instrumentu ChemiDoc™ Imaging System (Biorad). Jačina signala određena je u programu TotalLab TL120 software®, normiranjem u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina u serumu.

4.12. Određivanje koncentracije tiola u serumu

Serumske koncentracije tiola određivane su metodom zasnovanoj na reakciji alifatičnih tiola sa 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoevom kiselinom u kojoj nastaje 1 mol p-nitrofenolnog anjona po 1 molu tiola. Intenzitet žutog obojenja nastalog anjona merena je spektrofotometrijski, a koncentracija ukupnih tiola je izračunavana korišćenjem molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola (Spariosu, 2022).

4.13. Statistička obrada rezultata

Za statističku analizu korišćen je komercijalni statistički programski paket MedCalc®. Korišćene su metode deskriptivne statistike, χ^2 test, Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, Sperman-ova korelaciona, kao i multipla regresiona analiza.

5. REZULTATI

5.1. Anamnestički, klinički i serološki podaci ispitivanih grupa

Pedeset pasa uključenih u studiju je na osnovu kliničkih nalaza i nivoa antitela na *Leishmania* spp., te podataka o terapiji bilo podeljeno u tri grupe: prvu grupu sačinjavalo je 17 pasa sa umerenom formom lajšmanioze bez terapije, u drugoj je bilo devet pasa u umerenom stadijumu lajšmanioze koji su dobijali terapiju, dok je u treću grupu svrstano 24 psa kod kojih je bila prisutna blaga forma oboljenja. U studiju je ukupno bilo uključeno 28 mužjaka i 26 ženki. U prvoj grupi je bilo 10 mužjaka i sedam ženki, u drugoj četiri mužjaka i pet ženki, a u trećoj 14 mužjaka i 10 ženki. Ovakva raspodela nije ukazivala na razliku između grupa ($P=0,742$). Generalno posmatrano, psi su bili stari od 1 do 12 godina. Međutim činjenica da su polovina od njih bili lualice onemogućila je preciznu procenu starosti, a samim tim i njeno poređenje između tri ispitivane grupe. Izraženiji znaci bolesti, pre svega kaheksija, onihogrifoza i promene na koži, prvenstveno su uočeni kod starijih pasa. U grupi pasa sa nižim ili graničnim titrom antitela na *Leishmania* spp. i diskretnijim kliničkim znacima, mahom su bili mlađi psi i štenad. Među ispitivanim psima 28 su bili mešanci, a rasna struktura preostala 22 psa prikazana je u Tabeli 3.

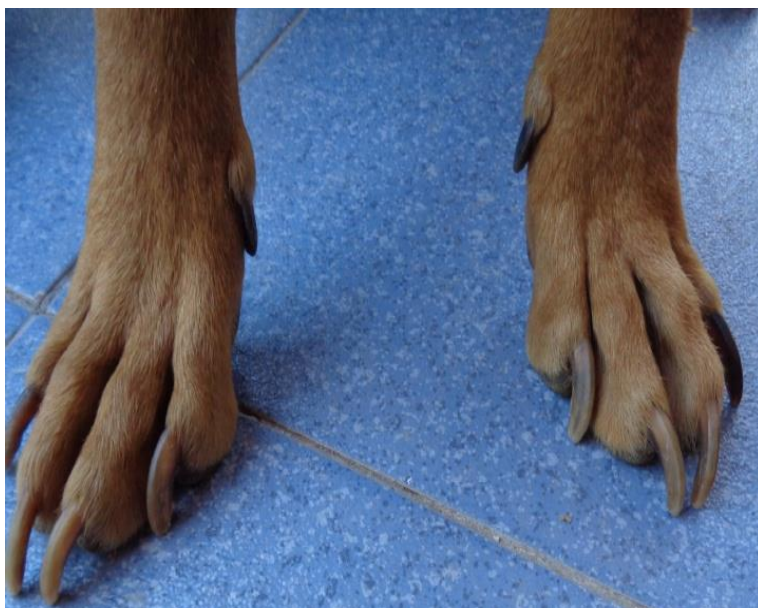
Tabela 3. Rasna struktura pasa sa lajšmaniozom.

Rasa	Broj	Rasa	Broj
Srpski gonič	5	Pit bul terijer	1
Posavski gonič	4	Jazavičar	1
Bretonac	2	Grifon	1
Bokser	1	Šarpej	1
Srpski trobojni gonič	1	Nemački ovčar	1
Cene corso	1	Pinč	1
Engleski seter	1	Američki stafordski terijer	1

Mešanci i rasni psi su bili podjednako zastupljeni u tri formirane grupe: u prvoj je bilo 10 mešanaca i sedam rasnih, u drugoj četiri mešanca i pet rasnih, te u trećoj 12 mešanaca i 10 rasnih ($P=0,742$).

Manje popularne lezije, prisutne kod 11 pasa, su bile jedini uočljiv znak u grupi sa blagom formom bolesti. Kod pasa u umerenom stadijumu, najčešće su se uočavale onihogrifoza (slika 8) i ulceracije na koži ili sluzokoži (slika 9). Dodatno, klinički nalazi su obuhvatali različite promene na koži (slika 10) i u predelu očiju (slika 11), te i kaheksiju (slika 12). Takođe, kada su u pitanju bili psi sa umerenom formom bolesti, u pogledu učestalosti pojedinačnih kliničkih znakova (tabela 4) nije bilo razlike između grupe koja je dobijala terapiju i one koja nije ($P=0,261$). Kod više od polovine pasa sa umerenom formom bolesti bila su prisutna dva klinička znaka koji su upućivali na lajšmaniozu (Tabela 4), a

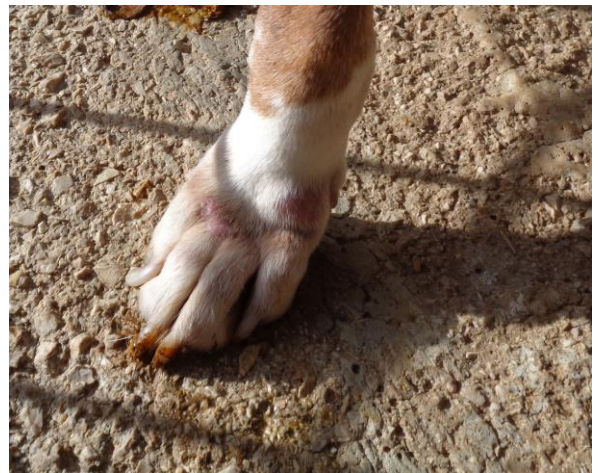
po pitanju ukupnog broja simptoma prisutnih kod pojedinačnog psa, takođe nije bilo razlike povezane sa davanjem terapije ($P=0,404$).



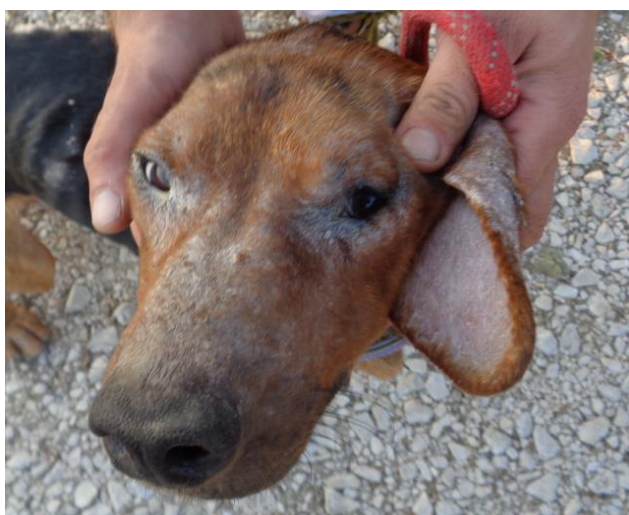
Slika 8. Nalaz onihogrifoze kod ispitivanih pasa sa umerenom formom lajšmanioze.



Slika 9. Nalaz ulceracija na koži kod ispitivanih pasa sa umerenom formom lajšmanioze.



Slika 10. Nalaz promena na koži kod ispitivanih pasa sa umerenom formom lajšmanioze.



Slika 11. Nalaz promena u predelu očiju kod ispitivanih pasa sa umerenom formom lajšmanioze.

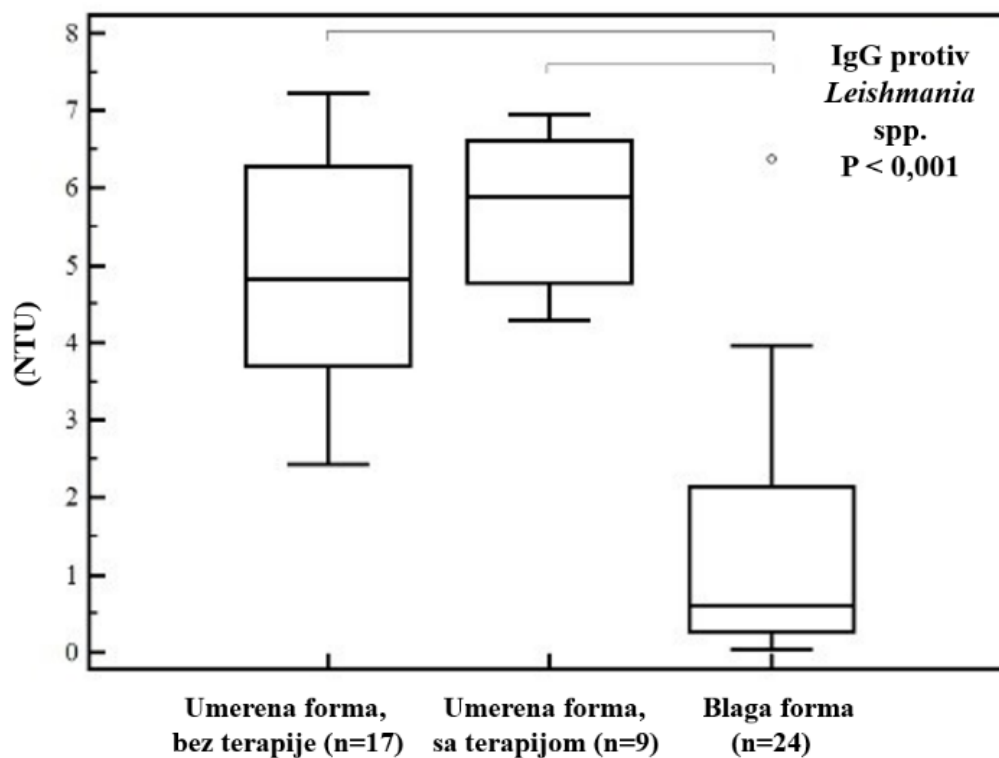


Slika 12. Kaheksija kod ispitivanog pasa sa umerenom formom lajšmanioze

Tabela 4. Učestalost kliničkih znakova kod pasa sa umerenom formom lajšmanioze

	Terapija	
	Da (N=9)	Ne (N=17)
Pojedinačni znakovi		
Eksfolijativni dermatitis	3	8
Onihogrifoza	6	14
Ulceracije	5	10
Epistaksa	3	1
Gubitak težine	4	3
Anoreksija	3	7
Ukupan broj znakova		
Jedan	1	1
Dva	4	8
Tri	1	6
Četiri	3	2

Koncentracija specifičnih IgG antitela protiv *Leishmania* spp. je takođe bila veća kod pasa sa umerenim kliničkim znacima, bez obzira da li su dobijali terapiju, (grupe 1 i 2), u poređenju sa trećom grupom tj. psima koji su ispoljavali blagu kliničku sliku (Grafikon 1).



Grafikon 1. Koncentracija IgG protiv *Leishmania* spp. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika. Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom.

5.2. Rezultati hematoloških i osnovnih biohemijskih analiza

Rezultati hematoloških analiza kod pasa uključenih u studiju prikazani su u Tabeli 5. Kod 27 pasa bio je prisutan veći ili manji stepen anemije, pri čemu je kod pet registrovan težak oblik anemije sa hematokritskom vrednošću manjom od 20%. Vrednosti hematokrita i leukocita su bile više kod pasa sa blagom formom lajšmanijaze u odnosu na obe grupe u koje su svrstani psi sa umerenom kliničkom formom bolesti.

Tabela 5. Vrednosti hematoloških parametara kod pasa uključenih u studiju.

Parametar (jedinica)	Referentni opseg	Klinička forma (medijana (min–max))			P**
		Umerena bez terapije	Umerena sa terapijom	Blaga	
Eritrociti (10 ¹² /L)	5,5–8,5	5,1 (2,3–6,3) ¹⁷	4,1 (1,7–6,5) ⁹	5,6 (4,1–6,5) ¹⁸	0,065
Hemoglobin (g/L)	120–180	128 (54–219) ¹⁷	118 (40–203) ⁹	149 (111–194) ¹⁸	0,082
Hematokrit (%)	37–55	33 (16–43) ¹⁷	26 (12–41) ⁹	37 (29–45) ¹⁸	0,042 [†]
MCV (fL)	60–77	73 (66–78) ¹⁷	70 (62–81) ⁹	73 (69–77) ¹⁸	0,389
MCHC (g/L)	370–410	393 (314–553) ¹⁷	368 (280–491) ⁹	406 (331–456) ¹⁸	0,557
Leukociti (10 ⁹ /L)	6–17	11,0 (3,4–20,3) ¹⁷	10,7 (7,0–25,3) ⁹	14,7 (6,9–25,2) ¹⁸	0,021 [†]
Neutrofili (10 ⁹ /L)	3–12	6,4 (1,6–14,1) ¹⁷	7,3 (3,1–18,0) ⁹	7,9 (3,5–15,2) ¹⁸	0,085
Limfociti (10 ⁹ /L)	1–4,8	0,5 (0,1–6,1) ¹⁷	3,0 (0,1–7,6) ⁹	0,8 (0,3–2,7) ¹⁸	0,634
MID (10 ⁹ /L)	0,2–1,5	2,9 (0,1–7,3) ¹⁷	0,3 (0,1–7,3) ⁹	5,3 (0,1–10,6) ¹⁸	0,055
Trombociti (10 ⁹ /L)	200–500	391 (248–618) ¹⁷	400 (202–863) ⁹	423 (224–868) ¹⁸	0,828

Skraćenice: MCV – prosečna zapremina eritrocita (eng. mean corpuscular volume); MCHC –prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (eng. hemoglobin concentration per red blood cel); MID – ćelije srednje veličine (monociti i deo eozinofila). **Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, P < 0,05 se smatra značajnom; †P<0,05 za blagu formu u odnosu na druge dve forme. Broj u superskriptu (italik) predstavlja broj analiziranih uzoraka.

Rezultati osnovnih biohemijskih analiza kod pasa uključenih u studiju prikazani su u Tabeli 6. Obe grupe pasa sa umerenom formom bolesti imale su veće vrednosti uree i kreatinina u odnosu na pse sa blagom formom. Slično se uočava i za koncentraciju ukupnih proteina, a obrnuto za nivo albumina. Psi sa umerenom formom bolesti, bez obzira da li su dobijali terapiji, pokazivali su veće vrednosti ALT nego psi sa blagom formom. Kada je nivo AST u pitanju, u grupi pasa sa umerenom formom koji su dobijali

terapiju zabeležene su više vrednosti u odnosu na grupu sa blagim oblikom. Takođe, u istoj grupi su izmerene i više vrednosti triglicerida u odnosu na druge dve grupe.

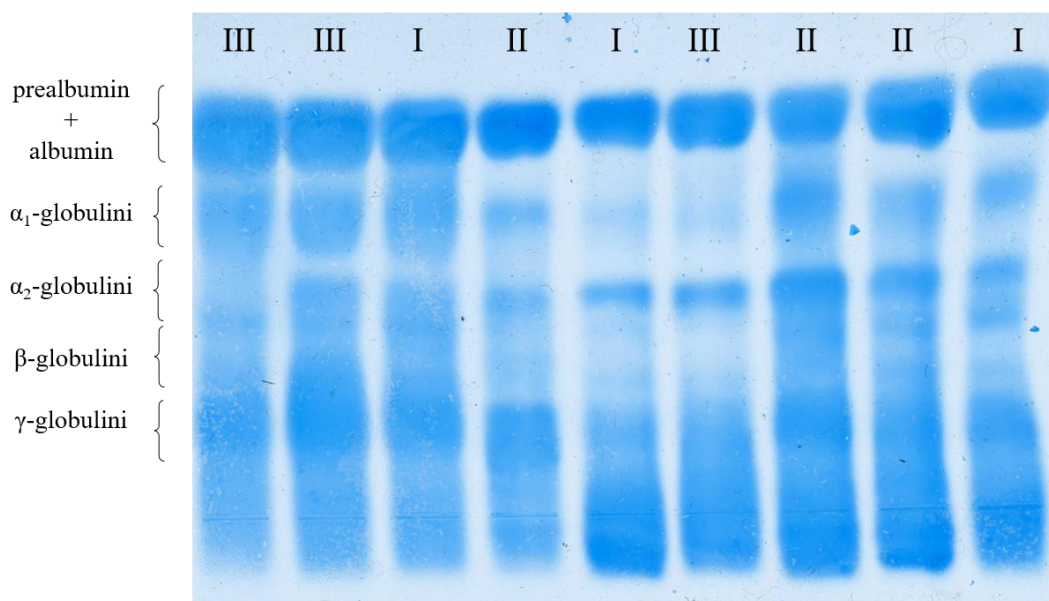
Tabela 6. Vrednosti biohemijskih parametara kod pasa uključenih u studiju.

Parametar (jedinica)	Referentni opseg	Klinička forma (medijana (min–max))			P**
		Umerena bez terapije	Umerena sa terapijom	Blaga	
Urea (mmol/L)	2,9–10,0	9,5 (6,9–14,9) ¹⁶	11,9 (8,7–29,6) ⁹	4,7 (3,1–9,0) ¹⁹	<0,001 [†]
Kreatinin (µmol/L)	54–150	155 (101–274) ¹⁶	194 (104–754) ⁹	86 (60–112) ¹⁹	<0,001 [†]
UP (g/L)	55–75	76 (69–79) ¹⁶	77 (70–80) ⁹	68 (62–78) ¹⁹	<0,001 [†]
Albumin (g/L)	29–35	23 (19–26) ¹⁶	23 (18–25) ⁹	29 (23–33) ¹⁹	<0,001 [†]
Holesterol (mmol/L)	3,5–7,5	3,6 (2,7–9,3) ¹⁴	4,5 (3,2–15,8) ⁸	3,7 (3,0–6,0) ¹⁹	0,106
Trigliceridi (mmol/L)	0,3–1,5	0,5 (0,3–1,6) ¹⁴	0,7 (0,6–1,3) ⁸	0,8 (0,2–0,9) ¹⁹	0,002 [#]
AST (U/L)	13–60	44 (29–62) ¹⁶	56 (44–69) ⁹	36 (28–44) ¹⁹	<0,001 [*]
ALT (U/L)	10–109	84 (62–211) ¹⁶	102 (71–375) ⁹	46 (29–323) ¹⁹	<0,001 [†]
ALP (U/L)	11–114	121 (14–252) ¹⁴	148 (20–549) ⁹	168 (16–560) ¹⁹	0,439
GGT (U/L)	1–12	4 (1–7) ¹⁶	2 (1–6) ⁹	4 (1–15) ¹⁹	0,597

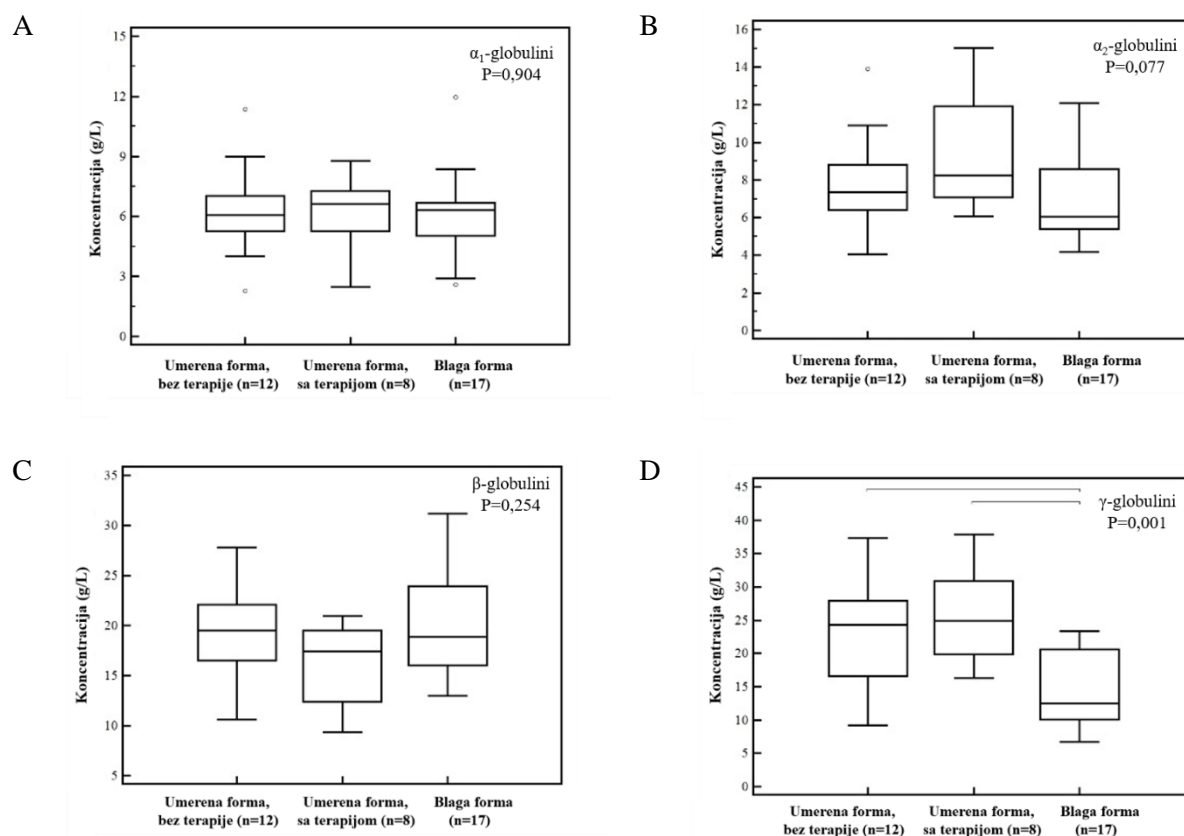
Skraćenice: AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ALP – alkalna fosfataza; GGT – gama-glutamil transferaza; UP – ukupni proteini; **Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, P < 0,05 se smatra značajnom; [†]– P<0,05 za blagu formu u odnosu na druge dve forme, [#]– P<0,05 za umerenu formu sa terapijom u odnosu na druge dve forme, ^{*}– P<0,05 za umerenu formu sa terapijom u odnosu na blagu formu. Broj u superskriptu (italik) predstavlja broj analiziranih uzoraka.

5.3. Rezultati ispitivanja proteinskih frakcija seruma dobijenih elektroforezom u agaroznom gelu

Na Slici 13 je prikazan izgled agaroznog gela nakon elektroforeze. Poređenje koncentracija pojedinačnih frakcija između tri grupe ispitivanih pasa (Grafikon 2) pokazalo je prisustvo razlike jedino u nivou γ globulina. Psi sa blagom formom lajšmanioze imali su manje nivoe u odnosu na pse sa umerenom formom, bez obzira da li su primali terapiju.



Slika 13. Izgled agaroznog gela nakon elektroforetskog razdvajanja proteina seruma iz uzoraka pasa uključenih u studiju. Oznake: I-uzorak iz grupe pasa sa umerenom formom bolesti bez terapije; II-uzorak iz grupe pasa sa umerenom formom bolesti bez terapije; III-uzorak iz grupe pasa sa blagom formom.



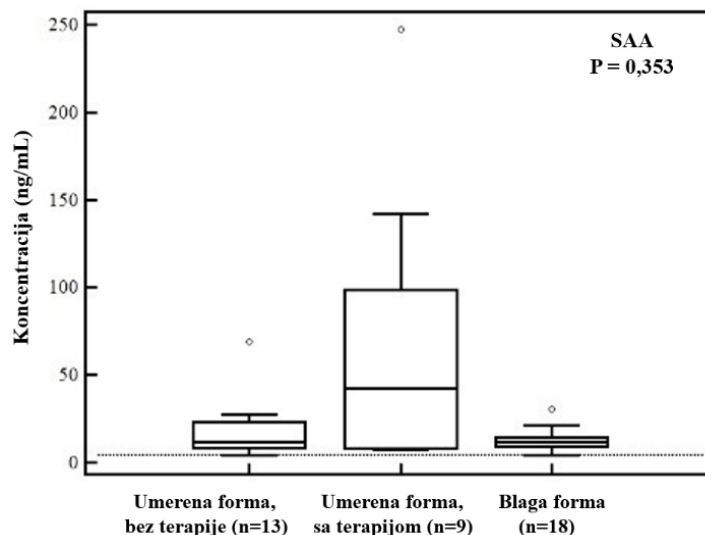
Grafikon 2. Koncentracije (A) α_1 -globulina, (B) α_2 -globulina, (C) β -globulina, i (D) γ -globulina. Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika.

5.4. Koncentracija proteina akutne faze

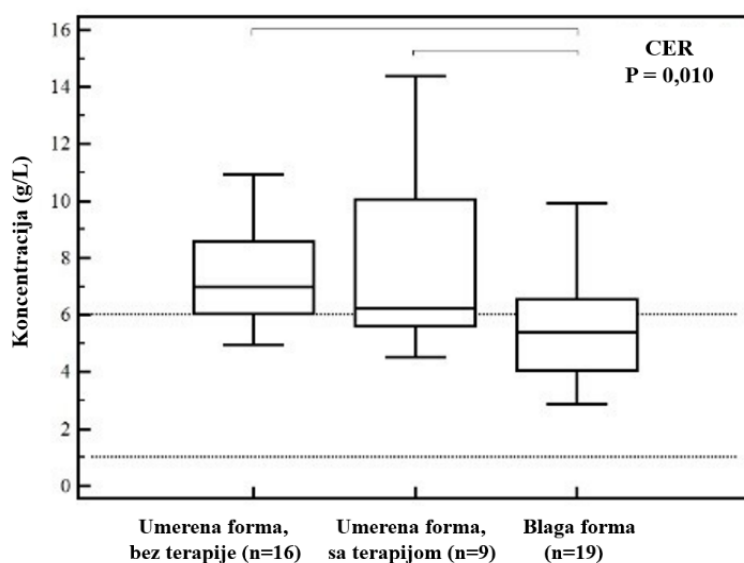
Koncentracije ispitivanih pozitivnih proteina akutne faze, serum amiloida A (SAA), ceruloplazmina (CER) i haptoglobina (HPT) prikazane su na Grafikonima 3–5. Između tri grupe ispitivanih pasa nije bilo razlike u koncentracijama SAA. Za razliku od njega, za nivoe CER i HPT je uočena razlika, u smislu da su njihove koncentracije bile niže kod pasa sa blagom formom bolesti u poređenju sa psima koji su razvili umerenu formu, bez obzira da li su dobijali terapiju. Paraoksonaza-1 (PON-1), negativni reaktant akutne, je imala višu aktivnost kod pasa sa blagom formom lajšmanioze u poređenju sa psima kod kojih je bila prisutna nelečena umerena forma (Grafikon 6).

Indeks akutne faze je izračunavan na dva načina. U jednom je koncentracija pojedinačnih pozitivnih reaktanata akutne faze deljena koncentracijom albumina, kao negativnog reaktanta akutne faze. Drugi način je podrazumevao da se proizvod koncentracija dva pozitivna reaktanta akutne faze podeli koncentracijom albumina. Rezultati su prikazani u Tabeli 7. Indeks koji predstavlja odnos koncentracija SAA i albumina nije pokazao razliku između ispitivanih grupa. U svim ostalim

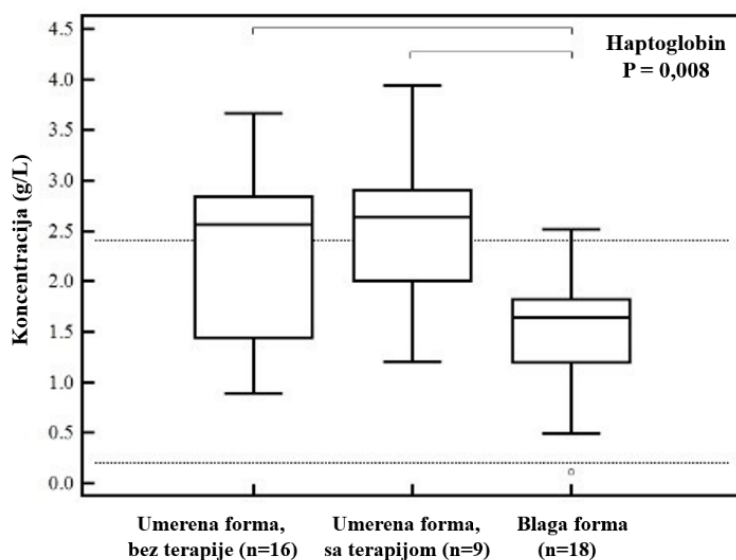
slučajevima, bez obzira na parametre čije su koncentracije korišćene, vrednosti su bile niže kod pasa sa blagom formom lajšmanioze u poređenju sa psima koji su imali umerenu formu, bez obira da li su bili pod terapijom.



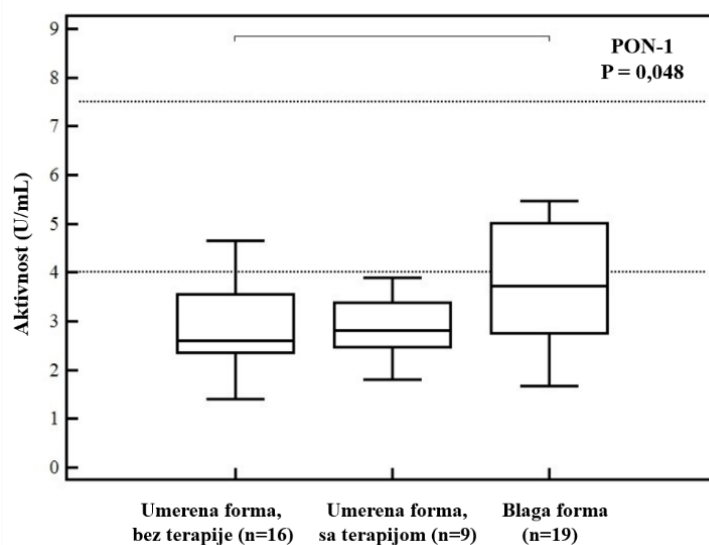
Grafikon 3. Koncentracija serum amiloida A (SAA). Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Kruskal-Wallis-ov test, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Istačkana linija predstavlja granicu referentnih vrednosti Laboratorije za kliničku hematologiju i biohemiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Srbija.



Grafikon 4. Koncentracija ceruloplazmina (CER). Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika. Istačkane linije predstavljaju referentne vrednosti Laboratorije za kliničku hematologiju i biohemiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Srbija)



Grafikon 5. Koncentracija haptoglobina. Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika. Istačkane linije predstavljaju referentne vrednosti Laboratorije za kliničku hematologiju i biohemiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Srbija)



Grafikon 6. Aktivnost paraoksonaze-1 (PON-1). Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika. Istačkane linije predstavljaju referentne vrednosti Laboratorije za kliničku hematologiju i biohemiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Srbija)

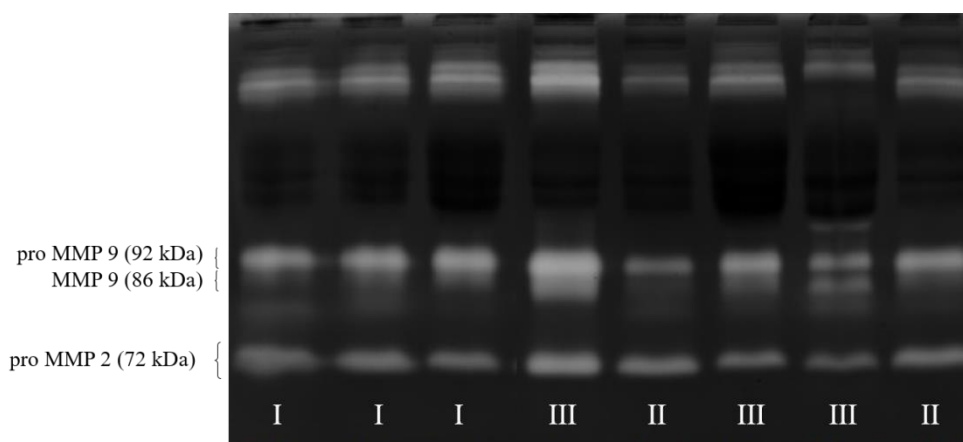
Tabela 7. Vrednosti indeksa akutne faze.

Indeks	Klinička forma (medijana (min–max))			P**
	Umerena bez terapije	Umerena sa terapijom	Blaga	
SAA/ALB	0,5 (0,3–3,0) ¹¹	1,9 (0,3–11,8) ⁹	0,4 (30,2–1,0) ²¹	0,056
CER/ALB	0,3 (0,2–0,5) ¹³	0,3 (0,2–0,6) ⁹	0,2 (0,1–0,3) ²²	<0,001 [†]
HPT/ALB	0,12 (0,04–0,19) ¹³	0,12 (0,06–0,15) ⁹	0,05 (0,01–0,09) ²¹	<0,001 [†]
(SAA*CER)/ALB	3,3 (1,9–32,5) ¹¹	17,5 (1,7–142,4) ⁹	1,8 (0,7–10,1) ²¹	0,007 [†]
(SAA*HPT)/ALB	1,1 (0,5–5,2) ¹¹	4,9 (0,7–14,3) ⁹	0,6 (0,1–2,6) ²⁰	0,001 [†]
(CER*HPT)/ALB	0,8 (0,4–1,5) ¹¹	0,7 (0,5–1,7) ⁹	0,3 (0,1–0,8) ²¹	<0,001 [†]

Skraćenice: ALB – albumin; HPT – haptoglobin; SAA – serum amiloid A; CER – ceruloplazmin.
 **Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom; [†] $P < 0,05$ za blagu formu u odnosu na druge dve forme. Broj u superskriptu (italik) predstavlja broj analiziranih uzoraka.

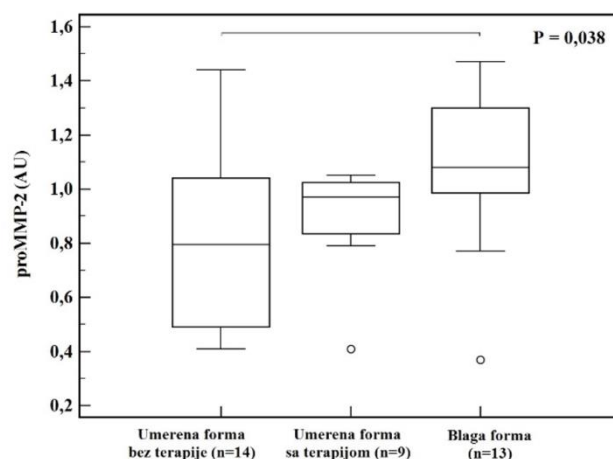
5.5. Aktivnost matriks metaloproteinaza

Reprezentativni uzorak zimograma seruma prikazan je na Slici 14.

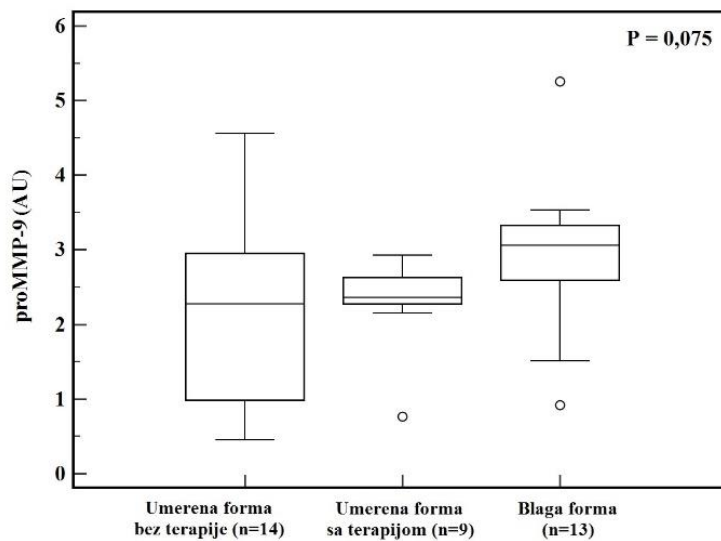


Slika 14. Zimogrami seruma iz uzoraka pasa uključenih u studiju. Oznake: I-uzorak iz grupe pasa sa umerenom formom bolesti bez terapije; II-uzorak iz grupe pasa sa umerenom formom bolesti bez terapije; III-uzorak iz grupe pasa sa blagom formom.

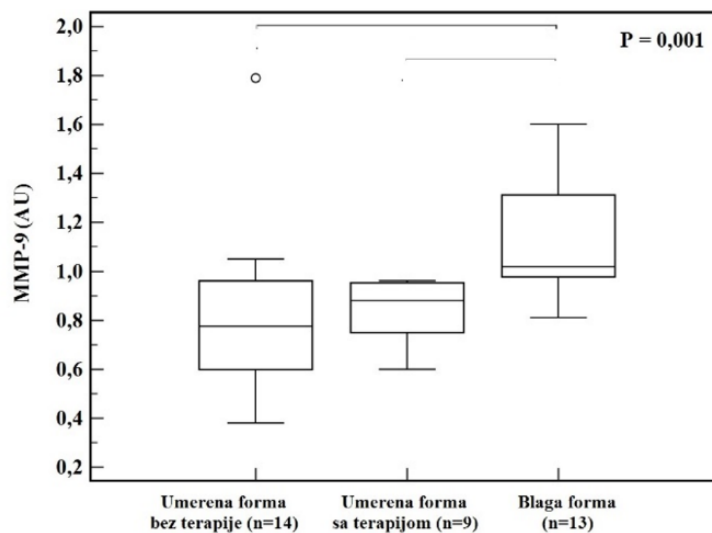
Aktivnost proMMP 2 je bila veća kod pasa sa blagom kliničkom formom lajšmanioze u odnosu na pse sa umerenom formom koji nisu dobijali terapiju (Grafikon 7). Aktivnost MMP 2 nije detektovana u serumima ispitivanih pasa. U aktivnosti proMMP 9 nije bilo razlike između grupa (Grafikon 8), dok je MMP 9 u grupi sa blagom formom bolesti imala veće aktivnosti u poređenju sa obe grupe sa umerenom formom (Grafikon 9).



Grafikon 7. Aktivnost promatriks metaloproteinaze 2 (proMMP 2) u uzorcima seruma lečenih i nelečenih pasa sa umerenom kliničkom slikom i pasa sa blagom slikom lajšmanioze. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika.



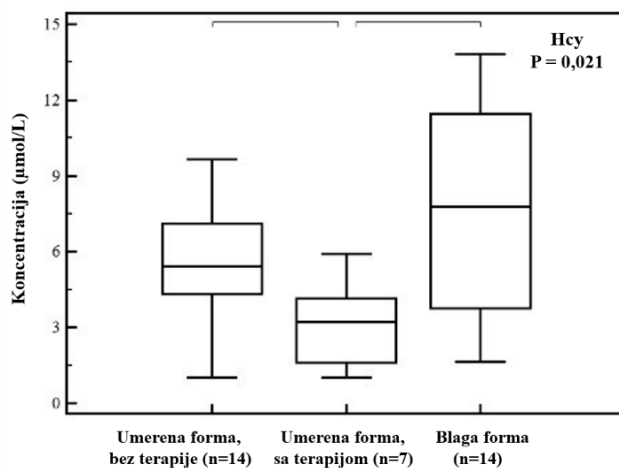
Grafikon 8. Aktivnost promatriks metaloproteinaze 9 (proMMP 9) u uzorcima seruma lečenih i nelečenih pasa sa umerenom kliničkom slikom i pasa sa blagom slikom lajšmanioze. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.



Grafikon 9. Aktivnost matriks metaloproteinaze 9 (MMP 9) u uzorcima seruma lečenih i nelečenih pasa sa umerenom kliničkom slikom i pasa sa blagom slikom lajšmanioze. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika.

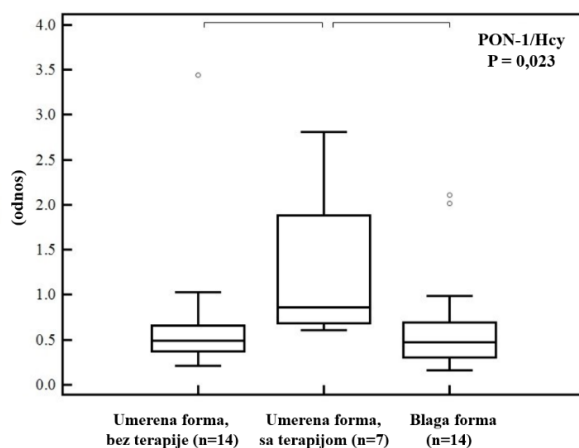
5.6. Koncentracija homocisteina

Koncentracija Hcy bila je niža kod tretiranih pasa (druga grupa), u poređenju sa nelečenim psima prve i treće grupe (sa umerenom i blagom kliničkom slikom), što je prikazano na Grafikon 10.



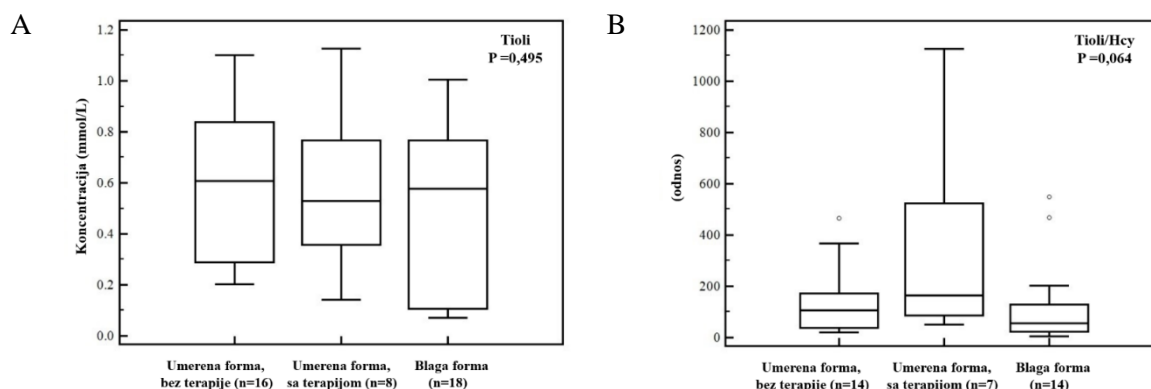
Grafikon 10. Koncentracija homocisteina (Hcy) kod nelečenih i lečenih pasa sa umereno izraženim kliničkim simptomima i pasa sa blagim simptomima lajšmanioze. Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika.

Posmatrajući odnos aktivnosti PON-1 i koncentracije Hcy razlike između grupa postaju inverzne u odnosu na one dobijene kada je upoređivan samo nivo Hcy (Grafikon 11).



Grafikon 11. Odnos aktivnosti paraoksonaze 1 (PON-1) i koncentracije homocisteina (Hcy) kod nelečenih i lečenih pasa sa umereno izraženim kliničkim simptomima i pasa sa blagim simptomima lajšmanioze. Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika.

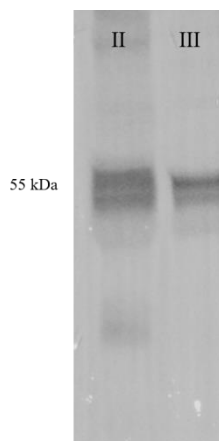
Kada je ispitivana koncentracija tiola, odnosno njen odnos sa koncentracijom Hcy, nisu uočene razlike između tri ispitivane grupe (Grafikon 12).



Grafikon 12. Koncentracije tiola (A) i odnos koncentracija tiola i homocistein (Hcy) (B). Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti.

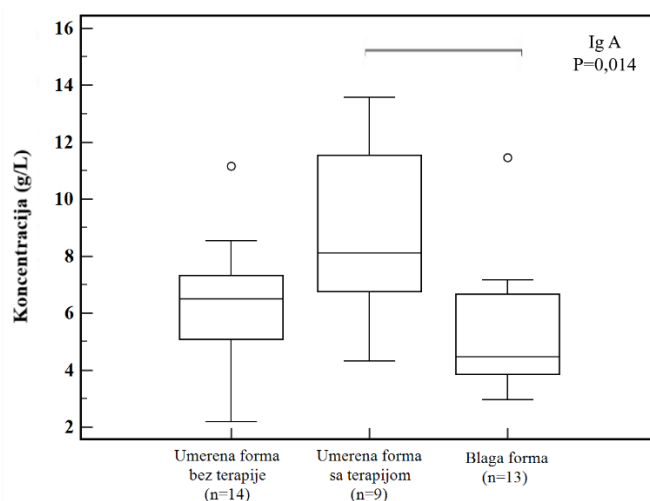
5.7. Koncentracija imunoglobulina A

Reprezentativni uzorak membrane nakon *Western blot*-a prikazan je na Slici 15.



Slika 15. Membrana nakon *Western blota*. Oznake: II - uzorak iz grupe pasa sa umerenom formom bolesti bez terapije; III - uzorak iz grupe pasa sa blagom formom.

Poređenje koncentracija između tri grupe pasa u studiji pokazalo je da su psi sa umerenom formom lajšmanioze koji su dobijali terapiju imali više koncentracije imunoglobulina A u odnosu na pse sa blagom formom (Grafikon 13).



Grafikon 13. Koncentracija imunoglobulina A (IgA) kod nelečenih i lečenih pasa sa umerenom formom i pasa sa blagim formom lajšmanioze. Kruskal-Wallis-ov test sa post-hoc analizom po Conover-u, $P < 0,05$ se smatra značajnom. Pravougaonici predstavljaju vrednosti od nižeg ka višem kvartilu. Srednja linija predstavlja medijanu. Vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrednost. Kružići predstavljaju ekstremne vrednosti. Konektori povezuju grupe između kojih postoji značajna razlika.

5.8. Korelacije molekula koji utiču na ili pokazuju funkciju endotela

Prisustvo korelacija sa drugim ispitivanim parametrima testirano je na celokupnom uzorku pasa uključenih u studiju.

U Tabeli 8 su navedeni parametri koji su korelirali sa aktivnošću proMMP 2.

Tabela 8. Parametri koji koreliraju sa proMMP 2

Parametar	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Forma (blaga / umerena) ³⁶	-0,423 (-0,660 – -0,110)	0,011
Nivo IgG protiv <i>Leishmania</i> spp.(NTU) ³⁶	-0,374 (-0,626 – -0,052)	0,025
ALP (U/L) ³⁵	0,443 (0,129 – 0,676)	0,008
AST (U/L) ³⁶	-0,372 (-0,624 – -0,049)	0,025
GGT (U/L) ³⁶	0,355 (0,030 – 0,612)	0,034

Skraćenice: ALP – alkalna fosfataza; AST – aspartat aminotransferaza; GGT – γ -glutamil transferaza; MMP – matriks metaloproteinaza. ** – Spearman-ova rank korelacija, Broj u superskriptu (italik) predstavlja broj analiziranih uzoraka.

Parametri koji si korelirali sa aktivnošću proMMP-9 prikazani su u Tabeli 9, a oni koji su bili u korelaciji sa MMP-9 u Tabeli 10.

Tabela 9. Parametri koji koreliraju sa proMMP-9

Parametar	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Forma (blaga / umerena) ³⁶	-0,381 (-0.631 – -0.060)	0,022
ALP (U/L) ³⁵	0,426 (0,109 – 0,665)	0,011
AST (U/L) ³⁶	-0,436 (-0,669 – -0,126)	0,008

Skraćenice: ALP – alkalna fosfataza; AST – aspartat aminotransferaza; MMP – matriks-metaloproteinaza. ** – Spearman-ova rank korelacija, Broj u superskriptu (italik) predstavlja broj analiziranih uzoraka.

Tabela 10. Parametri koji koreliraju sa MMP-9

Parametar	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Forma (blaga / umerena) ³⁶	-0,618 (-0.787 – -0.364)	<0,001
Nivo IgG protiv <i>Leishmania</i> spp. (NTU) ³⁶	-0,423 (-0.660 – -0.110)	0,010
UP (g/L) ³⁶	-0,475 (-0,695 – -0,174)	0,003
Albumin (g/L) ³⁶	0,406 (0,090 – 0,648)	0,014
Urea (mmol/L) ³⁶	-0,437 (-0,670 – -0,127)	0,008
Kreatinin (μmol/L) ³⁶	-0,511 (-0,719 – -0,220)	0,001
ALT (U/L) ³⁶	-0,368 (-0,621 – -0,044)	0,027
AST (U/L) ³⁶	-0,390 (-0,637 – -0,070)	0,019
HPT (g/L) ³⁵	-0,422 (-0,662 – -0,103)	0,012
IgA (g/L) ³⁶	-0,427 (-0,663 – -0,114)	0,009

Skraćenice: ALT – alanin aminotransferaza; ALT – aspartat aminotransferaza; HPT – haptoglobin; Ig – imunoglobulin; MMP – matriks metaloproteinaza; UP – ukupni proteini. ** – Spearman-ova rank korelacija, Broj u superskriptu (italik) predstavlja broj analiziranih uzoraka.

Aktivnost proMMP-9 je negativno korelirala sa težinom bolesti kao i sa aktivnošću AST, dok je pozitivno korelirala sa aktivnošću ALP (Tabela 9). Aktivnost MMP-9 je, slično kao i zimogena forma, negativno korelirala sa težinom bolesti, aktivnošću AST, te biohemijskim pokazateljima funkcije bubrega i oštećenja hepatocita (Tabela 10). Važno je naglasiti i da je aktivnost MMP-9 bila u negativnoj korelaciji sa nivoom IgA, još jednog od parametara koji se povezuje sa funkcionalnošću endotela.

Tabela 11 sadrži rezultate multiple regresione analize kojom su identifikovani nezavisni prediktori nivoa matriks-metaloproteinaza.

Tabela 11. Nezavisni prediktori nivoa matriks-metaloproteinaza

Parametar (jedinica)	Koeficijent	P
proMMP-2		
ALP (U/L) ³⁵	0,001	0,018
Koeficijent determinacije (R ²)		0,3861
proMMP-9		
ALP (U/L) ³⁵	0,004	0,008
Koeficijent determinacije (R ²)		0,3162
MMP-9		
ALT (U/L) ³⁵	0,003	0,003
Koeficijent determinacije (R ²)		0,4676

Koncentracija Hcy je korelirala sa daleko većim brojem parametara (Tabela 12), međutim multiplom regresionom analizom je pokazano da samo pet od njih predstavlja nezavisne prediktore koncentracije Hcy (Tabela 13).

Slični rezultati su dobijeni i za parametre čiji su nivoi bili u korelaciji sa koncentracijom imunoglobulina A (Tabela 14), gde je multipla regresija identifikovala samo dva nezavisna prediktora (Tabela 15).

Tabela 12. Parametri koji koreliraju sa homocisteinom

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Forma (blaga / umerena) ³⁵	-0,347 (-0,609 – -0,015)	0,041
Nivo IgG protiv <i>Leishmania</i> spp. (NTU) ³⁵	-0,448 (-0,680 – -0,135)	0,007
Terapija (da/ne) ³⁵	-0,442 (-0,676 – -0,128)	0,008
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$) ³⁵	0,384 (0,058 – 0,636)	0,023
Hemoglobin (g/L) ³⁵	0,339 (0,007 – 0,604)	0,046
Limfociti ($\times 10^9/L$) ³⁵	-0,451 (-0,682 – -0,139)	0,006
MID ($\times 10^9/L$) ³⁵	0,519 (0,225 – 0,727)	0,001
Urea (mmol/L) ³⁵	-0,389 (-0,639 – -0,064)	0,021
Kreatinin ($\mu\text{mol}/L$) ³⁵	-0,369 (-0,625 – -0,040)	0,029
Ukupni proteini (g/L) ³⁵	-0,338 (-0,603 – -0,005)	0,044
Holesterol (mmol/L) ³⁵	-0,415 (-0,667 – -0,078)	0,018
Trigliceridi (mmol/L) ³⁵	-0,426 (-0,675 – -0,091)	0,016
Aspartat aminotransferaza (U/L) ³⁵	-0,456 (-0,685 – -0,145)	0,006
α_2 globulini (g/L) ³³	-0,407 (-0,669 – -0,055)	0,026
γ globulini (g/L) ³³	-0,558 (-0,764 – -0,247)	0,001
Serum amiloid A (ng/mL) ³⁴	-0,620 (-0,797 – -0,347)	<0,001
Ceruloplazmin (g/L) ³⁵	-0,392 (-0,641 – -0,067)	0,020
Tioli (mmol/L) ³⁵	-0,517 (-0,725 – -0,222)	<0,001
IgA ($\mu\text{mol}/L$) ²⁶	-0,507(-0,737 – -0,172)	0,005

Skraćenice: Ig – imunoglobulin; MID – ćelije srednje veličine (monociti i deo eozinofila). ** – Spearman-ova rank korelacija, Broj u superskriptu (italik) predstavlja broj analiziranih uzoraka.

Može se uočiti da je koncentracija Hcy bila u negativnoj korelaciji sa većinom biohemijskih parametara, a da je pozitivna korelacija postojala sa brojem eritrocita i koncentracijom hemoglobina (Tabela 12), koji su ujedno bili i nezavisni prediktori koncentracije Hcy (Tabela 13).

Tabela 13. Nezavisni prediktori koncentracije homocisteina.

Parametar (jedinica)	Koeficijent	P
Terapija (da/ne) ³⁵	-2,670	0,026
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$) ³⁵	3,190	0,022
Hemoglobin (g/L) ³⁵	-0,092	0,019
Limfociti ($\times 10^9/L$) ³⁵	-1,116	0.004
Tioli (mmol/L) ³⁵	-4,703	0.005
Koeficijent determinacije (R ²)	0,6346	

Koncentracija IgA je bila u pozitivnoj korelaciji sa težinom bolesti, tretmanom, i većinom biohemijskih parametara (Tabela 14). Negativne korelacije su povezivale koncentraciju IgA i koncentracije Hcy i albumina, odnosno aktivnost MMP-9.

Tabela 14. Parametri koji koreliraju sa koncentracijom imunoglobulina A.

Parametar (jedinica)	Koeficijent korelacije (95% interval pouzdanosti)	P**
Forma (blaga / umerena) ³⁶	0,420 (0,106 – 0,658)	0,011
Terapija (da/ne) ³⁶	0,417 (0,102 to 0,656)	0,011
Urea (mmol/L) ³⁶	0,440 (0,130 – 0,671)	0,007
Kreatinin (μ mol/L) ³⁶	0,409 (0,093 – 0,650)	0,013
Ukupni proteini (g/L) ³⁶	0,338 (0,011 – 0,600)	0,044
Albumin (g/L) ³⁶	-0,370(-0,623 – -0,047)	0,026
Holesterol (mmol/L) ³⁴	0,407 (0,080 – 0,655)	0,017
Trigliceridi (mmol/L) ³⁴	0,490 (0,183 – 0,711)	0,003
Aspartat aminotransferaza (U/L) ³⁶	0,365 (0,041 – 0,619)	0,029
Alanin aminotransferaza (U/L) ³⁶	0,404 (0,086 – 0,646)	0,015
Haptoglobin (g/L) ³⁴	0,397 (0,074 – 0,645)	0,018
Matriks-metaloproteinaza-9 (AU) ³⁶	-0,427 (-0,663 – -0,114)	0,009
Homocistein (μ mol/L) ²⁶	-0,507(-0,737 – -0,172)	0,005

** – Spearman-ova rank korelacija. Broj u superskriptu (italik) je broj analiziranih uzoraka.

Nezavisni prediktori koncentracije IgA su bili koncentracija triglicerida i haptoglobina (Tabela 15).

Tabela 15. Nezavisni prediktori koncentracije imunoglobulina A.

Parametar (jedinica)	Koeficijent	P
Trigliceridi (mmol/L) ²⁶	10,756	0,006
Haptoglobin (g/L) ²⁶	2,741	0,040
Koeficijent determinacije (R ²)	0,7568	

6. DISKUSIJA

Svi podaci dobijeni u ovoj studiji koherentno ukazuju da psi koji su sa kliničkog aspekta razvili umerenu formu bolesti u odnosu na pse koji su imali blagu formu, imaju viši nivo IgG antitela specifičnih za *Leishmania* spp., narušenu funkciju koštane srži, jetre i bubrega, kao i jedinstven set promena koje mogu da ukažu na promene u funkcionalnosti endotela. Naime, u svetlu povećanja koncentracije proteina akutne faze, javlja se niža aktivnost MMP-2, a kada se u obzir uzme i tronedeljna terapija miltefosinom, alopurinomom i kompleksom vitamina B uočava se i niža koncentracija Hcy te veći nivo ukupnog IgA.

6.1. Klinički i serološki podaci ispitivanih grupa

Lajšmanioza pasa je hronično oboljenje koje se karakteriše nizom znakova koji nisu uvek specifični i mogu biti posledica velikog broja drugih etioloških faktora, pre svega hroničnih progresivnih oboljenja kakvih u kliničkoj praksi ima puno. Zbog toga je u endemičnim regionima rana serološka dijagnostika lajšmanioze neophodna za početak pravovremene terapije. Tako su i u ovoj studiji slučajevi sa blagom formom lajšmanioze zapravo detektovani posle serološke dijagnostike. Nespecifični znaci bolesti koji su poslužili za klasifikaciju umerene forme lajšmanioze su promene na koži kod većine, slabost, mršavljenje i kaheksija, koji se javljaju kod većine hroničnih, progresivnih oboljenja. Ipak u kombinaciji sa serološkom dijagnostikom potvrđeno je da se radi o lajšmaniozi. Jedan od relativno specifičnih simptoma lajšmanioze je onihogrifoza koja je uočena kod nešto manje od polovine pasa u našoj studiji.

Promene na koži i na vidljivim sluznicama su najčešće promene koje su jasno vidljive kod lajšmanioze, ali se ne mogu smatrati specifičnim, s obzirom da se mogu javiti kao posledica mnogobrojnih etioloških faktora, prvenstveno tokom hroničnih oboljenja. Primarne promene u koži se mogu objasniti činjenicom da je najveći broj parazita skoncentrisan baš u toj regiji (Reis i sar., 2006) uzrokujući nakupljanje ćelija imunskog odgovora, uz taloženje imunskih kompleksa i razvoj III tipa preosetljivosti. Hiperkeratoza nosnog ogledala je verovatno sekundarno izazvana oblizavanjem iscetka iz nosa.

Serološka dijagnostika lajšmanioze je osnov za postavljanje dijagnoze, s obzirom da se se ocenjuje koncentracija specifičnih antitela. Nedostatak „zlatnog standarda“ za dijagnostiku lajšmanioze je otežavajući faktor. Molekularna dijagnostika može doprineti postavljanju dijagnoze, ali nikako ne može biti jedini osnov (Solano-Gallego i sar., 2009). Zbog toga je serološka dijagnostika sa pažljivo odabranom graničnom vrednošću, u sklopu sa kliničkom slikom još uvek nezamenljiva u dijagnostici lajšmanioze (Solano-Gallego i sar., 2009). Grupe koje su u ovoj studiji formirane na osnovu anamnestičkih podataka o terapiji, kliničke slike i serološke dijagnostike su se u daljim ispitivanjima pokazale kao valjano rešenje s obzirom da je hipoteza o vezi težine bolesti, sistemske inflamacije i oštećenju endotela potvrđena u daljim istraživanjima. Broj mužjaka i ženki, kao i zastupljenost rasnih pasa se nije razlikovao u ovako formiranim grupama te u tom

smislu pol i rasa nisu imale uticaja na dobijene rezultate. U grupi sa blagom formom bolesti su bile zastupljene mlađe životinje, što bi moglo otvoriti mogućnost da starost donekle može uticati na rezultate.

6.2. Rezultati hematoloških i osnovnih biohemijskih analiza

Niže hematokritne vrednosti kod pasa sa umerenom formom bolesti, uz odsustvo razlike u broju eritrocita i eritrocitnim indeksima, ukazivali su na normocitno normohromnu anemiju, čija patogeneza leži u hroničnoj inflamatornoj bolesti. Prosečan broj leukocita je bio viši kod pasa sa blagom formom bolesti. Uočljive su velike individualne varijacije, a u pojedinim slučajevima jasna leukocitoza i neutrofilija. Ovi nalazi se mogu objasniti akutizacijom pojedinih patoloških procesa i/ili stresom. Nalaz nižeg broja leukocita kod pasa sa umerenom formom lajšmanioze, bez obzira da li su dobijali terapiju, pobuđuje interesovanje. U sličnoj studiji, ni psi sa umerenom niti oni teškom formom bolesti nisu imali promene u broju leukocita (Alemida i sar., 2013). Interesantno je da se osim u koži, veliki broj parazita nalazi u koštanoj srži i slezini (Reis i sar., 2006), te je zapravo neobično da oboleli psi nemaju ozbiljniju disregulaciju mijelopoeze. Prosečan broj trombocita se takođe nalazio u granicama referentnih vrednosti, s tim što se u izvesnom broju slučajeva uočavala trombocitoza. Trombocitoza najverovatnije nastaje kao posledica lučenja IL-6 koji stimuliše trombopoezu. Važan podatak iz ove studije je da se promene hematoloških parametara nije mogao povezati sa tronedeljnom kombinovanom terapijom miltefosinom i alopurinolom, uz dodatak vitamina B grupe.

Od osnovnih biohemijskih parametara značajna su odstupanja kreatinina i uree. Azotemija je za lajšmaniozu definitivno važan i dijagnostički i prognostički nalaz (Solano-Gallego i sar., 2009). Kod pasa sa blagom formom bolesti koncentracija kreatinina je u svim slučajevima bila u granicama referentnih vrednosti. Azotemija je bila izraženija kod pasa sa umerenom formom bolesti bez obzira da li su bili sa ili bez terapije, što je u saglasju i sa izraženijim kliničkim znacima u odnosu na pse sa blagom formom bolesti.

Oštećenja funkcije jetre i oštećenje samih hepatocita su takođe očekivana kod pasa sa lajšmaniozom (Solano-Gallego et al., 2009). U ovoj disertaciji o tome su posvedočile i veće vrednosti aktivnosti aspartat aminotransferaze i alanin aminotransferaze, te snižena koncentracija albumina u obe grupe u kojima su bili psi sa umerenom formom bolesti.

Koncentracija serumskih proteina takođe privlači pažnju. Kao što je očekivano (Solano-Gallego et al., 2009), koncentracija ukupnih proteina je povećana, naročito kod pasa sa izraženijim kliničkim znacima usled povećanja koncentracije globulina, preciznije gama-globulinske frakcije.

6.3. Elektroforeza proteina i koncentracije proteina akutne faze

Proteini akutne faze, prvenstveno pozitivni, takođe privlače posebnu pažnju. Paralelno sa smanjenjem koncentracije albumina i PON-1 i povećanjem koncentracije gama-globulina, u istom odnosu zapaža se i povećanje koncentracije haptoglobina i ceruloplazmina. U najvećem broju slučajeva, promene su izrazitije kod pasa sa umerenom formom bolesti u odnosu na one sa blagom formom bolesti. Ovakve promene su u potpunosti očekivane s obzirom da postoji hronična sistemska inflamacija. U tom kontekstu, neočekivan rezultat je odsustvo razlike u koncentraciji SAA između grupa. Ipak, indeksi proteina akutne faze formirani množenjem pozitivnih proteina akutne faze i deljenjem sa negativnim proteinima, jasno pokazuju jači intenzitet inflamacije kod pasa sa umerenom formom bolesti. Međutim, ni razlike u indeksima proteina akutne faze se nisu mogli povezati sa kratkotrajnom kombinovanom terapijskom primenom miltefosina, alopurinola i vitamina B kompleksa.

6.4. Aktivnost matriks-metaloproteinaza

Prethodna istraživanja su pokazala da kod pasa proMMP-9 u perifernoj krvi luče leukociti i to najverovatnije neutrofilni granulociti (Spariosu i sar., 2021). Takođe, pokazana je jasna pozitivna korelacija proMMP-9 i MMP-9 sa brojem leukocita u krvi (Spariosu i sar., 2021). Premda rezultati disertacije ne uključuju korelaciju broja leukocita i aktivnosti proMMP-9 odnosno MMP-9, na indirektan način ukazuju na mogućnost da je takav obrazac povezanosti prisutan i kod pasa sa lajšmaniozom. Naime, kod pasa sa blagom formom su i broj leukocita i aktivnost MMP-9 bili veći u poređenju sa psima kod kojih je bila prisutna umerena forma, nezavisno da li su dobijali terapiju.

Takođe, u pomenutoj studiji (Spariosu i sar., 2021) pokazano je da endotelne ćelije luče proMMP-2 koja se u krvi odnosno serumu tj. ćelijskom medijumu ne može naći u aktivnoj formi. Uzimajući u obzir povezanost aktivne forme ove metaloproteinaze sa neoplastičnim promenama (Kodera i sar., 2000), postaje moguće da se odsustvo aktivirane forme u cirkulaciji pripíše aktivaciji sa bazolateralne strane endotelnih ćelija. Psi sa blagom formom lajšmanioze su imali veću aktivnost proMMP-2 u odnosu na grupu pasa sa umerenom formom bez terapije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim rezultatima u kojima je aktivnost proMMP-2 kod pasa inficiranih sa protozom *Babesia canis*, bila veća posle 15 dana od terapije, kada se psi smatraju zdravim, nego na prezentaciji kada je akutna sistemska inflamacija na vrhuncu (Spariosu i sar., 2021). Uz to je pokazano da psi inficirani sa *B. canis*, a sa težom inflamacijom koja se može okarakterisati kao sindrom sistemskog inflamatornog odgovora, imaju najniže vrednosti proMMP-2 (Spariosu, 2021). Svi rezultati ukazuju da je veća aktivnost proMMP-2 povezana sa „stabilizacijom“ endotelnih ćelija, odnosno da je niža aktivnost povezana sa disfunkcijom endotelnih ćelija. Sa tim u vezi, i rezultati u ovoj disertaciji uključuju nižu aktivnost proMMP-2 što je forma lajšmanioze bila teža i što su psi imali viši nivo specifičnih antitela. Takođe, niža aktivnost proMMP-2 je korelirala sa višom aktivnošću AST. Naime, AST bi se osim markera oštećenja hepatocita, mogao smatrati i markerom oštećenja endotelnih ćelija. Na ovakvo stanovište ukazuju istraživanja u kojima je kod

pacijenata ili eksperimentalnih životinja sa oštećenjem endotela, a bez kliničkih i laboratorijskih pokazatelja oštećenja jetre, dolazilo do brzog i višestrukog povećanja AST (Goncharov i sar., 2017).

Na osnovu dobijenih rezultata o povezanosti uznapredovale infekcije protozoama roda *Leishmania* sa nižom aktivnošću MMP-9 i MMP-2, opravdano je pretpostaviti postojanje poremećaja u remodelovanju različitih tkiva, uključujući i endotel, odnosno zidove krvnih sudova.

6.5. Koncentracija homocisteina

Među različitim metabolitima koji mogu uticati na funkciju endotela, odnosno čiji se nivo u krvi može povezati sa njegovom disfunkcijom, posebno veliku pažnju privlači homocistein. Prikazani rezultati ukazuju na međuzavisnost stadijuma lajšmanioze, anti-lajšmaniotičnog tretmana koji uključuje i suplementaciju vitaminima B kompleksa i koncentracije Hcy. Psi sa blagom i umerenom formom lajšmanioze, a bez tretmana, su imali slične koncentracije Hcy. Nasuprot tome, psi koji su bili na tronedeljnoj terapiji (miltefosin, alopurinol i kompleks B vitamina) su imali nižu koncentraciju Hcy nego prethodne dve grupe. Bez obzira na to značajno smanjenje Hcy, rezultati su pokazali da se kombinovana terapijska primena miltefosina i alopurinola, uz dodatak vitamina B kompleksa, nije mogla povezati sa razlikama u „brojnosti“ kliničkih znakova bolesti, promenu hematoloških parametara, koncentracija proteina akutne faze i laboratorijskih testova kojima se može proceniti funkcionalno stanje jetre i bubrega.

Analizom svih grupa utvrđeno je da su postojala četiri negativna prediktora za koncentraciju Hcy: terapija, broj limfocita, koncentracija hemoglobina i koncentracija slobodnih tiolnih grupa. Osim toga, pozitivan prediktor je bio broj eritrocita. Na osnovu podataka iz literature se ne mogu pouzdano proceniti nivoi Hcy kod zdravih pasa. Uočava se da njegove vrednosti u različitim studijama značajno variraju u zavisnosti od rase pasa, starosti, ishrane i metoda merenja. Prema rezultatima Rossi i sar. (2013), Lee i sar. (2017) i Benvenuti i sar. (2020), može se ekstrapolirati da je opseg koncentracija Hcy kod zdravih pasa 1,7-10,5 $\mu\text{mol/L}$. Ako se u tumačenju rezultata u ovoj disertaciji prihvati da navedene vrednosti Hcy karakterišu zdrave pse, onda obe grupe pasa sa umerenom formom lajšmanioze imaju koncentraciju Hcy u referentnom opsegu. Vrlo je slična situacija i sa koncentracijom Hcy među psima sa blagom formom bolesti, i samo nekoliko pasa u ovoj grupi ima blago povećane vrednosti. Nalazi Grützner i sar. (2014), kao i još dva autora (Patterson i sar., 2013; Golynski i sar., 2017) za zdrave pse su nešto drugačiji i iznose od 5,2 do 25,9 $\mu\text{mol/L}$. Ako se koristi ovaj interval, većina pasa koji primaju terapiju bi imala hipo-Hcy, dok bi svi ostali psi imali koncentraciju Hcy u okviru vrednosti definisanih za zdrave pse. Psi sa blagom formom lajšmanijaze su jedino imali blage kliničke znake i manja odstupanja od referentnih vrednosti kada se radi o rutinskim hematološkim i biohemijskim analizama, te nije iznenađujuće zapažanje da ni koncentracija Hcy ne odstupa značajno u odnosu na vrednosti referisane za zdrave pse.

Nasuprot ovome, u grupi sa umerenom formom bolesti mogla bi se očekivati nešto veća koncentracija Hcy. Ti psi su imali brojne pokazatelje progresije bolesti: izrazite kliničke znake, visok nivo specifičnih antitela, blagu neregenerativnu anemiju, povećanu koncentraciju proteina akutne faze, uree i kreatinina (Solano-Gallego i sar., 2011; Koutinas i sar., 2014; Cantos-Barreda i sar., 2018). S druge strane, postojao je inverzan odnos između koncentracije Hcy i većine laboratorijskih parametara. Interesantno je da je koncentracija Hcy negativno korelirala sa SAA i sa ceruloplazminom, jednim brzim a drugim sporim proteinom akutne faze. Na osnovu tih nalaza se može zaključiti da što je teže oštećenje tkiva, koncentracija Hcy je niža, iako nedvosmislenog objašnjenja za ovakav nalaz vezan za Hcy još uvek nema. Najmanje dve karakteristike sistemske inflamacije mogu objasniti činjenicu da nije uočena veća koncentracija Hcy kod pasa sa umerenom formom bolesti. Jedna od njih je smanjen apetit, koji dovodi do smanjenog unosa metionina hranom (Patterson i sar., 2013) i posledično smanjene konverzije u Hcy. Drugo objašnjenje može biti vezano za činjenicu da postoji disproteinemija koja se primarno karakteriše uočljivom hipoalbuminemijom. Naime, albumin vezuje oko 90% Hcy plazme (Hortin i sar., 2006). Smanjena sinteza albumina udružena sa nefropatijom, koja je veoma izvesna na osnovu povećanja vrednosti za ureu i kreatinin, može drastično da smanji količinu Hcy “deponovanog” u krvi. Osim toga, svi navedeni podaci ukazuju da se može postaviti i dodatno pitanje vezano za (pato)fiziološke puteve eliminacije viška slobodnog Hcy. Takođe, nalaz negativne korelacije između koncentracije nekoliko pozitivnih proteina akutne faze i Hcy ide u prilog pretpostavci da Hcy ima svojstvo negativnog akutno-faznog reaktanta kod pasa. Na to je ukazano u prethodnim istraživanjima povezanosti sindroma sistemskog inflamatornog odgovora i promena u nivou Hcy (Patterson i sar., 2013).

Na kraju, među mnogim negativnim korelacijama pokazanim za Hcy u ovoj studiji, veoma je interesantna ona koja pokazuje odnos specifičnih anti-lajšmanija antitela (IgG) i Hcy, jer donosi implikacije vezane za imunski posredovano oštećenje endotela. Iako se čini da je smanjenje Hcy povezano sa jakom neefikasnom i po endotel štetnom reakcijom specifičnog humoralnog imunskog odgovora, sam efekat Hcy vezan za oštećenje endotela nije baš jasan. Moguće je da je oštećenje endotela posredovano Hcy mnogo jače u blagoj formi, istovremeno doprinoseći progresiji bolesti ka umerenoj formi. S druge strane, ne treba zanemariti ni scenario povećanog “utroška” Hcy *in situ* tokom oštećenja endotela.

U ovoj studiji niži nivo Hcy je bio jedini pokazatelj terapijskog delovanja kombinacije miltefosina, alopurinola i suplemenata kompleksa vitamina B. Moguće je da relativno kratak rok od 3 nedelje terapije zapravo nije omogućio da se uoče promene u proteinima akutne faze (Daza González i sar., 2019), odnosno da reparacija i regeneracija nisu obezbedile smanjenje obima oštećenja tkiva. Smanjenje koncentracije Hcy je najverovatnije nastalo zahvaljujući suplementaciji vitaminom B₁₂ (Kather i sar., 2020). Odnos između medijana Hcy u grupama sa umerenom formom lajšmanijaze sa i bez terapije je bio proporcionalan koncentracijama Hcy izmerenim kod pasa sa hipokobalaminemijom (8,70 µmol/L) i onima sa normalnom koncentracijom kobalamina

(4,25 $\mu\text{mol/L}$) (Benvenuti i sar., 2020). Uzimajući u obzir činjenicu da u našoj studiji nije bilo razlike u koncentraciji Hcy između netretiranih pasa sa blagom i umerenom formom bolesti, ovi rezultati bi mogli biti osnova da se razmotri preporuka za ranu suplementaciju vitaminom B kod pasa sa lajšmaniozom.

Takođe, farmakološko dejstvo miltefosina bi moglo izazvati smanjenje koncentracije Hcy. Naime, miltefosin inhibira sintezu fosfatidilholina (Dorlo i sar., 2012) te posledično i transfer metil-grupa sa S-adenosil-metionina može da smanji stvaranje adenzil-homocisteina, direktnog metaboličkog prekursora Hcy (Rios-Marco i sar, 2017). Nivo Hcy je bio u pozitivnoj korelaciji sa brojem eritrocita i koncentracijom hemoglobina, što se može eventualno objasniti jatrogenom destrukcijom eritrocita, jer sam miltefosin ima hemolitička svojstva (Rios-Marco i sar., 2017). To dalje može da prouzrokuje depleciju depoa Hcy u eritrocitima (Andersson i sar., 1992). Ipak, veoma je teško razdvojiti navedeni "scenario" od činjenice da postoji anemija usled hronične inflamacije koja je uobičajen nalaz kod pasa sa umerenom formom lajšmanioze (Solano-Gallego i sar., 2011).

Oksidativni stres je veoma tipična promena za inflamaciju i za lajšmaniozu (de Sousa Goncalves i sar., 2021). Ipak, nivo Tiola i Tioli/Hcy u sve tri grupe nije ukazao na niži antioksidativni kapacitet seruma u umerenoj formi bolesti, ali ni na to da se veće vrednosti mogu povezati sa terapijom. Dalje, razlika u aktivnosti PON-1 i odnosa PON-1/Hcy pokazuju dodatni, potencijalno zaštitni mehanizam suplementacije kompleksom B vitamina. Osim što je PON-1 deo sistema antioksidativne zaštite, on takođe hidrolizuje Hcy-tiolakton, metabolit odgovoran za štetne efekte hiperhomocisteinemije (Perla-Kajan i sar., 2012). Povećana potrošnja PON-1 kod neterapiranih pasa sa umerenom formom lajšmanioze bi mogla da dovede do smanjenja aktivnosti ovog negativnog reaktanta akutne faze, a u odnosu na pse sa blagom formom bolesti. Suplementacija kompleksom B vitamina i posledično smanjenje Hcy, moglo je doprineti višoj vrednosti odnosa PON-1/Hcy, a što dalje može ukazati na smanjenu potrošnju PON-1 na hidrolizu samog Hcy-tiolaktona, ostavljajući više dostupnog PON-1 za neutralizaciju reaktivnih radikala kiseonika.

6.6. Koncentracija IgA

Rezultati ukazuju da je viša koncentracija IgA povezana sa težom formom bolesti i sa tretmanom. I prethodna istraživanja su pokazala da koncentracija IgA raste sa pogoršanjem bolesti (Reis i sar., 2006) i da je IgA zapravo imunoglobulin koji stvara najviše imunskih kompleksa koji se potom deponuju u zidove krvnih sudova izazivajući oštećenje tkiva, tokom eksperimentalnih infekcija miševa (Perez-Aguilar i sar., 2011) i kod pasa prirodno inficiranih sa *Leishmania* spp. (Aparecida de Carvalho i sar., 2021).

Na osnovu korelacija koncentracije IgA i biohemijskih parametara se takođe jasno može videti da je poremećaj funkcije i oštećenje tkiva bilo teže kod pasa sa većom koncentracijom IgA, što ovu klasu imunoglobulina povezuje sa nastalim promenama. Važno je istaći da je viša koncentracija IgA pozitivno korelirala sa koncentracijom HPT

što je važan pokazatelj povezanosti hronične inflamacije i specifičnog humoralnog imunskog odgovora. Interesnatne su, premda ne u potpunosti neočekivane, i dve negativne korelacije: aktivnost MMP-9 i koncentracija Hcy su negativno korelirale sa koncentracijom IgA. Kao što je već navedeno, niža aktivnost MMP-9 se sa velikom verovatnoćom može povezati sa nižim brojem leukocita koji je postojao kod pasa sa umerenom formom bolesti koju je pratio porast koncentracije IgA. Ukoliko se razmatra eventualna disfunkcija endotela povezana sa taloženjem imunskih kompleksa, koji se u najvećoj meri stvaraju upravo zahvaljujući sintezi i sekreciji IgA (Aparecida de Carvalho i sar., 2021), i ukoliko se prihvati hipoteza da se Hcy troši/metaboliše „in situ“ postaje očekivana dobijena povezanost ova dva parametra nalaze kod pasa obolelih od lajšmanioze.

U zaključnim razmatranjima može se istaći da psi oboleli od lajšmanioze, držani u prihvatilištu za pse u endemičnom području Crne Gore, imaju jasnu i nedvosmisleno povezanost težine kliničkih znakova bolesti, nivoa antitela protiv *Leishmania* spp., koncentracije ukupnih IgA, te hematoloških i biohemijskih pokazatelja oštećenja funkcije i strukture tkiva i organa. Podjednako važno, težina klinički ispoljene bolesti je bila povezana i sa pokazateljima sistemske inflamacije, i pokazatelja oštećenja endotela, što je jedan od malo razmatranih mehanizama u složenoj patogenezi ove bolesti. Neophodno je osvrnuti se i na nekoliko činjenica koje predstavljaju ograničenja u tumačenju dobijenih rezultata. Prvi od njih je relativno mali broj pasa u studiji. Dodatno, studija je dizajnirana kao opservaciona studija preseka, a ne prospektivna studija. U širem patobiološkom i kliničkom kontekstu, interpretacija rezultata bi bila pouzdanija ukoliko bi u studiju bila uključena i kontrolna grupa, formirana od pasa koji imaju negativan serološki test i nisu boravili u endemičnom području. Bez obzira na ograničenja, dobijeni podaci predstavljaju odličan temelj za dalja istraživanja molekularnih i kliničkih aspekata ove zoonoze.

7. ZAKLJUČCI

Zaključci izvedene opservacione studije preseka su:

1. Psi kod kojih je dijagnostikovana umerena forma bolesti, bez obzira da li su dobijali terapiju, imali su u odnosu na pse sa blagom formom viši nivo specifičnih IgG protiv *Leishmania* spp., anemiju čija patogeneza se barem delimično može pripisati hroničnoj inflamatornoj bolesti, i promene u biohemijskim parametrima koji su ukazivali na hroničnu inflamaciju, oštećenje hepatocita i azotemiju.
2. Koncentracija SAA se nije razlikovala između navedenih grupa, što ukazuje da nisu postojali akutni insulti koji bi pokrenuli sintezu ovog proteina. Razlike u koncentracijama HPT i CER, kao i aktivnosti PON-1, odražavale su veći stepen oštećenja tkiva kod pasa sa umerenom formom bolesti u odnosu na pse sa blagom formom.
3. Aktivnost proMMP-2, koja zavisi od funkcije endotelnih ćelija, je bila niža kod pasa sa umerenom formom bolesti bez terapije u odnosu na pse sa blagom formom, i negativno je korelirala sa nivoom specifičnih IgG, što daje potencijalnu osnovu da je odražavala disfunkciju endotela kod inficiranih pasa.
4. Među parametrima koji se mogu smatrati uzročnicima odnosno pokazateljima disfunkcije endotela ističe se koncentracija Hcy, koja je negativno korelirala sa pokazateljima sistemske inflamacije, nivoom specifičnih IgG i ukupnog IgA.
5. Poliklonska hipergamaglobulinemija kod obe grupe pasa sa umerenom formom bolesti, kao i ukupan IgA koji je bio viši kod pasa na terapiji sa umerenom formom bolesti, a u odnosu na pse sa blagom formom, su najverovatnije odražavale veći stepen stvaranja imunskih kompleksa, te posledično i veći stepen disfunkcije endotela.
6. Tronedeljna terapija navedenim hemoterapeuticima i vitaminima se nije mogla povezati sa manjim intenzitetom sistemske inflamacije niti promenama u nivou većine molekula koji utiču na ili pokazuju funkciju endotela. Izuzetak je koncentracija Hcy, koja je bila niža kod pasa na terapiji u poređenju sa psima iz drugih dveju grupa, najverovatnije usled suplementacije vitaminima B kompleksa. Odsustvo razlike između ostalih parametara bi se potencijalno moglo objasniti kratkim trajanjem terapije.
7. Uopšteno posmatrano izvedena ispitivanja pokazuju da je intenzivan humoralni odgovor na infestaciju sa *Leishmania* spp., koji je prećen preko nivoa specifičnih antitela odnosno ukupnog IgA, povezan sa većim stepenom sistemske inflamacije i težim stepenom disfunkcije endotela. Takođe, rezultati studije ukazuju na opravdanost daljeg proučavanja aktivnosti proMMP-2 i koncentracije Hcy, kao potencijalnih pokazatelja (dis)funkcije endotela, u smislu praćenja pozitivnih ishoda terapije.

8. LITERATURA

1. Akhouni M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D, 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS Negl Trop Dis. 10: e0004349.
2. Albuquerque A, Campino L, Cardoso L, Cortes S, 2017. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. Parasit Vectors. 10, 57.
3. Alemayehu B, Alemayehu M, 2017. Leishmaniasis: A review on parasite, vector and reservoir host. Health Sci J. 11: 519.
4. Alexander B, 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol. 14: 109–122.
5. Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X, Alten B, Gould EA i Charrel RN, 2013. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. Antiviral Res. 100: 54–74.
6. Almeida BF, Narciso LG, Bosco AM, Pereira PP, Braga ET, Avanço SV, Marcondes M, Ciarlini PC, 2013. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 196: 6–12.
7. Alonso F, Font PG, Manchón M, de Ybáñez RR, Segovia M, Berriatua E, 2010. Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean area. Zoonoses Public Health. 57: 318–328.
8. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Javier Moreno J, 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 21: 334–359.
9. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 7: e35671.
10. Alves C, de Amorim I, Moura E, Ribeiro R, Alves C, Michalick M, Kalopothakis E, Bruna-Romero O, 2009. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol. 128: 349–358.
11. Amro A, Hamarsheh O, 2020. Epidemiology of leishmaniasis in Palestine, Handbook of Healthcare in the Arab World, Springer Nature Switzerland AG, pp. 1–17.
12. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B, 1992. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. Clin Chem. 38: 1311–1315.

13. Andonovska B, Dimova C, Panov S, 2008. Metaloproteinaze matriksa (MMP-1, -8, -13) kod hroničnih periapeksnih oboljenja. *Vojnosanitetski pregled*. 65: 882–886.
14. Andric B, Mijovic G, Terzic D, Dupanovic B, 2012. Vector borne transmissible zoonoses in Montenegro. *J of IMAB*. 18: 220–225.
15. Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volf P, 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill*, 18: 20540.
16. Aparecida de Carvalho C, Mitsuyoshi Hiramoto R, Regina Meireles L, Franco de Andrade Júnior H, 2021. Serum antibodies blocked by glycan antigens in canine visceral leishmaniasis serology are mostly IgA immune complexes. *Parasitology*. 148: 1509–1515.
17. Ayele A, Seyoum Z, 2016. A review on canine leishmaniasis, etiology, clinical sign, pathogenesis, treatment and control methods. *Glob Vet*. 17: 343–352.
18. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L, 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 24: 324–330.
19. Barbosa MA, Alexandre-Pires G, Soares-Clemente M, Marques C, Rodrigues OR, De Brito TV, Da Fonseca IP, Alves LC, Santos-Gomes GM, 2011. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. *J Comp Pathol*. 145: 336–344.
20. Barygeson ADM, Bray RS, Wolstencroft RA, Dumonde DC, 1970. Immunity in cutaneous leishmaniasis of the guinea pig. *Clin Exp Immunol*. 7: 301–341.
21. Bates PA, 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 37: 1097–1106.
22. Beletić A, 2014. Uticaj naslednih i stečenih faktora na nivo homocisteina u krvi bolesnika sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća, doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
23. Benvenuti E, Pierini A, Gori E, Bottero E, Pietra M, Lippi I, 2020. Serum homocysteine concentration in dogs with immunosuppressant-responsive enteropathy. *J Vet Sci*. 21: e47.
24. Bhattarai NR, Van der Auwera G, Rijal S, Picado A, Speybroeck N, Khanal B, De Doncker S, Lal Das M, Ostyn B, Davies C, Coosemans M, Berkvens D, Boelaert M, Dujardin JC, 2010. Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis. *Nepal. Emerg Infect Dis*. 16: 231–237.

25. Bosnić S, Gradoni L, Khoury C, Maroli M, 2006. A review of leishmaniasis in Dalmatia (Croatia) and results from recent surveys on phlebotomines and flies in three southern counties. *Acta Trop.* 99: 42–49
26. Bourdeau P, Saridomichelakis MN, Oliveira A, Oliva G, Kotnik T, Gálvez R, Manzillo VF, Koutinas AF, Pereira da Fonseca I, Miró G, 2014. Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasit Vectors.* 7: 110.
27. Buckley CD, Rainger GE, Nash GB, Raza K, 2005. Endothelial cells, fibroblasts and vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 44: 860-863.
28. Campos TM, Passos ST, Novais FO, Beiting DP, Costa RS, Queiroz A, Mosser D, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP, 2014. Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 8: e3282.
29. Cantos-Barreda A, Escribano D, Cerón JJ, Bernal LJ, Furlanello T, Tecles F, Pardo-Marín L, Martínez-Subiela S, 2018. Relationship between serum anti-*Leishmania* antibody levels and acute phase proteins in dogs with canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 260: 63-68.
30. Carvalho Nicolato RC, Abreu RT, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Reis LES, Graças Carvalho M, Carneiro CM, Giunchetti RC, Bouillet LEM, Lemos DS, Coura-Vital WAB, 2013. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One.* 8: e82947.
31. CDC, 2020. https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html (pristupljeno 25.03.2020).
32. Cerón JJ, Martínez-Subiela S, 2004. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res.* 35: 671–667.
33. Ceron JJ, Pardo-Marin L, Caldin M, Furlanello T, Solano-Gallego L, Tecles F, Bernal L, Beneth G, Martinez-Subiela S, 2018. Use of acute phase proteins for the clinical assessment and management of canine leishmaniosis: general recommendations. *BMC Vet Res.* 14: 196.
34. Ciaramella P, Oliva G, De Luna R, Ambrosio R, Cortese L, Persechino A, Gradoni L, Scalone A, 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 141: 539–543.
35. Ćirović D, Chochlakis D, Tomanović S, Sukara R, Penezić A, Tselentis Y, Psaroulaki A, 2014. Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the Golden Jackal (*Canis aureus*) in Serbia. *Biomed Res Int.* 728516.
36. Claborn David M, 2010. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J Glob Infect Dis.* 2: 127–134.

37. Colella V, Hodžić A, Iatta R, Baneth G, Alić A, Otranto D, 2019. Zoonotic Leishmaniasis, Bosnia and Herzegovina. *Emerg Infect Dis.* 25: 385–386.
38. Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, Ward J, Elnaiem D, Fischer L, Valenzuela J, Kamhawi S, 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog.* 5: e1000441.
39. Costa MA, Matheson C, Iachetta L, Llagostera A, Appenzeller O, 2009. Ancient leishmaniasis in a Highland Desert of Northern Chile. *PLoS ONE.* 4: e6983
40. Cray C, 2012. Acute phase proteins in animals. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 105: 113–150.
41. Dakić ZD, Pelemis MR, Stevanovic GD, Poluga JL, Lavadinovic LS, Milosevic IS, Indjic NK, Ofori-Belic IV, Pavlovic MD, 2009. Epidemiology and diagnostics of visceral leishmaniasis in Serbia. *Clin Microbiol Infect.* 15: 1173–1176.
42. Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, Cardoso L, Day MJ, Dobler G, Ferrer L, Irwin P, Jongejan F, Volkhard AJ, Kohn KB, Lappin M, Little S, Madder M, Maggi R, Maia C, Marcondes M, Naucke T, Oliva G, Pennisi MG, Penzhorn BL, Peregrine A, Pfeffer M, Roura X, Sainz A, Shin SS, Solano-Gallego L, Straubinger RK, Tasker S, Traub R, Wright I, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D, 2019. Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerg Infect Dis.* 25: 1–4.
43. Daza González MA, Fragió Arnold C, Fermín Rodríguez M, Checa R, Montoya A, Portero Fuentes M, Rupérez Noguer C, Martínez Subiela S, Cerón JJ, Miró G, 2019. Effect of two treatments on changes in serum acute phase protein concentrations in dogs with clinical leishmaniosis. *Vet J.* 245: 22-28.
44. De Oliveira FA, Silva CVO, Damascena NP, Passos RO, Duthie MS, Guderian JA, 2013. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 13: 331.
45. De Sousa Gonçalves R, de Pinho FA, Dinis-Oliveira RJ, Mendes MO, de Andrade TS, da Silva Solcà M, Larangeira DF, Silvestre R, Barrouin-Melo SM, 2021. Nutritional adjuvants with antioxidant properties in the treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 298: 109526.
46. De Vaconcelos T, Furtado M, Belo V, Morgado F, Figueiredo F, 2019. Canine susceptibility to visceral leishmaniosis: a systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infect Genet Evol.* 74: 103293.

47. Deak E, Jayakumar A, Cho KW, Goldsmith-Pestana K, Dondji B, Lambris JD, McMahon-Pratt D, 2010. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur J Immunol.* 40:1355–1368.
48. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ, 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 67: 2576–2597.
49. Dostálová A, Volf P, 2012. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors.* 5: 276.
50. Dvorak V, Kasap OE, Ivovic V, Mikov O, Stefanovska J, Martinkovic F, Omeragic J, Pajovic I, Baymak D, Oguz G, Hlavackova K, Gresova M, Gunay F, Vaselek S, Ayhan N, Lestinova T, Cvetković A, Klaric Soldo D, Katerinova I, Tchakarova S, Yılmaz A, Karaoglu B, Iranzo JR, Kadriaj P, Velo E, Ozbel Y, Petrić D, Volf P, Alten B, 2020. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in eight Balkan countries: historical review and region-wide entomological survey. *Parasit Vectors.* 13: 573.
51. Eckersall PD, Bell R, 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 185: 23–27.
52. Esch KJ, 2013. Mechanisms of immunity and pathology during canine leishmaniasis: Leading the way to prevention and treatment. PhD thesis, Iowa State University, Ames, Iowa.
53. Fernández MM, Malchiodi EL, Algranati ID, 2011. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 86–93.
54. Fontana VA, Sanchez M, Cebal E, Calvo JC, 2010. Interferon-gamma inhibits metalloproteinase activity and cytotrophoblast cell migration. *Am J Reprod Immunol.* 64: 20–26.
55. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot F, Rivollet D, Deniau M, Pratlong F, Costa JM, Bretagne S, 2007. Detection and identification of Leishmania species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene. *J Clin Microbiol.* 45: 2110–2115.
56. Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalicka MSM, 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol.* 137: 159–167.
57. Ganguly P, Alam SF, 2015. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J.* 14: 6.
58. Gannavaram S, Bhattacharya P, Ismail N, Kaul A, Singh R, Nakhasi HL, 2016. Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules. *Front Immunol.* 7: 187.

59. Geisweid K, Mueller R, Sauter-Louis C, Hartmann K, 2012. Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. *Vet Rec.* 171: 399.
60. Gizzarelli M, Fiorentino E, Ben Fayala NEH, Montagnaro S, Torras R, Gradoni L, Oliva G, Foglia Manzillo V. 2020. Assessment of circulating immune complexes during natural and experimental canine leishmaniasis. *Front Vet Sci.* 19: 273.
61. Gołyński M, Lutnicki K, Krumrych W, Szczepanik M, Gołyńska M, Wilkołek P, Adamek Ł, Sitkowski Ł, Kurek Ł, 2017. Relationship between total homocysteine, folic acid, and thyroid hormones in hypothyroid dogs. *J Vet Intern Med.* 31: 1403–1405.
62. Gonçalves AAM, Leite JC, Resende LA, da Silveira Mariano RM, Silveira P, de Oliveira Melo-Júnior OA, Ribeiro HS, de Oliveira DS, Soares DF, Santos TAP, Marques AF, Galdino AS, Martins-Filho OA, Dutra WO, da Silveira-Lemos D, Giunchetti RC, 2019. An overview of immunotherapeutic approaches against canine visceral leishmaniasis: what has been tested on dogs and a new perspective on improving treatment efficacy. *Front Cell Infect Microbiol.* 9: 427.
63. 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.* 9759735.
64. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA, 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 33: 1027–1034.
65. Grimm F, Gessler M, Jenni L, 1993. Aspects of sandfly biology in southern Switzerland. *Med Vet Entomol.* 7: 170–176.
66. Grützner N, Suchodolski JS, Steiner JM, 2014. Relationship between cobalamin-dependent metabolites and both serum albumin and alpha1-proteinase inhibitor concentrations in hypocobalaminemic dogs of 7 different breeds. *Vet Clin Pathol.* 43: 561–566.
67. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA i Koopmans SJ, 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 6: 1045–1056.
68. Guillevin L, Dörner T, 2007. Vasculitis: mechanisms involved and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther.* 9: S9.
69. Güran M, 2018. An overview of Leishmaniasis: Historic to future perspectives. In *Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases*, Intechopen, <https://www.intechopen.com/chapters/64068> (pristupljeno 11.12.2021.)
70. Hamel D, Shukullari E, Rapti D, Silaghi C, Pfister K, Rehbein S, 2016. Parasites and vector-borne pathogens in client-owned dogs in Albania. *Blood pathogens and*

- seroprevalences of parasitic and other infectious agents. *Parasitol Research*. 115: 489–499.
71. Handjani F, La Kumar P, Khosroara M, Sadati MS, 2017. The frequency of vascular changes in the histopathology of cutaneous leishmaniasis. *Hormozgan Med J*. 21: 147–152.
 72. Harris JE, Fernandez-Vilaseca M, Elkington PT, Horncastle DE, Graeber MB, Friedland JS, 2007. IFN gamma synergizes with IL-1beta to up-regulate MMP-9 secretion in a cellular model of central nervous system tuberculosis. *FASEB J*. 21: 356–365.
 73. Hernández L, Bolás-Fernández F, Montoya A, Checa R, Dado D, Gálvez R, Serrano DR, Torrado JJ, Otranto D, Latrofa MS, Miró G, 2015. Unresponsiveness of experimental canine leishmaniasis to a new Amphotericin B formulation, *Advances in Pharmaceutics*. 160208.
 74. Hosein S, Blake D, Solano-Gallego L, 2017. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniasis. *Parasitology*. 144: 95–115.
 75. https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/341970/MANUAL-ON-CASE-MANAGEMENT_FINAL_with-cover-and-ISBN.pdf (pregledano 04.02.2021).
 76. Hussaini N, Okuneye K, Gumel B A, 2017. Mathematical analysis of a model for zoonotic visceral leishmaniasis. *Infect Dis Model*. 2: 455–474.
 77. Ivočić V, Ivočić M, Miscević Z, 2003. Sandflies (*Diptera: Psychodidae*) in the Bar area of Montenegro (Yugoslavia). *Ann Trop Med Parasitol*. 97: 193–197.
 78. Jacintho APP, D Melo GD, Machado GF, Bertolo PHL, Moreira PRR, Momo C, 2018. Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 117: 1819–1827.
 79. Jain S, Gautam V, Naseem S, 2011. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci*. 3: 118–127.
 80. Janjić F, 2021. Odgovor akutne faze kod pasa obolelih od babezioze tokom različitih godišnjih doba i veza pojave akutnog oboljenja sa meteorološkim parametrima, doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
 81. Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B, 2015. Canine leishmaniasis – an emerging disease. *Ann Parasitol*. 61: 69–76.
 82. Kather S, Grützner N, Kook PH, Dengler F, Heilmann RM, 2020. Review of cobalamin status and disorders of cobalamin metabolism in dogs. *J Vet Intern Med*. 34: 13–28.

83. Killick-Kendrick R, 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 17: 279–289.
84. Koderá T, Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kobayashi H, 2000. The expression and activation of matrix metalloproteinase-2 in rat brain after implantation of C6 rat glioma cells. *J Neurooncol.* 46:105–114.
85. Koutinas AF, Koutinas CK, 2014. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol.* 51: 527–538.
86. Lawyer P, Killick-Kendrick M, Rowland T, Rowton EI, Volf P, 2017. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (*Diptera, Psychodidae*). *Parasite.* 24: 42.
87. Lee CM, Jeong DM, Kang MH, Kim SG, Han JI, Park HM, 2017. Correlation between serum homocysteine concentration and severity of mitral valve disease in dogs. *Am J Vet Res.* 78: 440–446.
88. Leonel JAF, Tannihão B, Assis Arantes J, Vioti G, Benassi JC, Ariboni Brandi R, Lage Ferreira H, Borges Keid L, Soares RM, Ferreira de Sousa Oliveira TM, 2021. Detection of *Leishmania infantum* DNA in blood samples of horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) by PCR. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 63: e12.
89. Lewis DJ, 1974. The biology of *Phlebotomidae* in relation to Leishmaniasis, *Annu Rev Entomol.* 19: 363–384.
90. Liu D, Uzonna JE, 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2: 83.
91. Maia C, Campino L, 2012. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. *J Trop Med.* 541571.
92. Maia C, Campino L, 2018. Biomarkers associated with *Leishmania infantum* exposure, infection, and disease in dogs. *Front Cell Infect Microbiol.* 8: 302.
93. Mäkelä M, Salo T, Larjava H, 1998. MMP-9 from TNF alpha-stimulated keratinocytes binds to cell membranes and type I collagen: a cause for extended matrix degradation in inflammation? *Biochem Biophys Res Commun.* 253: 325–335.
94. Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE, 2015. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors.* 8: 289.
95. Marette-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C, 2011. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is

- associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 163: 207–214.
96. Margarito JM, Lucena R, López R, Molleda JM, Martín E, Ginel PJ, 1998. Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B.* 45: 263–267.
 97. Marol M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charre RN, Gradoni L, 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 27: 123–147.
 98. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D, Dayer M, 2017. Homocysteine-lowering interventions (B-complex vitamin therapy) for preventing cardiovascular events. *Available at:* https://www.cochrane.org/CD006612/VASC_homocysteine-lowering-interventions-b-complex-vitamin-therapy-preventing-cardiovascular-events
 99. Martínez-Subiela S, Ceron JJ, 2005. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment, *Vet Med Czech.* 50: 39–46.
 100. Martínez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Cerón JJ, 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec.* 150: 241–244.
 101. Martín-Martín I, Molina R, Rohoušová I, Drahota J, Volf P, Jiménez M, 2014. High levels of anti-Phlebotomus perniciosus saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniasis focus in Madrid, Spain. *Vet Parasitol.* 202: 207–216.
 102. Marčić D, Žekić-Stošić M, Milošević S, Pušić I, Potkonjak A, Tasić-Otašević S, Savić S. Seroprevalencija *Leishmania* spp. kod pasa u severnoj Srbiji. *Veterinarski glasnik* 2020; 74: 187–193.
 103. 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.
 104. Maxfield L, Crane JS, 2021. Leishmaniasis. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
 105. Medenica S, 2016. Leishmaniosis – Lajšmanioza, *Medical CG*, 92, Dostupno na <https://medicalcg.me/leishmaniosis-lajšmanioza/> (pristupljeno 17.01.2023).
 106. Medenica S, Jovanović S, Dožić I, Miličić B, Lakićević N, Rakočević B, 2015. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in Montenegro, 1992–2013, *Srp Arh Celok Lek.* 143: 707–711.

107. Medkour H, Davoust B, Dulieu F, Maurizi L, Lamour T, Marié JL, Mediannikov O, 2019. Potential animal reservoirs (dogs and bats) of human visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in French Guiana. PLoS Negl Trop Dis. 13: e0007456.
108. Meléndez-Lazo A, Ordeix L, Planellas M, Pastor J, Solano-Gallego L, 2018. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: comparison of five different clinical classification systems. Res Vet Sci. 117: 18–27.
109. Meleny HE, 1925. The histopathology of Kala-azar in hamster, monkey and man. Am J Pathol. 1: 147–168.
110. 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.
111. Melo GD, Marcondes M, Machado GF, 2012. Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase–2 in the development of neurological disease. Vet Immunol Immunopathol. 148: 260–266.
112. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P, 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. J Clin Microbiol. 43: 5515–5519.
113. Michelin A, Perri S, de Lima V, 2011. Evaluation of TNF-alpha, IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. Ann Trop Med Parasitol. 105: 373–383.
114. Miletić I, Milosavljević D, Kokanović V, 2017. Mešana infekcija parazitima *Anaplasma* spp. i *Leishmania infantum* praćena imunološki posredovanom anemijom – Prikaz slućaja – ishod. Udruženje veterinara male prakse Srbije, Bilten. 20: 9–12.
115. Mirejovský P, Bednár B, Kodetová D, Stejskal J, 1996. Visceral and cutaneous leishmaniasis. Cesk Patol, 32: 70–74.
116. Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G, 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol. 24: 371–377.
117. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J, 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet Parasitol. 190: 268–271.
118. Morales-Yuste M, Morillas-Márquez F, Díaz-Sáez V, Barón-López S, Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J, 2012. Epidemiological implications of the use of

- various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol Res.* 111: 155–164.
119. Moreno J, 2019. Assessment of vaccine-induced immunity against canine visceral leishmaniasis. *Front Vet Sci.* 6: 168.
 120. Mulić R, Ćustovic A, Ropac D, Tripković I, Stojanović D, Klišmanić Z, 2009. Occurrence of visceral and cutaneous leishmaniasis in Croatia. *Mil Med.* 174: 206.
 121. Mulvihill B, 2004, The role of vitamins B₆ and B₁₂ meat in lowering homocysteine. In Jensen WK, *Encyclopedia of Meat Sciences*, Elsevier.
 122. Muñoz-Prieto A, Tvarijonaviciute A, Escribano D, Martínez-Subiela S, Cerón JJ, 2017. Use of heterologous immunoassays for quantification of serum proteins: The case of canine C-reactive protein. *PLoS ONE.* 12: e0172188.
 123. Nascimento M, Albuquerque T, Do-Valle-Matta M, Caldas I, Diniz L, Talvani A, Bahia MT, Andrade CM, Galvão L, Câmara AC, Guedes P, 2013. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 153: 202–208.
 124. Naucke TJ, Lorentz S, 2012. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors.* 5: 67.
 125. Naucke TJ, Silke Amelung S, Lorentz S, 2016. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasit Vectors.* 9: 256.
 126. Olías-Molero AI, Moreno I, Corral MJ, Jiménez-Antón MD, Day MJ, Domínguez M, Alunda JM, 2020. Infection of dogs by *Leishmania infantum* elicits a general response of IgG subclasses. *Sci Rep.* 10: 18826.
 127. Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E, 2010. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 236: 1192–1198.
 128. Olivier M, Gregory DJ, Forget G, 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 18: 293–305.
 129. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT, 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 14: 1377–1389.
 130. Omeragić J, Hrvat H, Crnkić Ć, 2015. Occurrence of protozoa in dogs in the area of Tuzla. *Proceedings of the International Congress “One World-One Health-One Vision (2015/10)”*: 14–16.

131. Otranto D, Dantas-Torres F, 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 29; 339–345.
132. Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O, 2004. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 42: 2769–2770.
133. Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E, 2016. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol.* 45: 552–578.
134. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E; Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 236: 1184–1191.
135. Papadogiannakis E, Koutinas A, 2015. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 163: 94–102.
136. Pathan MM, Latif A, Das H, Vaidya MM, 2012. Acute phase protein – A useful marker of inflammation. *WJAS.* 1305183587
137. Patterson BE, Barr JW, Fosgate GT, Berghoff N, Steiner JM, Suchodolski JS, Black DM, 2013. Homocysteine in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Small Anim Pract.* 54: 620–624.
138. Pavićević Z, Laušević D, Pejović N, 2014. Seroprevalencija pasa na antigene *Leishmania infantum* na teritoriji Crne Gore. *Vet glasnik.* 68: 301–309.
139. Petersen C, 2020. Leishmaniosis in Dogs. MSD manual, <https://www.msdvetmanual.com/generalized-conditions/leishmaniosis/leishmaniosis-in-dogs> (pristupljeno 15.03.2020).
140. Petrela R, Kuneshka L, Foto E, Zavalani F, Gradoni L, 2010. Pediatric visceral leishmaniasis in Albania: A retrospective analysis of 1,210 consecutive hospitalized patients (1995–2009). *PLoS Negl Trop Dis.* 4: e814.
141. Proverbio D, Spada E, Baggiani L, Bagnagatti De Giorgi G, Perego R, 2013. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the Immunofluorescence antibody test for assaying *Leishmania infantum* antibodies in dogs. *Biomed Res Int.* 249010.
142. Pruzinova K, Sadlova J, Seblova V, Homola M, Votypka J, Volf P, 2015. Comparison of bloodmeal digestion and the peritrophic matrix in four sand fly species differing in susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS One.* 10: e0128203.

143. Quinnell RJ, Courtenay O, 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 136: 1915–1934.
144. Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C, 2016. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of cutaneous leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep*. 6: 28266.
145. Reis A, Martins-Filho O, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti R, Carneiro C, Mayrink W, Tafuri W, Corrêa-Oliveira R, 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 128: 87–95.
146. Reis A, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti R, Guerra L, Carvalho M, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho O, 2006. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*. 146: 303–311.
147. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 112: 102–116.
148. Reuss SM, 2013. Review of equine cutaneous leishmaniasis: Not just a foreign animal disease; *AAEP Proceedings*. 59: 256–260.
149. Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, dos Santos CCP, Frézard FJG, Sydney Magno da Silva SM, 2018. Canine leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. *BioMed Res Int*. 3296893.
150. Ridley MJ, Ridley DS, 1984. Cutaneous leishmaniasis: immune complex formation and necrosis in the acute phase. *Brit J Exp Pathol*. 65(3): 327–336.
151. Ríos-Marco P, Marco C, Gálvez X, Jiménez-López JM, Carrasco MP, 2017. Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1859: 1657-1667.
152. Roatt BM, Coura-Vital W, Ker HG, Dores Moreira N, Vitoriano-Souza J, Cordeiro Giunchetti R, Martins Carneiro C, Barbosa Reis A, 2014. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. *Front Immunol*. 5: 272.
153. Roque ALR, Jansen AM, 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 3: 251–262.
154. Ross R, 1903. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J*. 2: 1261–1262.

155. Rossi G, Giordano A, Breda S, Lisi C, Roura X, Zatelli A, Paltrinieri S, 2013. Big-endothelin 1 (big ET-1) and homocysteine in the serum of dogs with chronic kidney disease. *Vet J.* 198: 109–115.
156. Rossi G, Ibba F, Meazzi S, Giordano A, Paltrinieri S, 2014. Paraoxonase activity as a tool for clinical monitoring of dogs treated for canine leishmanias. *Vet J.* 199: 143–149.
157. Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L, 2014. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med.* 115: 56–63.
158. Sacks D, Noben-Trauth N, 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 11: 845–58.
159. Sadlova J, Dvorak V, Seblova V, Warburg A, Votypka J, Petr Volf P, 2013. *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans. *Parasit Vectors.* 6: 186.
160. Sadlova J, Myskova J, Lestinova T, Votypka J, Matthew Y, Volf P, 2017. *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote and amastigote-initiated infections. *Parasitology.* 144: 403–410.
161. Sádlová J, Volf P, 2009. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *Cell Tissue Res.* 337: 313–325.
162. Sakata K, Satoh M, Someya M, Asanuma H, Nagakura H, Oouchi A, Nakata K, Kogawa K, Koito K, Hareyama M, Himi T, 2004. Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer.* 100: 356–365.
163. Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O, 2005. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered.* 96: 755–758.
164. Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O, 2008. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res.* 39: 36.
165. Santos MF, Alexandre-Pires G, Maria A, Pereira MA, Marques CS, Gomes J, Correia J, Duarte A, Gomes L, Rodrigues AV, Basso A, Reisinho A, Meireles J, Santos-Mateus D, Villa Brito MT, Tavares L, Santos-Gomes GM, Pereira da Fonseca I, 2019. Meglumine antimoniate and miltefosine combined with allopurinol sustain pro-inflammatory immune environments during canine leishmaniosis treatment. *Front Vet Sci.* 6: 362.

166. Savić S, Vidić B, Grgić Z, Petrović T, Potkonjak A, et al., 2015. Dirofilariosis and leishmaniasis in the northern region of Serbia. In: An Overview of Tropical Diseases, Samie A, ed, Intech Open, pp. 1094–1122.
167. Savić S, Vidić B, Grgić Ž, Potkonjak A, Spasojević Lj, 2014. Emerging vector-borne diseases – Incidence through vectors. *Front Public Health*. 2: 267.
168. Schmidt ESM, Eckersall D, 2015. Acute phase proteins as markers of infectious diseases in small animals. *Acta Vet*. 65: 149–161.
169. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME, 2017. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *Int J Mol Sci*. 18: 1296.
170. Seomun Y, Kim JT, Joo CK, 2008. MMP-14 mediated MMP-9 expression is involved in TGF-beta1-induced keratinocyte migration. *J Cell Biochem*. 104:934–941.
171. Stearns ME, Wang M, Hu Y, Garcia FU, Rhim J, 2003. Interleukin 10 blocks matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1-matrix metalloproteinase synthesis in primary human prostate tumor lines. *Clin Cancer Res*. 9: 1191–1199.
172. Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi M, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, Miro G, Ferrer L, Baneth G, 2017. Diagnostic challenges in the era of *canine Leishmania infantum* vaccines. *Trends Parasitol*. 33: 706–717.
173. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 165: 1–18.
174. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Luis Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 4: 86.
175. Solano-Gallego L, Montserrat-Sangrà S, Ordeix L, Martínez-Orellana P, 2016. *Leishmania infantum* – specific production of IFN γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 9: 317.
176. Spariosu K, 2022. Ispitivanje funkcionalne aktivnosti leukocita kod pasa prirodno inficiranih protozom *Babesia canis*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
177. Stefanovska J, Dzadzovski I, Krstevski K, Rashik Lj, Cvetković A, Radevski M, 2016. Parasitological findings of some parasitic zoonotic diseases in 2015 in R. Macedonia, Research Gate, Conference paper: Workshop of NRL for parasites At: Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, May 2016; Volume: 11
178. Stevarding D, 2017. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 10: 82.
179. Suryawanshi VD, Kharate DS, 2021. *Advances in Parasitology – Protozoology & Helminthology*, Bhilai, Chhattisgarh, India: Orange Books Pulication, page 39.

180. Taler-Verčič A, Goličnik M, Bavec A, 2020. The structure and function of paraoxonase-1 and its comparison to paraoxonase-2 and -3. *Molecules*. 25: 5980.
181. Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, Seitz A, Elnaiem D, Caldas A, de Souza APA, Brodskyn C, de Oliveira CD, Mendonca I, Costa C, Volf P, Barral A, Kamhawi S, Valenzuela J, 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 4: e638.
182. Torrecilha R, Utsunomiya Y, Bosco A, Almeida B, Pereira P, Narciso L, Pereira DCM, Baptistioli L, Calvo-Bado L, Courtenay O, Nunes CM, Ciarlini PC, 2016. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med*. 132: 83–87.
183. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenasa R, 2017. Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 6: 750.
184. Toussaint MJM, van Ederen AM, Gruys E, 1995. Implication of clinical pathology in assessment of animal health and in animal production and meat inspection. *Comp Haematol Int*. 5: 149–157.
185. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G, 2018. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*. 12: e0006082.
186. Travi BL, Miró G, 2018. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 113: e180301.
187. Tuon FF, Neto VA, VS, 2008. Leishmania: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 54: 158–166.
188. Vaselek S, Ayhan N, Oguz G, Erisoz Kasap O, Savić S, Di Muccio TT, Gradoni L, Ozbek Y, Alten B, Petrić D, 2017. Sand fly and *Leishmania* spp. survey in Vojvodina (Serbia): first detection of *Leishmania infantum* DNA in sand flies and the first record of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassi*. 1908. *Parasit Vectors*. 10: 444.
189. Velo E, Bino S, Kuli-Lito G, Pano K, Gradoni L, Maroli M, 2003. Recrudescence of visceral leishmaniasis in Albania: retrospective analysis of cases during 1997 to 2001 and results of an entomological survey carried out during 2001 in some districts. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 97: 288–290.
190. Velo E, Bongiorno G, Kadriaj P, Myrseli T, Crilly J, Lika A, Mersini K, Di Muccio T, Bino S, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M, 2017. The current status of phlebotomine sand flies in Albania and incrimination of *Phlebotomus neglectus* (Diptera, Psychodidae) as the main vector of *Leishmania infantum*. *PLoS ONE*. 12: e0179118.

191. Veras PST, Fraga DBM, da Silva Solcà M, Guedes CES, 2014. New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis, available at: <https://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/new-advances-in-the-diagnosis-of-canine-visceral-leishmaniasis> (pristupljeno 07.04.2020).
192. Veress B, el-Hassan AM, 1986. Vascular changes in human leishmaniasis: a light microscopic and immunohistological study. *Ann Trop Med Parasitol.* 80: 183–188.
193. Wellcome Collection 1 <https://wellcomecollection.org/works/v5kdce4a> CC-BY4.0 (pristupljeno 21.12. 2021.g)
194. Wellcome Collection 2 <https://wellcomeimages.org/indexplus/image/V0026304.html> (pristupljeno 21.12. 2021)
195. WHO 1, 2020. https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ (pristupljeno 24.03.2020).
196. WHO 2, 2020. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (pristupljeno 15.03.2020).
197. WHO 3, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (pristupljeno 08.05.2020).
198. WHO 4, 2022. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis> (pristupljeno 14.01.2022)
199. WHO 5, https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/341970/MANUAL_ON-CASE-MANAGEMENT_FINAL_with-cover-and-ISBN.pdf (pristupljeno 30.01.2021)
200. WHO 6, 2017. Priručnik za upravljanje slučajevima i nadzor leishmaniasa u europskoj regiji, WHO.
201. WHO 7, https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Albania/en/ (pregledano 10.02.2021).
202. Wu JT, 2007. Circulating homocysteine is an inflammation marker and a risk factor of life-threatening inflammatory diseases. *J Biomed Lab Sci.* 19: 107–112.
203. Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Baneth G, 2016. Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. *PLoS Negl Trop Dis.* 10: e0004341.
204. Zijlstra E, 2014. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with leishmaniasis: Review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 8: e3258.

205. Živičnjak T, Martinković F, Marinculić A, Mrljak V, Kučer N, Matijatko V, Mihaljević Z, Barić-Rafaj R, 2005. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet Parasitol.* 131: 35–43.
206. Šiško-Kraljević K, Jerončić A, Mohar B, Punda-Polić V, 2013. Asymptomatic *Leishmania infantum* infections in humans living in endemic and non-endemic areas of Croatia, 2007 to 2009. *Euro Surveill.* 18: 20533.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: MILUTIN ANTIĆ

Broj upisa: __

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

POVEZANOST KONCENTRACIJE PROTEINA AKUTNE FAZE I FAKTORA KOJI
UTIČU NA FUNKCIJU ENDOTELA KOD PASA PRIRODNO INFICIRANIH
PROTOZOOM *LEISHMANIA* SPP.

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, _____

Potpis doktoranda

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: MILUTIN ANTIĆ

Broj upisa _____

Studijski program: Doktorske akademske studije

Naslov rada: POVEZANOST FAKTORA KOJI UTIČU NA FUNKCIJU ENDOTELIJUMA I KONCENTRACIJU PROTEINA AKUTNE FAZE KOD PASA PRIRODNO INFICIRANIH PROTOZOOM *Leishmania* spp.

Mentor: Prof. dr Milica Kovačević Filipović, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Potpisani _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma 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.

U Beogradu, _____

Potpis doktoranda

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

POVEZANOST FAKTORA KOJI UTIČU NA FUNKCIJU ENDOTELIJUMA I KONCENTRACIJU PROTEINA AKUTNE FAZE KOD PASA PRIRODNO INFICIRANIH PROTOZOOM *Leishmania* spp.

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, _____

Potpis doktoranda

Biografija autora

Antić Milutin rođen je 20.10.1954. godine u Jagodini. Osnovnu školu završio je u Jagodini, a srednju medicinsku školu u Čupriji. Diplomirao je na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 06. februara 1980. godine. Marta 1980. godine zasniva radni odnos u Centru za proizvodnju ćuraka na radnom mestu - rukovodilac zdravstvene zaštite. Od 1983. do 2006. godine radio je u Veterinarskoj stanici Jagodina na radnom mestu veterinar – direktor. U međuvremenu, 1993.godine završava specijalizaciju iz zdravstvene zaštite mesojeda na Veterinarskom fakultetu u Beogradu. Magistarske studije na istom fakultetu završio je 1995. godine. Od 2006. do 2011.godine na mestu je direktora JP Zoološki vrt Jagodina. Od 2011. do 2014. godine radi u sopstvenoj veterinarskoj ambulanti za male životinje. Od 2014. godine u Crnoj Gori zaposlen je u privatnoj veterinarskoj ambulanti „Toplica“ u Ulcinju. Od 2018.godine zaposlen je u preduzeću „Komunalne djelatnosti“ Bar.

Njegov profesionalni angažman je obeležen višestrukim aktivnim učešćem na stručnim skupovima, seminarima i kongresima u zemlji i inostranstvu.

Autor je i koautor više stručnih radova.