



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Siniša Mandek

**PROTEOMSKA ANALIZA JETRE JELENA
LOPATARA (*DAMA DAMA*) INVADIRANIH
METILJEM *FASCIOLOIDES MAGNA***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Siniša Mandek

**PROTEOMIC ANALYSIS OF THE LIVER IN FALLOW
DEER (*DAMA DAMA*) INFECTED WITH FLUKE
*FASCIOLOIDES MAGNA***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Siniša Mandek

**PROTEOMSKA ANALIZA JETRE JELENA
LOPATARA (*DAMA DAMA*) INVADIRANIH
METILJEM *FASCIOLOIDES MAGNA***

DOKTORSKI RAD

Mentorica:
doc. dr. sc. Josipa Kuleš

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Siniša Mandek

**PROTEOMIC ANALYSIS OF THE LIVER IN FALLOW
DEER (*DAMA DAMA*) INFECTED WITH FLUKE
*FASCIOLOIDES MAGNA***

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Josipa Kuleš, PhD, Assistant Professor

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Siniša Mandek, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat
mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/-la drugim
izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis)

Zagreb, 28. 2. 2024.

Doktorski rad izrađen je na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentorica:

doc. dr. sc. Josipa Kuleš

Predstojnica:

doc. dr. sc. Iva Šmit

Doktorski rad ima:

91 stranicu,

17 slika,

1 tablicu.

INFORMACIJE O MENTORU

Doc. dr. sc. Josipa Kuleš, mag. med. biokem., zaposlena je kao docentica na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu. Dr. sc. Kuleš završila je studij medicinske biokemije 2008. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, a doktorirala na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu 2014. godine. Njezini znanstveni interesi su istraživanja zoonoza i primjena omika tehnologija u veterinarskoj medicini. Tijekom doktorskog studija usavršavala se u području proteomike kroz nekoliko višemjesečnih boravaka u Glasgowu (Ujedinjeno Kraljevstvo) i Murciji (Španjolska). Nakon stjecanja doktorata zaposlena je kao iskusni istraživač na EU FP7 projektu VetMedZg („Upgrading the research performance in molecular medicine at the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb”). Sudjelovala je na više međunarodnih i nacionalnih znanstvenih projekata. Doc.dr. sc. Kuleš tehnička je urednica znanstvenog časopisa iz biomedicinskog područja *Biochemia Medica*, te članica znanstvenog uredničkog odbora Veterinarskog glasnika. Dobitnica je godišnje nagrade za najboljeg mladog znanstvenika, za znanstveni rad u 2014-oj i 2016-oj godini, od strane Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Autorica je više od 50 znanstvenih radova i preko 40 sažetaka na međunarodnim i nacionalnim znanstvenim skupovima.

Poveznice na radove:

<https://www.bib.irb.hr/pretraga?operators=and|Kule%C5%A1,%20Josipa%20%2824556%29|text|profile>

<https://scholar.google.com/citations?user=ZVzVbv8AAAAJ&hl=en>

ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Josipi Kuleš, mag. med. biokem., na znanstvenom i stručnom usmjeravanju, nesebičnoj pomoći i razumijevanju tijekom izrade ovoga doktorskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Vladimiru Mrljaku, dr. med. vet., na ustupanju proteomskog laboratorija za potrebe ovoga istraživanja i članovima Laboratorija za proteomiku za pomoć pri proteomskim analizama.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Deanu Konjeviću, dr. med. vet., na pomoći i savjetima koji su doprinijeli kvaliteti ovoga rada.

Zahvaljujem se i Hrvatskoj zakladi za znanost, projektu IP 8963 "Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna*", u sklopu kojega je provedeno predmetno istraživanje.

Zahvaljujem mojoj obitelji, supruzi Denis i kćerki Emi, sinovima Filipu i Jakovu na razumijevanju, pomoći i ljubavi koja mi je bila snažan oslonac i podrška tijekom svih godina moga stručnog i znanstvenog rada.

POPIS PRILOGA – SLIKE

Slika 1. Jeleni lopatari u magli (foto: D. Konjević).....	4
Slika 2. Jelen lopatar, mužjak s rogovljem u bastu (foto: D. Konjević).....	5
Slika 3. Trofej, rogovlje jelena lopatara (foto: D. Konjević).....	9
Slika 4. Spolno nezreli metilji <i>F. magna</i> (foto: d. Konjević)	14
Slika 5. Invadirana jetra jelena lopatara (foto: K. Jerabek)	26
Slika 6. Pregled jetre jelena lopatara s vidljivom propalom pseudocistom (foto: K. Jerabek)	27
Slika 7. Kalibracijska krivulja za izračun ukupne koncentracije proteina u uzorcima jetre jelena lopatara	28
Slika 8. Invadirana jetra jelena lopatara s vidljivim zamućenjem kapsule, naslagama fibrina, nepravilnom površinom i tragovima pigmenta željezo - porfirina (foto: K. Jerabek)	33
Slika 9. Propala pseudocista. (foto: K. Jerabek)	34
Slika 10. Pseudocista u jetri jelena lopatara. (foto: K. Jerabek)	34
Slika 11. Rezultati analize glavnih komponenata u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem <i>F. magna</i> (N = 14) i zdravih jelena (N = 13) analiziranih LC-MS proteomskim pristupom.....	35
Slika 12. Raspršeni grafički prikaz (engl. <i>volcano plot</i>) različito eksprimiranih proteina u jetri jelena lopatar invadiranih metiljem <i>F. magna</i> u odnosu na kontrolnu skupinu	36
Slika 13. Grafički prikaz ontologije za biološki proces različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem <i>F. magna</i> i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0.....	41
Slika 14. Grafički prikaz genske ontologije za staničnu lokalizaciju različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem <i>F. magna</i> i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0.	42

Slika 15. Grafički prikaz genske ontologije za molekularnu funkciju različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem <i>F. magna</i> i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0.	43
Slika 16. Prikaz značajno obogaćenih bioloških puteva s najmanje 5 gena po putu povezan s <i>F. magna</i> invazijom kod jelena lopatara napravljen pomoću alata Reactome.	44
Slika 17. Mrežni prikaz povezanosti i interakcija različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem <i>F. magna</i> i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0.	45

POPIS PRILOGA – TABLICE

Tablica 1. Tablični prikaz različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* (N = 14) i zdravih jelena (N = 13) analiziranih LC-MS proteomskim pristupom. Prikazan je identifikacijski broj proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt, oznaka gena, naziv proteina, P vrijednost (Mann-Whitney test) i razlika u ekspresiji (log2FC).....37 - 40

SAŽETAK

Jelen lopatar (*Dama dama* L.) je divlji preživac široko rasprostranjen u Europi i Hrvatskoj te je kao takav izrazito važan za lovno gospodarstvo i turizam. Fascioloidoza je parazitska bolest uzrokovana neautohtonim metiljem *Fascioloides magna*, također poznatim i kao veliki američki jetreni metilj. Cilj ovoga istraživanja bila je usporedba proteoma jetre lopatara neinvadiranih i invadiranih metiljem *F. magna* primjenom tandemne spektrometrije masa spregnute s tekućinskom kromatografijom. Ukupno je uzorkovano 13 uzoraka jetri zdravih jedinki i 14 uzoraka tkiva jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* u dobi od dvije godine ili više. Statistička analiza provedena je korištenjem R programa v.4.1.2., a razlike između skupina ispitane su neparametrijskim Mann–Whitneyevim U testom, s razinom značajnosti $p < 0,05$. Za bioinformatičku analizu korištena je bioinformatička platforma STRINGdb v12.0, dok je analiza bioloških puteva povezanih s značajno promijenjenima proteinima jetre jelena lopatara provedena pomoću alata Reactome.

Analiza proteomskih podataka pokazala je da je ukupno identificirano 520 proteina, dok je statistička analiza pokazala da se 50 proteina razlikuje u zastupljenosti (izražajnosti) između kontrolne i *F. magna* invadirane skupine, pri čemu je utvrđeno 28 proteina s višom, a 22 proteina s nižom ekspresijom u invadiranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

Proteomsko profiliranje jetre jelena lopatara omogućuje uvid u složene međudnose nositelja i parazita, s obzirom da je patogeneza fascioloidoze kod konačnih nositelja povezana s oštećenjem jetre zbog prisutnosti migratornih kanala i pseudocista, kao i s imunosnim reakcijama nositelja na molekule izlučene od strane parazita. Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da je kronična invazija metiljem *F. magna* povezana s imunosnim odgovorom nositelja, oksidativnim stresom, fibrozom, translacijskom aktivnošću i promjenama u energetsom metabolizmu u jetri. Identificirani proteini i povezani biološki putevi predstavljaju vrijedan doprinos razumijevanju interakcija nositelj-parazit i patogeneze invazije jetrenim metiljem.

Ključne riječi: jelen lopatar; proteomika; proteom jetre; jetreni metilj; interakcije nositelj–parazit

EXTENDED ABSTRACT

INTRODUCTION

The fallow deer (*Dama dama* L.) is a wild ruminant from the Cervidae family distributed in parts of Asia and Europe, including Croatia and, as such, is extremely important for the hunting economy and tourism. The fallow deer is an allochthonous (non-native) species in Europe, which means that it is not initially present on that continent. It was introduced from its natural range, Asia Minor, to various European countries.

Parasites are a natural part of the ecosystem and play an essential role in maintaining the balance in nature. They are an inevitable and integral part of the life of wild animals. Parasites can affect the behaviour, health and population dynamics of wildlife, and their presence in wild populations is often used as an indicator of ecosystem health. Fascioloidosis is a parasitic disease caused by the non-indigenous fluke species *Fascioloides magna*.

This study compared the liver proteome of fallow deer infected and non-infected with *F. magna*, using tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography. Proteomic profiling of fallow deer liver provided insight into complex host-parasite interactions while identifying proteins and biological pathways associated with invasion helped to understand the pathophysiology of the process itself. The research results can be applied to monitor and control the health and productivity of animals and contribute to developing new tools for managing, monitoring, and treating fluke in the deer population.

REVIEW OF THE CURRENT KNOWLEDGE

Fascioloidosis is a parasitic disease that affects deer and other ruminants and is caused by the non-native parasite *F. magna*, also known as the giant American liver fluke. This disease has significant implications for wild and domestic animals, namely the management of game and domestic animal husbandry. *Fascioloides magna*, the causative agent of this disease, is a species of liver fluke that parasitizes and develops in the liver of infected animals, where it causes macroscopic and microscopic lesions, which can lead to severe liver damage and difficulties in its functioning.

Proteomics, given its complexity and multidisciplinary nature, plays a crucial role in various areas of biomedical research, including identifying disease biomarkers, understanding disease

mechanisms, discovering new therapeutic targets, and developing personalized medicine. Proteomics deals with the analysis of the proteome - the complete set of proteins expressed in a cell, tissue or organism, which plays a crucial role in understanding biological processes and diseases. The proteome includes all proteins present in a specific cell type, tissue or organism at a particular time, providing insight into the functional status of a biological system.

Proteomic studies in wild animals are still relatively rare. Research on deer tissues has focused on understanding antler growth and meat quality.

Most of the previous fluke-related proteomic studies focused on the proteomic analysis of soluble products of the liver fluke *Fasciola hepatica* and the parasite itself. For the fluke *F. magna*, the transcriptome and the excretory and secretory proteome of sexually mature flukes were determined. They determined 835 proteins, of which 80 were recognized as excretory and secretory products of this fluke, including antioxidants, peptidases and proteins involved in carbohydrate metabolism. Data on host-parasite interactions are relatively scarce. A recent iTRAQ-based quantitative proteomic study investigated serum changes in water buffalo infected with the fluke *Fasciola gigantica*. Comparative analysis of serum and liver proteomes of wild boars invaded by the *F. magna* showed host proteome changes at the local and systemic level, identifying proteins associated with host immune response, oxidative stress and metabolic changes. Changes in the metabolism of proteins and fatty acids, modifications related to oxidative stress, fibrosis and metabolism signalling pathways were shown in red deer invaded by *F. magna*. Considering all of the above, it should be pointed out that there is no information in the available scientific literature on the analysis of the proteome in fallow deer infected by *F. magna*.

HYPOTHESIS AND AIMS OF THE RESEARCH

The application of a semi-quantitative proteomic approach will enable the analysis of the liver proteome profile in fallow deer (*Dama dama*). The research hypothesis is that there are differences in the liver proteome profile between the control group of fallow deer and those infected by *Fascioloides magna*, with the expectation that proteins involved in energy metabolism and oxidative stress will predominate in the invaded group.

The main research objectives are:

- a) to conduct a semi-quantitative proteomic analysis of liver proteins in fallow deer

- b) to compare the liver proteome of the control group with the group infected by *F. magna*
- c) to perform bioinformatic analysis of significantly altered proteins and the biological pathways associated with them.

MATERIAL AND METHODS

The study was funded by the Croatian Science Foundation project IP 8963 "Host-parasite interaction: the relationship between three different hosts and *Fascioloides magna* infection". The Committee for Ethics in Veterinary Medicine approved the research (Class: 640-01118-17/60, Reg. number: 251-61-44-18-02)

In this study, the sample size was calculated based on the meta-analysis of literature data using online available statistical calculators. The health status of the deer was assessed based on the external appearance, fattening condition, the appearance of the hair cover and behaviour of the individual before the actual shooting, and after the shooting based on the presence of any visible wounds, discharge from natural openings and after *post-mortem* examination based on the macroscopic appearance of the organs. Liver samples were collected during evisceration of the animals. Tissue samples were labeled and stored at -80 °C until further analysis. Altogether, 13 liver samples from healthy individuals and 14 liver tissue samples from fallow deer infected with *F. magna* were collected.

Proteomic analysis of liver samples was performed using a semi-quantitative proteomic approach with isobaric tags that enable multiplexing - simultaneous analysis of ten samples according to the previously described protocol. Samples labelled with tandem mass tags (TMT) were analysed using Dionex UltiMate 3000 RSLCnano system coupled to a Q Exactive Plus mass spectrometer with a hybrid quadrupole and Orbitrap mass analyser by the data dependent acquisition (DDA) procedure. The SEQUEST algorithm within the software Proteome Discoverer was used for protein identification and relative quantification. The *Cervidae* database downloaded from UniprotKB, which contained 105,671 entries, was searched according to the following parameters: two missed trypsin cleavage sites allowed, an error tolerance of the measured mass of precursors and fragments of 10 ppm and 0.05 Da, carbamidomethyl as a fixed peptide modification, oxidation and TMT sixplex as dynamic peptide modifications. The percentage of false discovery rate (FDR) during peptide identification was calculated using the Percolator algorithm within the Proteome Discoverer.

Proteins with at least two unique peptides and 1% FDR were considered reliably identified and were used in further analyses. Proteins that were present in at least 50% of the samples were included in statistical analysis. Since the majority of identified proteins did not follow a normal distribution (as determined by the Shapiro-Wilk test), the differences between the groups were tested using the non-parametric Mann–Whitney U test, with a significance level of $p < 0.05$.

For bioinformatic analysis, the unique protein ID was first converted to the official gene symbol using the UniProtKB ID mapping tool. Proteins for which there was no deer gene annotation or were listed as “uncharacterized protein” were replaced using the UniProt BLAST tool with the closest matching ortholog from the *Bos taurus* database (at least 70% match). Gene Ontology (GO) functional analysis was performed using the STRINGdb v12.0 tool. Analysis of biological pathways associated with the liver proteome was performed using the Reactome tool with the human genome as background and pathways with $FDR < 0.05$ were selected as significant.

RESULTS

Using a proteomic approach based on TMT labelling, 27 liver samples were analysed. Analysis showed that a total of 520 proteins were identified using at least two unique peptides and with 1% FDR. Only proteins present in at least 50% of the samples were included in further statistical and bioinformatic processing.

Statistical analysis of the proteins identified by the proteomic approach showed that 50 proteins differed in abundance between the control and *F. magna* infected groups, whereby 28 proteins were more and 22 proteins less abundant in the invaded group compared to the control group.

Gene ontology for biological process showed that the largest number of genes ($N = 37$) is involved in metabolic processes, namely metabolic processes of organic substances ($N = 35$), cellular metabolic processes ($N = 34$), and metabolic processes of nitrogen compounds ($N = 27$). The results of gene ontology analysis for cellular localization showed that the most differentially abundant proteins originate from the cytoplasm ($N = 41$) and mitochondria ($N = 14$). Gene ontology analysis for the molecular function of differentially abundant proteins showed that the most represented proteins are those with catalytic activity ($N = 33$) and oxidoreductases ($N = 13$).

The analysis of biological pathways associated with differentially abundant proteins in the liver samples of fallow deer infected with *F. magna* and healthy deer was performed with Reactome tool, and 48 biological pathways were found to be significant (FDR < 0.05). The obtained results indicate that *F. magna* invasion mostly affects metabolism (N = 33), cellular responses to stress (N = 14), stimuli (N = 14) and heat stress (N = 8).

DISCUSSION

Proteomic analysis of wildlife opens up new possibilities in biomedical research. Wildlife research is becoming increasingly important for studying zoonoses. This is particularly evident when it comes to the introduction of non-native parasite species into specific areas. One such example is the introduction of the giant American liver fluke into Europe from North America. Pathological changes, clinical signs, and the outcome of *F. magna* infection are closely related to the host species (definitive, aberrant, and dead-end) and their varying tolerance to infection. Fallow deer serve as definitive hosts for *F. magna*. Considering the parasite tropism, changes in biological pathways within liver tissue represent the primary focus of research. The liver provides a favorable immune environment for parasites that have developed complex and multi-layered mechanisms to modulate the host response to suppress infection and repair tissue damage.

Metabolism is the most dominant category among differently expressed proteins in the liver of fallow deer infected by *F. magna* and healthy deer. Thus, proteins involved in the metabolism of carbohydrates, amino acids, and fatty acids, enzymes of the citric acid cycle, oxidative phosphorylation, and beta-oxidation were identified. Changes in liver energy metabolism have been documented in various parasitic infections, including *Fasciola hepatica* infection in sheep and rats. Our findings are consistent with previous research that has shown changes in energy metabolism in the livers of wild boar and red deer infected by *F. magna*.

Previous studies have reported reduced activity of antioxidant enzymes due to parasitic infections. Infection by *F. hepatica* results in decreased antioxidant capacity in humans and rats. Changes in antioxidant enzyme expression were also observed in the livers of red deer with fascioloidosis as a result of infection. Unlike the aforementioned studies, no changes in the expression of antioxidant enzymes were recorded in this study. Among the oxidoreductases with altered expression in fallow deer infected by *F. magna*, proteins involved in xenobiotic metabolism such as members of the cytochrome P450 system (CYP2C8T), flavin

monooxygenases (FMO3, PAH), and similar proteins (UDP-glucuronosyltransferases) were identified in this study. Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have highlighted the role of the CYP450 system in the development of resistance to antiparasitic drugs. Our results support the hypothesis of the involvement of these proteins in drug resistance development, suggesting the need for further research.

Significantly enriched biological pathways in the liver of fallow deer include processes related to the immune system and host immune response, such as cellular responses to stress, stimuli, and heat stress, as well as neutrophil degranulation. Among others, several heat shock proteins (HSPA9, HSP90AA1, HSP1B) were found among the proteins with significantly different expression between the examined groups. Our results are consistent with previous findings on the immune response to parasitic diseases.

A large number of differently expressed proteins among the examined groups belonged to ribosomal proteins (RPL4, RPS18, RPS14, RPS6), nucleosome components (histone H2B), translational enzymes (tyrosine-tRNA ligase), and proteasome subunits (UBE2V1), or proteins involved in protein synthesis and degradation. Migration of immature stages of *F. hepatica* within the liver is associated with increased protein synthesis, or intensive translational activity. These results suggest that protein turnover control serves as a host response mechanism to changes in the environment caused by *F. magna* infection.

Several proteins associated with fibrosis, cytoskeletal remodeling, and extracellular matrix accumulation were identified in this study, such as fibronectin (FN) and collagen type VI (COL6A3). *In vivo* and *in vitro* studies have shown that increased fibronectin expression consistently reflects the degree of liver fibrosis and the degree of extracellular matrix accumulation, making it an important marker of liver fibrosis. Similar changes in liver fibrosis-related proteins and extracellular matrix accumulation in liver parenchyma were found in red deer infected by *F. magna*. Therefore, these results indicate a local response to fluke migration through the liver and continuous remodeling of the extracellular matrix in response to *F. magna* infection.

In conclusion, understanding the mechanisms by which hosts respond to liver flukes is crucial for disease monitoring, as well as for the development of effective new interventions against them. This proteomic study of *Fascioloides magna* infection in fallow deer represents a valuable contribution to understanding the pathogenesis of liver fluke infection. The

pathogenesis of fascioloidosis in definitive hosts is associated with liver damage due to the presence of encapsulated pseudocysts, as well as host immune reactions to molecules secreted by the parasite. Our research has shown that chronic *F. magna* infection is associated with the host's immune response, oxidative stress, fibrosis, translational activity, and changes in liver energy metabolism. The identified proteins and associated biological pathways contribute significantly to understanding the host-parasite interactions and the pathogenesis of liver fluke invasion.

Key words: fallow deer; proteomics; liver proteome; liver fluke; host-pathogen interactions

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1. JELEN LOPATAR (<i>Dama dama</i> L.)	4
2.2. <i>FASCIOLOIDES MAGNA</i>	12
2.3. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA I RAZVOJ PROTEOMIKE	20
2.4. PROTEOMSKA ISTRAŽIVANJA INTERAKCIJE PARAZIT-NOSITELJ KOD <i>F. MAGNA</i> INVAZIJE	22
3. PRETPOSTAVKA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
4. MATERIJAL I METODE	26
4.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE	26
4.2. PROTEOMSKE ANALIZE TKIVA JETRE	28
4.2.1. EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA JETRE	28
4.2.2. DIGESTIJA PROTEINA I OBILJEŽAVANJE PEPTIDA	29
4.2.3. ANALIZA UZORAKA LC-MS/MS PRISTUPOM	30
4.3. STATISTIČKE I BIOINFORMATIČKE ANALIZE	31
5. REZULTATI	33
5.1. DIJAGNOZA INVAZIJE METILJEM <i>F. MAGNA</i> I PREGLED JETRE	33
5.2. REZULTATI PROTEOMSKE ANALIZE JETRE JELENA LOPATARA PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS	35

5.3. REZULTATI BIOINFORMATIČKE ANALIZE PROTEINA JETRE JELENA LOPATARA.....	41
6. RASPRAVA	46
7. ZAKLJUČCI.....	54
8. LITERATURA	55
9. ŽIVOTOPIS.....	69

1. UVOD

Divlje se životinje dugi niz godina navode kao potencijalan izvor zaraznih i parazitskih bolesti za domaće životinje i ljude. Pritom je očito da se naglasak stavlja na očuvanje zdravlja ljudi i domaćih životinja, dok je utjecaj uzročnika bolesti na divlje životinje u pravilu u drugom planu, vrlo vjerojatno kao posljedica nekadašnjeg promatranja kroz ekonomsku prizmu. Takva usredotočenost javno zdravstvenih politika je razumljiva zbog velikih rizika utjecaja različitih bolesti na ljude i domaće životinje, kao i širom potrebom za zaštitom javnog zdravlja, ali i zbog izuzetno velike ekonomske i društvene važnosti domaćih životinja. Navedena činjenica je i razlog što divlje životinje nisu u prvom planu, iako divlje životinje igraju ključne uloge u ekosustavima, a u posljednje vrijeme i sve veću ulogu u gospodarskim aktivnostima ljudi.

Proučavanje zdravstvenog statusa divljih životinja često je složenije zbog težeg praćenja, prikupljanja podataka i intervencija u slobodno-živućim populacijama te u otvorenim staništima, međutim u posljednje vrijeme od strane javnozdravstvenih službi podupire se sve jači integrirani pristup (pristup Jedno zdravlje) zdravlju ljudi i životinja te zaštitu okoliša na način da i divlje životinje poprimaju sve značajniju ulogu, ne samo kao potencijalni izvori, već i kao ciljne skupine očuvanja. Ovaj pristup prepoznaje da su zdravlje ljudi, životinja (uključujući divlje životinje) i ekosustavi međusobno povezani i ovisni. S obzirom na sve veću zabrinutost za očuvanje bioraznolikosti i prepoznavanje ekološke važnosti divljih životinja, podupiru se istraživanja i pristupi koji uključuju i zdravlje divljih životinja, kao i razvoj multidisciplinarnih timova koji objedinjuju stručnjake iz područja ekologije, veterine i medicine, ali njihov značaj još uvijek nije dovoljno prepoznat od strane šire javnosti i javnozdravstvenih rizika.

Jelen lopatar (*Dama dama* L.) je česta vrsta jelenske divljači u lovištima i uzgajalištima u Republici Hrvatskoj. Prema podacima iz Središnje lovne evidencije Republike Hrvatske jelena lopatara može se pronaći u Republici Hrvatskoj u gotovo svim županijama. Jelen lopatar je alohtona (nezavičajna) vrsta u Europi, što znači da nije izvorno prisutan na tom kontinentu. Uveden je iz svojeg prirodnog areala, Male Azije, u različite europske zemlje. Uvođenje jelena lopatara u Europu počelo je u 18. stoljeću, a obuhvatilo je zemlje poput Italije, Španjolske, Francuske, Njemačke, Danske, Švedske i Portugala. U Hrvatskoj je jelen lopatar prvi put uveden u 19. stoljeću. Njegova popularnost odnosno privlačnost među lovcima proizlazi iz atraktivnog izgleda, karakterističnog rogovlja te na taj način pridonosi razvoju i učinku lovnoga

turizma. Bitna značajka ove vrste je i njegova prilagodljivost različitim staništima i klimatskim uvjetima, kao i otpornost, što ga čini prikladnim za uzgoj u različitim dijelovima Hrvatske.

Paraziti su prirodni dio ekosustava i imaju važnu ulogu u održavanju ravnoteže u prirodi. Oni su neizbježan i integralan dio života divljih životinja. Paraziti mogu utjecati na ponašanje, zdravlje i populacijsku dinamiku divljih životinja, a njihova prisutnost u divljim populacijama često se koristi kao pokazatelj zdravlja ekosustava.

Fascioloidoza je parazitska bolest koja zahvaća primarno jelene i druge preživaače, ali se može naći i u drugih vrsta, a uzrokuje je neautohtoni parazit *Fascioloides magna*, poznat i kao veliki američki jetreni metilj. Ova bolest ima značajne implikacije za divlje i domaće životinje, odnosno upravljanje uzgojem divljači i domaćih životinja. *Fascioloides magna* je vrsta jetrenog metilja koji parazitira i razvija se u jetri invadiranih životinja gdje uzrokuje makroskopske i mikroskopske lezije, a što može dovesti do ozbiljnih oštećenja jetre i poteškoća u njenu funkcioniranju.

Životni ciklus metilja *F. magna* je primjer kako paraziti mogu razviti kompleksne i specijalizirane načine širenja i invazije svojih domaćina. Ciklus započinje kada invadirana životinja izlučuje jajašca parazita izmetom. Ova jajašca se zatim moraju naći u vodenom okruženju kako bi se mogla dalje razvijati. Jajašca se razvijaju u vodi, prolazeći nekoliko faza: iz njih se izlegu trepetljikave larve (miracidije) koje zatim pronalaze i ulaze u tijelo vodenih puževa (primarno puž barnjak), koji služe kao posrednici. Unutar puževa, larve prolaze kroz nekoliko stadija razvoja, transformirajući se u sporociste, redije i na kraju u cercarije. Cercarije napuštaju puževe i oslobađaju se u vodu. One imaju repić i aktivno plivaju tražeći vegetaciju na koju će se popeti. Odbacivanjem repića i stvaranjem zaštitne ovojnice cercarije prelaze u metacercarije, koje su invazivni stadij za konačnog nositelja. Metacercarije se vežu za biljke u vodenom okruženju, gdje mogu preživjeti dok ih ne konzumira konačni nositelj. Životinje se invadiraju konzumiranjem biljaka koje su kontaminirane metacercarijama. Nakon što ih nositelj proguta, metacercarije ulaze u probavni sustav životinje gdje se oslobađaju mladi metilji koji dopijevaju u jetru i razvijaju se u odrasle metilje, nakon čega ciklus počinje iznova.

Pravovremena i točna dijagnoza fascioloidoze važna je za učinkovito liječenje invadiranih životinja. U posljednje vrijeme sve veća prevalencija fascioloidoze u srednjoj Europi čini je ekonomski važnom bolešću divljih životinja, a istražuju se različite metode dijagnostike i kontrole kako bi se poboljšao zdravstveni status invadiranih populacija.

Proteomika, s obzirom na svoju složenost i multidisciplinarnost, igra ključnu ulogu u različitim područjima biomedicinskih istraživanja, uključujući identifikaciju biomarkera bolesti, razumijevanje mehanizama bolesti, otkrivanje novih terapijskih ciljeva, i razvoj personalizirane medicine. Proteomika se bavi analizom proteoma te igra ključnu ulogu u razumijevanju bioloških procesa i bolesti. Proteom obuhvaća sve proteine koji su prisutni u određenoj stanici, tkivu ili organizmu u određenom trenutku, pružajući uvid u funkcionalni status biološkog sustava.

Ovim istraživanjem uspoređen je proteom jetre jelena lopatara invadiranih i neinvadiranih metiljem *F. magna* pomoću tandemne spektrometrije masa spregnute s tekućinskom kromatografijom. Proteomsko profiliranje jetre kod jelena lopatara omogućilo je uvid u složene međudnose nositelja i parazita, dok je identifikacija proteina i bioloških puteva povezanih s invazijom pomogla razumijevanju patofiziologije samog procesa. Rezultati istraživanja moći će se primijeniti za praćenje i kontrolu zdravlja i produktivnosti životinja te će doprinijeti razvoju novih alata za kontrolu, praćenje i liječenje metiljavosti u jelenskoj populaciji.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. JELEN LOPATAR (*Dama dama* L.)

U Republici Hrvatskoj, gospodarenje divljim životinjama većinom se temelji na principima prirodnog uzgoja. To znači da se stavlja naglasak na održavanje prirodnih uvjeta staništa, s minimalnim ljudskim intervencijama. Ovakav pristup omogućava divljim životinjama da se razvijaju u skladu s njihovim prirodnim potrebama i ponašanjem, doprinoseći pri tome očuvanju bioraznolikosti i prirodnih ekosustava.

Jelen lopatar (*Dama dama* L.) je alohtona i relativno česta vrsta jelenske divljači u lovištima i uzgajalištima u Republici Hrvatskoj (Slika 1). Zakonom o lovstvu (ANONIMUS, 2018.) svrstan je u krupnu divljač i zaštićen je lovostajem.



Slika 1. Jeleni lopatari u magli (foto: D. Konjević)

Opis terminologije koja se koristi za označavanje različitih dobnih skupina i spolova kod jelena lopatara u lovu i divljoj fauni je vrlo određen i odražava specifičnosti lovne terminologije. Odrasli mužjak jelena lopatara naziva se lopatar, lanjac ili šarenjak (JANICKI i sur., 2007.). Naziv „lopatar“ dolazi od karakterističnog oblika njihovih rogova koji podsjećaju na lopatu. Termin „lanjac“ može se odnositi na mužjaka u drugoj godini života kada mu je

rogovlje prisutno na glavi, ali još nije potpuno razvijeno. "Šarenjak" je naziv koji dolazi od šarene boje dlačnog pokrova. Odrasle ženke jelena lopatara nazivaju se košutama, a mladi jelena lopatara oba spola do kraja ožujka druge kalendarske godine (što označava kraj lovnogospodarske godine u kojoj su se ženke telile) nazivaju se tele ili jelenče. Nakon tog perioda, mlade ženke jelena lopatara, sve do prvog teljenja, nazivaju se košutice, a mladi mužjaci do čišćenja prvih rogova, što se obično događa u drugoj godini života, nazivaju se jelenčić (JANICKI i sur., 2007.).

Mužjaci se mogu kategorizirati prema jakosti i veličini rogova kao slabi, srednji, dobri ili jaki lopatari (Slika 2). Ova kategorizacija se često koristi u lovstvu za okvirno određivanje vrijednosti i kvalitete trofeja, kao i perspektivnosti mužjaka u uzgoju.



Slika 2. Jelen lopatar, mužjak s rogovljem u bastu (foto: D. Konjević)

Ovi opisi odražavaju kompleksnost i tradiciju u terminologiji koja se koristi u lovstvu i upravljanju populacijama divljih životinja i važni su ne samo za lovce i uzgajivače divljači, već i za biologe, ekologe, šumare, poljoprivrednike i veterinare koji proučavaju ponašanje, populacijsku dinamiku i ekologiju ovih životinja.

Opis jelena lopatara i različitih naziva koji se koriste za ovu vrstu odražava njegovu karakterističnu boju dlake i prisutnost bijelih pjega. Raznolikost boja i pjega čini jelena lopatara vizualno prepoznatljivom i atraktivnom vrstom. Kako je prethodno spomenuto, jelen lopatar se naziva šarenjak ili šarenac zbog šarenih obrazaca na svojoj dlaci. Tijekom ljetnih mjeseci, dlaka jelena lopatara je crvenkasto smeđa, s tamnom prugom duž leđa. Bijele pjege po tijelu daju mu prepoznatljiv i šaren izgled. Ova ljetna boja dlake pomaže u kamuflaži u šumskom okruženju, posebno među grmljem i niskim drvećem. Pored ove osnovne boje, boja dlake jelena lopatara može varirati od potpuno bijele do gotovo potpuno crne, što ukazuje na značajnu varijabilnost unutar vrste. Ova varijabilnost može biti uvjetovana genetikom, okolišem, prehranom i drugim čimbenicima. Pri tome se ne govori o albinizmu i melanizmu, a istodobno označava i da pojava ovakvih varijeteta nije neuobičajena u ove vrste. Zimi, dlaka jelena lopatara postaje obično sivo-smeđa, što pruža bolju kamuflažu u zimskom okruženju. Promjena boje dlake između ljeta i zime je primjer sezonske adaptacije koja pomaže životinjama da se prilagode različitim okolišnim uvjetima (JANICKI i sur., 2007.).

Prema znanstvenom razvrstavanju jelen lopatar (*Dama dama* L.) ubraja se u:

Carstvo: *Animalia* (životinjsko)

Koljeno: *Chordata* (svitkovci)

Potkoljeno: *Vertebrata* (kralješnjaci)

Razred: *Mammalia* (sisavci)

Podrazred: *Placentalia* (plodvaši)

Red: *Artiodactyla* (parnoprstasi, papkari)

Podred: *Ruminantia* (preživači)

Porodica: *Cervidae* (jeleni, punorošci)

Rod: *Dama* (lopataři)

Vrsta: *Dama dama* L. (jelen lopatar)

Jelen lopatar ima dvije glavne podvrste koje se razlikuju po svom geografskom rasprostranjenju: europski jelen lopatar i perzijski jelen lopatar.

Europski jelen lopatar (*Dama dama dama*) je kao podvrsta prisutan u Europi, uključujući i područje Hrvatske. Europski jelen lopatar reintrodiciran je u mnoge dijelove Europe, gdje obitava u različitim staništima, uključujući šumska i poluotvorena područja. U mnogim zemljama, uključujući i Hrvatsku, europski jelen lopatar je popularan u lovištima i uzgajalištima. Perzijski jelen lopatar (*Dama dama mesopotamica*) je podvrsta koja obitava na području Male Azije, posebno u regijama koje danas pripadaju Iranu i Turskoj. Perzijski jelen lopatar se razlikuje od europskog jelena lopatara nekim morfološkim značajkama i prilagođen je životu u specifičnim ekološkim uvjetima Male Azije (JANICKI i sur., 2007.).

Jelen lopatar je izvorno iz Male Azije, a njegovo unošenje i širenje u Europi su primjer kako ljudska aktivnost može utjecati na distribuciju vrsta. Jelen lopatar je, kao što je navedeno, alohtona vrsta u Europi, što znači da nije izvorno prisutan na tom kontinentu. Uveden je iz svojeg prirodnog areala, Male Azije, u različite europske zemlje. Uvođenje jelena lopatara u Europu počelo je u 18. stoljeću, a obuhvatilo je zemlje poput Italije, Španjolske, Francuske, Njemačke, Danske, Švedske i Portugala. U Hrvatsku je jelen lopatar prvi put uveden 1850. godine u Suhopolju, a kasnije i u Belišće (1900. godine), Brijune te Kunjevce (1920. godine). Od tada se proširio po velikom dijelu Hrvatske, s osobitim naglaskom na područja Slavonije i Baranje (JANICKI i sur., 2007.).

Smatra se da su neki od najkvalitetnijih primjeraka jelena lopatara prisutni u Mađarskoj, posebno u pograničnom području, Baranji. Prema podacima iz Središnje lovne evidencije Republike Hrvatske jelena lopatara može se pronaći u 95 lovišta ili uzgajališta u Republici Hrvatskoj u gotovo svim županijama. U Kunjevima u Vukovarsko-srijemskoj županiji je jedna od prvih slobodnih populacija u Hrvatskoj, a u Hrvatskoj Dubici, Iloku i Kutjevu uzgaja se u ograđenim prostorima. Manje se populacije nalaze na Brijunima, Malom Lošinju, Istri, Dalmaciji, Hrvatskom primorju i Zagrebu. Pored otvorenog uzgoja i uzgoja u gaterima, lopatara se često nalazi u sklopu seoskog turizma. Jelena lopatara u Hrvatskoj ima u relativno malom broju, oko 2500 jedinki (BLAŽINA, 2004.).

Jeleni lopatari su jedna od najljepših i najpoznatijih vrsta jelena na svijetu. Poznati su po svojim jedinstvenim rogovima u obliku lopate, koji ih izdvajaju od ostalih vrsta jelena. Razlike između europskog jelena lopatara i perzijskog su male, perzijski je lopatar nešto veći te mu

plosnatost rogovlja počinje bliže bazi roga. Pripadnost istoj vrsti pokazuje i činjenica da međusobnim parenjem daju plodne potomke.

Jeleni lopatari su životinje koje obično žive u krdima koja se sastoje od jedinki različitog spola i starosti. Ovo krdo obično uključuje ženke (košute), mlade životinje i mlađe mužjake. Stariji mužjaci jelena lopatara često vode samotnjački život i pridružuju se krdima samo tijekom sezone parenja ili rike. Ovo je tipično za mnoge vrste jelena, gdje stariji mužjaci postaju teritorijalniji i izoliraniji. Jeleni lopatari preferiraju relativno male životne prostore i nisu skloni migracijama (BLAŽINA, 2004.). To znači da obično ostaju unutar određenog područja, što je često određeno dostupnošću hrane, vode i skloništa. Njihova tendencija da se ne kreću na velike udaljenosti i da se drže istog područja čini ih idealnima za život u parkovima, rezervatima i lovištima gdje su uvjeti staništa stabilni i gdje je gospodarenje populacijom olakšano.

Prema podacima iz Središnje lovne evidencije Republike Hrvatske jelena lopatara može se pronaći u Republici Hrvatskoj u gotovo svim županijama. Njegova popularnost odnosno privlačnost među lovcima proizlazi iz atraktivnog izgleda, u prvom redu karakterističnih rogova te pridonosi lovnom turizmu (Slika 3). Bitna značajka ove vrste je i njegova prilagodljivost da se prilagođava različitim staništima i klimatskim uvjetima kao i otpornost što ga čini prikladnim za uzgoj u različitim dijelovima Hrvatske.



Slika 3. Trofej, rogovlje jelena lopatara (foto: D. Konjević)

Uzgoj jelena lopatara u kontroliranim uvjetima omogućava bolje gospodarenje njihovom populacijom, zdravljem i genetskim materijalom. To je posebno važno u kontekstu očuvanja ove vrste i održivog gospodarenja njome u lovištima. U prirodnim lovištima jelen lopatar igra važnu ulogu u ekosustavima, a uzgajališta pridonose očuvanju vrste, posebno u područjima gdje su prirodne populacije ugrožene ili smanjene.

Gospodarska vrijednost jelena lopatara naročito se očituje kroz lovni turizam, ali i kroz prodaju mesa, kože i rogovlja. Gospodarenje populacijom jelena lopatara u Republici Hrvatskoj kroz uzgajališta i lovišta pomaže u očuvanju ove vrste, dok istovremeno pruža ekonomske i rekreacijske mogućnosti. Važno je osigurati da se takve aktivnosti provode na održiv način, s poštovanjem ekoloških načela i dobrog gospodarenja divljim životinjama.

Današnji uvjeti života jelena lopatara znatno su promijenjeni zbog urbanizacije, globalizacije, fragmentacije staništa, i drugih ljudskih utjecaja. To ima duboke posljedice na izvorne ekosustave i na zdravlje i dinamiku populacija jelena lopatara, ograničava njegove migracijske puteve te smanjuje dostupnost hrane i vode.

Opis jelena lopatara (*Dama dama* L.) (JANICKI i sur., 2007.) pruža uvid u njegove morfološke značajke i kako se one uspoređuju s drugim vrstama iz porodice jelena (*Cervidae*). Jelen lopatar je manji od jelena običnog (*Cervus elaphus*) i ima nekoliko specifičnih karakteristika:

- Mužjak jelena lopatara može doseći visinu do 110 cm u grebenu, dok ženka ima do 90 cm.
- Mužjaci mogu biti dugi do 140 cm, dok su ženke nešto kraće s dužinom do 130 cm.
- Rep jelena lopatara je obično dug između 15 i 20 cm.
- Masa mužjaka varira od 50 do 80 kg, ovisno o dobi, sezoni i tjelesnom stanju.
- Ženke su lakše, s težinom koja se kreće od 30 do 60 kg.
- Formula zuba jelena lopatara je I 0/3; C 0/1; P3/3; M3/3, što znači da ukupno imaju 32 zuba.
- Za razliku od jelena običnog, jelen lopatar nema očnjake na gornjoj čeljusti, što je važna razlika u zubnoj morfologiji.
- Rogovi jelena lopatara razlikuju se od onih kod jelena običnog. Rogovi jelena lopatara su široki i ravniji, podsjećajući na oblik lopate, odakle i dolazi njegovo ime.

Jelen lopatar izvorno potječe iz šumsko-stepskih područja, ima određene karakteristike koje ga čine prilagodljivim u različitim okolišima te je stoga i poželjna vrsta divljači u raznim oblicima uzgoja. Preferira prorijeđene šumske sastojine koje su isprekidane livadama, čistinama i mladim šumskim sastojinama (branjevinama), gdje nalazi hranu poput brsta. Idealno stanište za jelena lopatara uključuje svijetle i tople hrastike, gdje može postići visoku trofejnu vrijednost zahvaljujući kvaliteti hrane i staništa. Visoka sposobnost prilagodbe doprinosi njegovoj popularnosti u lovištima i uzgoju diljem svijeta. Za optimalan razvoj i rast, staništa jelena lopatara moraju sadržavati odgovarajuće površine livada i pašnjaka, koje su ključne za ishranu. Jelen lopatar ne zahtijeva vodene terene za svoje stanište i ne kaljuža se, što ga razlikuje od nekih drugih vrsta jelena (JANICKI i sur., 2007.).

Jelen lopatar ima skromnije zahtjeve za hranom od jelena običnog, ali njegove prehrambene navike mogu imati značajan utjecaj na biljne zajednice. Jelen lopatar voli brstiti izbojke i pupoljke na drveću, kao i mladice koje izniknu iz zemlje ili panjeva. Žir hrasta je omiljena hrana jelena lopatara, a također konzumira i djetelinsko-travne smjese, koje su idealne za ljetnu pašu. Kao pašna divljač, jelen lopatar treba veće površine pašnjaka. Njegovo brstenje i ispaša mogu načiniti štetu na biljnim zajednicama, posebno kada u prevelikom broju (iznad kapaciteta staništa) i nedostatku druge prirodne hrane prekomjerno koriste mladice i pupoljke. Jeleni lopatari su najaktivniji u zoru i sumrak kada izlaze na hranjenje. Preko dana obično borave u šumi, osim u staništima gdje nisu uznemiravani ili su naviknuti na ljudsku prisutnost. U takvim uvjetima mogu uzimati hranu tijekom cijelog dana. Ako u staništu nema dovoljno prirodne hrane poput žira, bukvice ili kestena, potrebno je dodavati zrnatu hranu poput zobi i kukuruza (JANICKI i sur., 2007.).

Sezona parenja, poznata kao rika, važno je razdoblje u godišnjem ciklusu jelena lopatara, s karakterističnim promjenama u ponašanju i fiziologiji. Parenje jelena lopatara počinje u rujnu i traje do sredine listopada, a rika na našim staništima obično završava čak u studenom. Tijekom rike, mužjaci jelena lopatara mijenjaju svoje ponašanje, vrat im odeblja, pridružuju se krdima i aktivno traže košute za parenje. Jeleni lopatari tijekom rike okupljaju košute u male hareme, ričući predvečer, ujutro i noću. Ovo je i vrijeme kada se odvijaju borbe između mužjaka za dominaciju i pravo parenja (JANICKI i sur., 2007.). Mužjaci tijekom sezone parenja uzimaju vrlo malo hrane, što dovodi do gubitka tjelesne mase. Odebljanje vrata je fiziološka promjena koja pomaže mužjacima u borbi i dominaciji (JANICKI i sur., 2007.).

Gravidnost košute traje otprilike 33 tjedna. Teljenje se obično zbiva krajem svibnja ili početkom lipnja, kada košuta oteli u pravilu jedno tele (JANICKI i sur., 2007.). Telad siše majčino mlijeko u trajanju od 3 do 4 mjeseca. U prva dva tjedna života, telad je preslaba da prati majku, stoga ih košuta ostavlja skrivene u logi kako bi se zaštitila od grabežljivaca i drugih opasnosti (JANICKI i sur., 2007.).

2.2. FASCILOIDES MAGNA

Invazijske bolesti predstavljaju gotovo 70% svih bolesti divljih životinja. Fascioloidoza je parazitska bolest uzrokovana neautohtonom vrstom metilja *Fascioloides magna*, također poznatom i kao veliki američki jetreni metilj (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2011.; BAZSALOVICZSOVÁ i sur., 2013.). Invazije ovim parazitom prepoznate su u svijetu primarno zbog velike ekonomske važnosti, ali i zbog utjecaja na bioraznolikost u područjima gdje metilj dolazi u susret s naivnim populacijama nositelja. Ovaj parazit je izvorno iz Sjeverne Amerike gdje parazitira u američkim vrstama jelena, prvenstveno bjelorepom jelenu (*Odocoileus virginianus*), ali se proširio u druge dijelove svijeta, uključujući Europu, gdje je prvi puta opisan od strane talijanskog veterinara Roberta Bassia, 1875. godine (BASSI, 1875.; SWALES, 1935.). Njegova pojava u Europi posljedica je nekontroliranog unosa američkih vrsta jelena u europske parkove, zooške vrtove i rezervate (ŠLUSARSKI, 1955.; BOJOVIĆ I HALLS, 1984.), a sve kao posljedica činjenice da je *F. magna* evoluirao zajedno s bjelorepim jelonom u okolini velikih jezera u Americi te da tamošnje invazije ove vrste jelena prolaze bez izrazitih simptoma. Nekontrolirani unos jelena u Europu je kao posljedicu imao formiranje tri žarišta invazije, što je imalo značajan utjecaj na divlje životinje, posebno jelene, srne (*Capreolus capreolus*) i muflone (*Ovis musimon*) (KRÁLOVÁ-HRÓMADOVA i sur., 2011.), i to kako je ranije navedeno na području sjeverne Italije (BASSI, 1875.) u okolini grada Torina, na dijelu današnje Republike Češke i jugozapadne Poljske (ULLRICH, 1930.) te na području doline toka rijeke Dunav gdje se intenzivnije počela širiti početkom 21. stoljeća (WINKELMAYER i PROSL, 2001.; MARINCULIĆ i sur., 2002.; MARINKOVIĆ i sur., 2013.). Iz navedenoga je razvidno da je dolazak ovoga, nezavičajnog metilja izazvao pojavu lošeg gojnog stanja jelena što je potaknulo zanimanje uzgajivača i veterinara. Tako je prvi puta uočen u jetri wapiti jelena u kraljevskom parku La mandria na sjeverozapadu Italije, te je nazvan *Distomum magnum* (BASSI, 1875.; PYBUS, 2001.). Kasnije ga je dodatno opisao Charles W. Stiles, a preimenovan je u *Fascioloides magna* (STILES i HASSALL, 1894.). U Hrvatskoj je *F. magna* prvi puta utvrđena na području Baranje 2000. godine (MARINCULIĆ i sur., 2002.), u području zvanom Šeprešhat, koji je dio Šumarije Tikveš. Prvi dokaz metilja *F. magna* u Hrvatskoj bio je iz jetre jelena običnoga (MARINCULIĆ i sur., 2002.). Smatra se da su na ovaj prostor došli ili migracijom jelena iz Mađarske ili putem puža barnjaka (*Limnea truncatula*) koji dolazi vodotocima. Ovo otkriće bilo je povezano s uočenim padom gojnog stanja jelenske divljači na istoku Hrvatske i izrazitim promjenama na jetrima, što ukazuje na potencijalni utjecaj parazita na lokalne populacije divljih životinja. Također je s trajanjem njegove

prisutnosti na našim područjima uočen i pad brojnosti srne obične kao aberantnog nositelja. Invazija metiljem *F. magna* može imati ozbiljne posljedice za zdravlje divljih životinja, posebno za jelenske vrste.

Prema znanstvenom razvrstavanju veliki američki metilj ubraja se u:

Carstvo: *Animalia* (životinjsko)

Koljeno: *Platyhelminthes* (plošnjaci)

Razred: *Trematoda*

Podrazred: *Digenea*

Red: *Echinostomatiformes*

Porodica: *Fasciolidae*

Rod: *Fascioloides*

Vrsta: *Fascioloides magna* (veliki američki metilj)



Slika 4. Spolno nezreli metilji *F. magna* (foto: D. Konjević)

Fascioloides magna je značajan zbog svoje veličine i strukture, što ga čini jednim od najvećih metilja na svijetu s prosječnom duljinom od 40 do 100 mm, širinom od 20 do 35 mm, i debljinom od 2 do 4,5 mm (ERHARDOVA, 1961.). Tijelo mu je oblika lista, dorzoventralno spljošteno, nesegmentirano i bilateralno simetrično (Slika 4). Površina tijela ovog metilja prekrivena je tegumentom, koji je vrsta zaštitne vanjske membrane (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.; ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.). U početnim stadijima razvoja, metilj je crveno-smeđe boje, zbog vidljivog sadržaja probavnog trakta (ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.). Kasnije, kako metilji postaju spolno zreli, boja im postaje sivkasto-žućkasta zbog nakupina jajašaca. Metilj ima šiljast prednji kraj i zaobljen stražnji kraj. Ima dvije mišićne siske - oralnu sisku koja okružuje usta i omogućuje hranjenje, i trbušnu sisku koja služi za pričvršćivanje (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Probavni sustav ovoga parazita sastoji se od oralne siske, bukalne šupljine, kratkog mišićnog ždrijela i jednjaka koji se dijeli na dva crijevna sistema (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.; ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.). Ovaj metilj ima protonefridijalni ekskretorni sustav i dobro razvijen živčani sustav s uparenim živčanim ganglijama i živčanim vrpčama (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). *Fascioloides magna* je hermafrodit, s jednom zajedničkom genitalnom porom za oba spolna sustava.

Muški spolni sustav ovoga parazita sastoji se od dva razgranata testisa, koji proizvode spermije. Testisi se nastavljaju u spermatovode koji vode do kopulacijskog organa. Kopulacijski organ uključuje sjemene vrećice, mišićnu strukturu koja pomaže pri kopulaciji (*bursa cirri*), ejakulatorni organ i prostatu (JONES, 2005.). Izmjena genetskog materijala obično se odvija oplodnjom između dviju jedinki, ali je moguća i samooplodnja (CHEN i MOTT, 1990.).

Ženski spolni sustav uključuje jajnik, koji proizvodi jajašca, jajovod koji vodi od jajnika do proširenja (mjesto gdje se pohranjuju spermiji) i ootipa, strukture koja pomaže u usmjeravanju jajašca prema uterusu te konačno od uterusa koji je mjesto gdje se jajašca razvijaju nakon oplodnje (FLORIJAČIĆ, 2006.).

Ova anatomija omogućuje metilju *F. magna* da bude izuzetno prilagodljiv u svom reproduktivnom procesu. Sposobnost samooplodnje povećava vjerojatnost reprodukcije čak i kada nema drugih jedinki u blizini, dok oplodnja između dviju jedinki omogućava genetsku raznolikost. Unatoč hermafroditizmu, u pseudocistama se obično nalaze dva, a iznimno i više metilja, što ukazuje na nastojanje za razmjenom genetskog materijala.

Fascioloides magna razvija se u četiri faze koje omogućuju parazitu da se razmnožava i širi u različitim nositeljima i okolišu.

Odrasli metilji žive unutar pseudocista u jetri tipičnog nositelja. U ovim pseudocistama, metilji su zaštićeni i mogu izlučivati veliki broj jajašaca, do 4 000 dnevno (SWALES, 1935.). Jajašca se izlučuju putem žuči nositelja u tanko crijevo, a zatim izlaze iz organizma nositelja izmetom (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Ovo je ključan korak u širenju parazita u okoliš. Nakon što se jajašca nađu u vodi, započinje proces njihovog embrioniranja, koji traje oko 35 dana. Tijekom ovog perioda, unutar jajašca se razvija larva poznata kao miracidij (SWALES, 1935.; PYBUS, 2001.).

Miracidij je pokretni larvalni stadij koji aktivno traži posrednika, odnosno vodenog puža. Ova faza je ključna za nastavak životnog ciklusa, jer bez pronalaska odgovarajućeg posrednika, miracidij ne može nastaviti razvoj (SWALES, 1935.). Ova faza je također potencijalno izuzetno važna za kontrolu i suzbijanje parazita, jer nudi moguće točke intervencije za prekid njegovog razvojnog ciklusa, te na taj način pomoć u smanjenju broja dostupnih posrednika za razvoj parazita.

Preživljavanje miracidija metilja *F. magna* ovisno je o uvjetima vlažnosti i temperature okoliša. Miracidij je vrlo osjetljiv na okolišne uvjete, a njegova sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima ključna je za uspješnost širenja parazita. U uvjetima slabije vlažnosti, miracidij može preživjeti samo 10-16 sati, ako ne pronađe posrednika (ERHARDOVÁ, 1961.). U vlažnim uvjetima, sposobnost preživljavanja se povećava, i miracidij može preživjeti do 2 dana (ERHARDOVÁ, 1961.). Ovo dodatno vrijeme može biti ključno za pronalazak vodenog puža, koji je neophodan za nastavak njegovog razvojnog ciklusa. Temperatura vode također igra važnu ulogu u vremenu preživljavanja miracidija. U hladnijoj vodi, miracidiji mogu preživjeti dulje nego u toploj vodi. Ovo je vjerojatno zbog brzine metabolizma ličinke, naime, niže temperature usporavaju metaboličke procese, omogućavajući miracidijima da očuvaju svoju energiju duže vrijeme.

Kada miracidij pronađe vodenog puža, koristi apikalnu žlijezdu za prodiranje u tijelo puža. Ovo je novi ključni trenutak u životnom ciklusu parazita, jer bez uspješnog prodiranja u puža, miracidij ne može napredovati u sljedeću fazu razvoja.

Glavni posrednik u Europi je puž vrste *Galba (Limnea) truncatula*. Postoje i drugi potencijalni posrednici, što ukazuje na prilagodljivost metilja različitim ekološkim uvjetima, ali je njihov značaj manji. Nakon što miracidij proдре u tijelo puža, počinje druga faza odnosno nastaje razvojni stadij zvan sporocista (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Ovo je pasivna faza unutar koje se razvija sljedeća generacija parazita. Iz svake sporociste se razvija majka redija, izdužena i pokretna larva koja aktivno dovodi do pucanja stijenke sporociste i oslobađanja u tijelo puža. Majka redija dalje proizvodi kćeri redije, koje su razvijenijeg oblika tijela (ERHARDOVÁ, 1961.). Iz kćeri redija se razvijaju cercarije, koje su pokretni larvalni stadiji i iz kojih nastaje metacercarija, stadij sposoban za invaziju konačnog nositelja (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.).

Razvoj od miracidija do cercarija unutar tijela vodenog puža je ključna faza u životnom ciklusu *F. magna*, jer omogućuje produkciju velikog broja invazivnih stadija iz jedne miracidije.

U trećoj fazi životnog ciklusa metilja *F. magna* cercarija se transformira u invazivne metacercarije. Cercarije se primarno razvijaju u hepato-pankreasnom tkivu i reproduktivnim organima puža. Ova lokalizacija omogućuje cercarijama da koriste resurse puža za svoj razvoj. Cercarije su slične odraslim metiljima u građi, ali imaju dodatni repić koji im omogućuje

plivanje (SWALES, 1935.; ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Otprilike 2,5 mjeseca nakon što miracidij uđe u puža, cercarije prolaze kroz proces transformacije i postaju spremne za izlazak iz posrednika (SWALES, 1935.; ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Sposobnost plivanja neophodna je za njihov izlazak iz posrednika i potragu za mjestom na kojem će se začahuriti (SWALES, 1935.; ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Ovo stvaranje čahure je proces pretvaranja cercarija u metacercarije. Tamno smeđe metacercarije mogu ostati invazivne do 2,5 mjeseca, a ponekad i dulje, u pogodnim uvjetima. Ovaj stadij je onaj koji invadira konačne nositelje (SCHWARTZ i sur., 1993.).

Sukladno navedenome, postoji više razvojnih stadija metilja, od kojih su metacercarije ključne u invaziji konačnih nositelja, jer se nakon konzumacije od strane nositelja (npr. jelena) u njihovom probavnom sustavu oslobađaju mladi metilji koji putuju prema jetri i ukoliko u nju dospiju razvijaju se u odrasle metilje.

U četvrtoj fazi razvojnog ciklusa metilja *F. magna*, metilji oslobođeni iz metacercarija se razvijaju u odrasle jedinke unutar konačnog nositelja. Metacercarije ulaze u probavni sustav konačnog nositelja putem konzumacije kontaminirane hrane. Ovo je prvi korak u procesu invazije. Nakon što se nađu unutar probavnog sustava nositelja, metacercarije se aktiviraju i oslobađaju se mladi metilji. Mladi metilji su opremljeni mehanizmima za prodiranje kroz stijenku crijeva. Jednom kada probuše stijenku crijeva, oni putuju po ventralnom dijelu peritonealne šupljine do jetre (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2016.). Ovo putovanje omogućuje im da dosegnu svoje primarno mjesto invazije. Mladi metilji probijaju Glissonovu kapsulu jetre, odnosno jetrenu ovojnicu. Dio mladih metilja ponekad može završiti i u drugim organima te uzrokovati i klinički manifestne posljedice, a dio metilja ne uspijeva u svojoj migraciji i propada (STILES i sur., 2021.). Nakon probijanja ovojnice, mladi metilji ulaze u tkivo jetre. Unutar jetre, metilji nastavljaju svoj razvoj do stadija odrasle jedinke. Spolno zreli metilji parazitiraju najčešće u paru te kod konačnih nositelja organizam oko njih stvara pseudociste s tankom stijenkom (FOREYT i TODD, 1976.; PYBUS, 2001.). Ovaj proces migriranja po jetri do stvaranja pseudociste može uzrokovati značajna oštećenja tkiva jetre, što dovodi do simptoma i potencijalnih zdravstvenih problema za nositelja (PYBUS, 2001.), a ponekad, posebice u slučaju aberantnih nositelja i uginuće. Spolno zreli metilji produciraju jajašca te ih preko izmeta jelena otpuštaju u okoliš.

Podjela nositelja velikog američkog metilja na konačne nositelje, aberantne nositelje i nositelje tipa slijepa ulica temelji se na njihovim interakcijama s parazitom i posljedicama invazije.

Konačni nositelji su oni u kojima parazit može završiti svoj životni ciklus, odnosno oni u kojima može doći do reprodukcije i stvaranja jajašaca koji se ispuštaju u vanjsku okolinu. Kod velikog američkog metilja svi konačni nositelji spadaju u obitelj *Cervidae* (PYBUS, 2001.). U Republici Hrvatskoj u tu skupinu spadaju jelen obični (*Cervus elaphus*) i jelen lopatar (*Dama dama*). Ove životinje mogu tolerirati prisutnost parazita s minimalnim patološkim promjenama, uz napomenu da je jelen lopatar osjetljiviji od jelena običnog.

Kod aberantnih nositelja parazit ulazi u organizam životinje koja nije tipični nositelj te često uzrokuje ozbiljne patološke promjene, ali se ne može uspješno razmnožavati. Kod aberantnih nositelja u pravilu izostaje inkapsulacija, a juvenilni metilji nastavljaju s trajnom migracijom po parenhimu jetre uslijed čega dolazi do uginuća aberantnih nositelja (FOREYT i TODD, 1976.; MULVEY i sur., 1991.). U takve nositelje primarno spadaju domaći preživaci poput ovaca i koza, ali i neki divlji preživaci (CONBOY i STROMBERG, 1991.). U Republici Hrvatskoj aberantni nositelji su srna obična (*Capreolus capreolus*) i muflon (*Ovis musimon*). U ovome odnosu u posljednje vrijeme su zabilježene promjene te su utvrđene isprva pseudociste, a potom i kronične invazije srna (DEMIASZKIEWICZ i sur., 2018.; KONJEVIĆ i sur., 2021.).

Nositelji tipa slijepa ulica su slični aberantnim nositeljima po tome što parazit u njima ne može završiti svoj životni ciklus. Razlika je u tome što u nositeljima tipa slijepa ulica, parazit ne uzrokuje značajne patološke promjene. Primjer bi mogla biti životinja koja se invadira jajašcima parazita, ali u kojoj se parazit ne može razviti do stadija koji bi mogao uzrokovati bolest. Nositelja tipa slijepa ulica karakterizira dolazak metilja do parenhima jetre, ali on najčešće ne dostiže spolnu zrelost nego bude inkapsuliran u pseudocistu debele stijenke te u njoj ugiba. Kod ovakvih nositelja ne dolazi do izlučivanja jajašaca u okoliš. Nositelj tipa slijepa ulica u Hrvatskoj je divlja svinja (*Sus scrofa*). Treba napomenuti da iako su kod nositelja tipa slijepa ulica zamijećene u pravilu samo inkapsulacije metilja u pseudociste s debelom stijenkom, KONJEVIĆ i sur. (2017.) su opisali i pseudocistu tankih stijenki u divlje svinje sa spolno zrelim metiljima i brojnim jajašcima u lumenu pseudociste.

Iz navedenoga je razvidno da klinička slika ovisi o tipu nositelja. U konačnim nositeljima, invazija velikim američkim metiljem često je asimptomatska, što znači da nema vidljivih

simptoma. Međutim, ako se simptomi razviju, mogu uključivati letargiju, slab apetit, anemiju, anoreksiju i depresiju. Iako su ovi simptomi rijetki, ponekad u teškim slučajevima invazije može doći i do uginuća nositelja (FOREYT, 1992., 1996.). Kod aberantnih nositelja, invazija velikim američkim metiljem obično dovodi do ugibanja unutar četiri do šest mjeseci nakon invazije (SWALES, 1935.; ERHARDOVA-KORTLA, 1971.). Smrt često nastupa bez pojave kliničkih simptoma, ali ako se simptomi pojave, mogu uključivati letargiju i slabost. Do smrti dolazi zbog trajne migracije juvenilnog metilja po jetrenom tkivu i obilnih krvarenja, oštećenja jetre i peritonitisa (FOREYT i TODD, 1976.). Kod nositelja tipa slijepa ulica invazija obično ne uzrokuje vidljive kliničke simptome. Međutim, patološki pregled može otkriti tragove invazije na jetri, kao što su nepravilne površine jetre i nakupine pigmenta željezo-porfirina. Tamni pigment, željezo-porfirin, moguće je naći i na unutrašnjosti trbušne šupljine (KARAMON i sur., 2015.). Nalaz ovog pigmenta je patognomoničan znak za invaziju metiljem *F. magna* (CHROUST, 1987.). Također, mogu se pronaći propale pseudociste u kojima su metilji obitavali.

Strategije kontrole i prevencije usmjerene su na liječenje nositelja koji izlučuju jajašca. Smanjenjem jačine invazija (prevalencije metilja) smanjuje se i broj jajašaca u izmetu. Pored toga, neki od lijekova, poput primjerice preparata na bazi triklabendazola djeluju i ovicidno, čime se broj jajašaca dodatno smanjuje u okolišu (JANICKI i sur., 2005.). Napori usmjereni na smanjenje izloženosti nositelja kontaminiranoj hrani i na kontrolu metilja i njegovih posrednika u okolišu bili bi učinkoviti, ali su iznimno ograničeni činjenicom da je riječ o uvjetima slobodne prirode, ali isto tako i da sredstva protiv posrednika (puža barnjaka) nisu selektivna te bi imala negativan utjecaj na druge akvatične organizme. Razumijevanje ovog procesa važno je za dijagnostiku i liječenje fascioloidoze.

Svaka dijagnostička metoda za fascioloidozu ima svoje prednosti i ograničenja, a izbor metode ovisi o različitim čimbenicima, uključujući dostupnost, trošak i specifične okolnosti (SEVERIN i sur., 2015a). Koprološka pretraga uključuje analizu izmeta nositelja radi pronalaska jajašaca *F. magna*. Njena prednost je neinvazivnost i jednostavnost, ali može biti manje pouzdana, posebno u ranoj fazi invazije ili kod aberantnih nositelja i nositelja tipa slijepa ulica gdje metilji ne mogu izlučivati jajašca.

Serološke metode detektiraju prisutnost specifičnih antitijela ili antigena parazita u krvi nositelja. Ove metode mogu biti vrlo osjetljive i specifične, ali mogu dati lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate, ovisno o stadiju invazije i prethodnoj izloženosti nositelja drugim

parazitima. Također, jedan od problema je i unakrižna reaktivnost sa sličnim vrstama poput primjerice velikog metilja (*Fasciola hepatica*) (SEVERIN i sur., 2015b.).

Biokemijske metode uključuju analizu kemijskih pokazatelja u krvi koji mogu ukazivati na invaziju parazita, poput promjena u jetrenim enzimima. Ove metode mogu pružiti posredne dokaze o invaziji, ali nisu specifične za fascioloidozu.

Patoanatomska i parazitološka pretraga jetre smatra se najpouzdanijim načinom za dokazivanje fasciolidoze. Uključuje izravni pregled jetre nositelja radi pronalaska mladih i odraslih metilja, lezija i procjene oštećenja jetre. Ova metoda pruža konačan dokaz o invaziji, ali nije primjenjiva kao metoda zaživotne dijagnostike.

2.3. ISTRAŽIVANJE PROTEOMA I RAZVOJ PROTEOMIKE

Proteomska istraživanja u veterinarskoj medicini dobivaju sve više pozornosti, posebno u istraživanju zoonoza koje su u interakciji s inicijativom „Jedno zdravlje“ (BILIĆ i sur., 2018.). Primjena omika tehnologija omogućuje inovativni pristup razvoju novih lijekova protiv trematoda i kandidata za cjepiva u humanoj i veterinarskoj medicini (MOLINA-HERNÁNDEZ i sur., 2015.; SILVANE i sur., 2015.; McMANUS , 2020.; BENNETT i sur., 2021.).

Godine 1975., Patrick H. O'Farrell objavio je rad koji je opisao tehniku dvodimenzionalne elektroforeze u gelu. Ova metoda je omogućila razdvajanje proteina na temelju dvije nezavisne karakteristike: njihove izoelektrične točke i molekularne mase. Takav pristup je bio revolucionaran jer je omogućio istodobno razdvajanje stotina ili čak tisuća proteina u jednom eksperimentu (O'FARRELL, 1975.).

Rani radovi poput O'Farrellova doprinijeli su razvoju prvih baza podataka proteina. Ove baze podataka bile su ključne za akumulaciju znanja o proteinima, njihovim funkcijama, strukturi i interakcijama. Tijekom godina, proteomika je značajno napredovala zahvaljujući razvoju naprednijih tehnika, kao što su spektrometrija masa i bioinformatička analiza. Te su metode omogućile preciznije identificiranje i kvantificiranje proteina, kao i bolje razumijevanje njihovih modifikacija i interakcija.

Proteomika se bavi karakterizacijom i analizom proteoma, koji je definiran kao set proteina koji se nalaze u stanicama, tkivu ili organizmu (WASINGER i sur., 1995.). Temelj za njen razvoj su dostupne baze podataka sekvenci DNA i proteina, napredak u metodama separacije proteina i području spektrometrije masa te razvitku računalnih algoritama za pretraživanje baza podataka (GRAVES I HAYSTEAD, 2002.). Osnovni metodološki pristup tijekom proteomske analize čini niz postupaka: izolacija proteina iz biološkog materijala, kvalitativna i/ili kvantitativna analiza proteomskog profila spektrometrijom masa, te bioinformatička analiza podataka (BODZON-KULAKOWSKA i sur., 2007.; YATES i sur., 2009.).

Proteini su izravni proizvodi gena i provode funkcije koje geni kodiraju. Proteini igraju ključne uloge kao katalizatori biokemijskih reakcija, strukturni elementi stanica i tkiva, te signalne molekule. Promjene u njihovoj ekspresiji, strukturi ili funkciji mogu dovesti do bolesti. Stoga, proteomika pruža mogućnosti za bolje razumijevanje patogeneze bolesti, što je posebno važno u kliničkoj veterini i biomedicini općenito (NDAO, 2009.). Proteomika omogućuje ne samo identifikaciju i kvantifikaciju proteina, već i proučavanje njihovih funkcija, interakcija i modifikacija, što pruža dublji uvid u biološke procese na molekularnoj razini (PANDEY i MANN, 2000.).

Jedan od najvažnijih potencijala proteomike je u pronalaženju novih biomarkera. Biomarkeri su biološki pokazatelji normalnih ili patoloških procesa, ili farmakoloških odgovora na terapiju. Identifikacija pouzdanih biomarkera može značajno poboljšati dijagnostiku, praćenje napretka bolesti i odgovora na terapiju. Iako su proteomske metode često skuplje i složenije, biomarkeri identificirani putem proteomike mogu kasnije biti upotrebljeni za razvoj jednostavnijih, bržih i jeftinijih dijagnostičkih testova. Time se omogućava šira primjena u kliničkoj praksi.

Ukratko, proteomika pruža dragocjen uvid u mehanizme na molekularnoj razini koji stoje iza brojnih bioloških procesa i bolesti, otvarajući vrata napretku u dijagnostici, terapiji i razumijevanju bolesti u veterini i biomedicini.

2.4. PROTEOMSKA ISTRAŽIVANJA INTERAKCIJE PARAZIT – NOSITELJ KOD *F. MAGNA* INVAZIJE

Proteomska istraživanja u divljih životinja su još uvijek relativno rijetka. U dosadašnjim istraživanjima proveden je ograničen broj proteomskih studija na jelenskim tkivima, koje su uglavnom usmjerene na proučavanje rasta rogovlja i kvalitete mesa (PARK i sur., 2004.; LÓPEZ-PEDROUSO i sur., 2019.; DONG i sur., 2020.).

Unatoč velikim naporima u studijama čiji je cilj razviti nove intervencijske strategije protiv jetrenih metilja, još uvijek ima malo podataka o interakcijama između nositelja i parazita.

Za metilja *F. magna* određen je transkriptom i ekskretorni i sekretorni proteom spolno zrelih metilja (CANTACESSI i sur., 2012.). Utvrdili su 835 proteina, od kojih je njih 80 prepoznato kao ekskretorni i sekretorni produkti ovoga metilja, uključujući antioksidanse, peptidaze i proteine uključene u metabolizam ugljikohidrata. Većina prethodnih proteomskih studija vezanih uz metilje, bile su usredotočene na proteomsku analizu topljivih produkata jetrenog metilja *Fasciola hepatica* te samog parazita (ROBINSON i sur., 2009.; HAÇARIZ i sur., 2012.; CWIKLINSKI i sur., 2021.). S obzirom na nedostatak podataka o biokemiji, hematologiji i proteomici kod životinja s fascioloidozom, rezultati istraživanja su uspoređeni sa studijama provedenim na životinjama zaraženim metiljem *F. hepatica*. Postoji očita sličnost između životnog ciklusa i patofizioloških učinaka oba jetrena metilja. Međutim, odrasli metilji *F. hepatica* žive u žučnim kanalima, dok odrasli metilji *F. magna* žive unutar fibroznih kapsula u parenhimu jetre.

Kombinirani transkriptomski i proteomski pristup odredio je čimbenike sekretoma *F. hepatica* povezane s njihovom migracijom u jetri i rezultirajućom imunopatogeneзом (CWIKLINSKI i sur., 2021.). Nezreli metilji u jetri izražavaju oko 8000 transkripata povezanih s intenzivnom proizvodnjom proteina i signalnim transdukcijskim putevima. Migracija nezrelih parazita *F. hepatica* unutar jetre povezana je s povećanom proizvodnjom proteina, ekspresijom signalnih putova i proliferacijom neoblasta koji potiču njihov brzi rast i razvoj. Sekrecija određenog skupa molekula, posebno katepsin L peptidaza, inhibitora peptidaza, saponina, imunoregulatora i antioksidanasa, omogućuje parazitu interakciju s mikrookolišem jetre, imunološkim odgovorom domaćina i rastućim razinama oksidacijskog stresa.

U proteomskoj studiji kronične infekcije metiljem *F. hepatica* kod goveda, identificirani su proteini koji mogu poslužiti kao potencijalni kandidati za cjepivo ili farmakološke agense (HAÇARIZ i sur., 2012.).

Integrirana transkriptomaska i proteomska analiza omogućila je profiliranje sekretornih proteina metilja *F. hepatica* koji sudjeluju u interakcijama nositelj-parazit te kako bi se promjene u njihovoj ekspresiji povezale s migracijom parazita (ROBINSON i sur., 2009.). Pokazano je da su ključne komponente izlučevina odraslih parazita proteolitički enzimi kao što su katepsin L, katepsin B, asparaginil endopeptidaza cistein proteaza te nove serinske proteaze i karboksipeptidaze slične tripsinu. Proteomska analiza proteina izlučenih od strane infektivnih ličinki, nezrelih metilja i odraslih metilja *F. hepatica* otkrila je da su ove proteaze regulirane tijekom razvoja te da njihova ekspresija korelira s migracijom parazita kroz tkiva domaćina i njihovim interakcijama s različitim makromolekulama domaćina. Specifične funkcije proteaza poput FhCL3 i katepsina B uključuju aktivaciju ličinki i probijanje crijevne stijenke, dok su proteaze poput FhCL1, FhCL2 i FhCL5 potrebne za prodiranje u jetru te za hranjenje tkiva i krvi. Osim proteaza, paraziti luče niz antioksidansa koji su također visoko regulirani u skladu s njihovom migracijom kroz tkiva domaćina (ROBINSON i sur., 2009.).

Nedavna kvantitativna proteomska studija temeljena na obilježavanju izobarnim privjescima za relativnu i apsolutnu kvantifikaciju (iTRAQ, engl. *isobaric tag for relative and absolute quantitation*) istraživala je promjene u serumu kod vodenih bivola invadiranih metiljem *Fasciola gigantica* (ZHANG i sur., 2019.).

Usporedna analiza proteoma seruma i jetre divljih svinja invadiranih metiljem *F. magna* korištenjem LC-MS/MS pristupa temeljenog na obilježavanju izobarnim privjescima, pokazala je promjene proteoma nositelja na lokalnoj i općoj razini, identificirajući proteine povezane s imunosnim odgovorom nositelja, oksidacijskim stresom i metaboličkim promjenama (KULEŠ i sur., 2021.). Ukupno je analizirano 13 uzoraka seruma i jetre kod invadiranih, i 13 uzoraka kod ne-invadiranih divljih svinja s područja Hrvatske. Divlja svinja je nositelj tipa slijepa ulica za metilja *F. magna*. U serumu su identificirana 4 proteina s značajno različitom ekspresijom između skupina, dok je u proteomskom profilu jetre bilo 116 proteina s različitom ekspresijom. Također je napravljena validacija proteomskih rezultata za paraoksonazu-1, ceruloplazmin, glutation-S-transferazu i jetrene enzime korištenjem ELISA testova i spektrofotometrijskih mjerenja, čime su potvrđeni proteomski rezultati.

Kod jelena običnog invadiranog metiljem *F. magna* pokazane su promjene u metabolizmu proteina i masnih kiselina, promjene vezane uz oksidativni stres, fibrozu i signalne putove metabolizma (ŠIMONJI i sur., 2022.). U tom istraživanju utvrđeno je 234 proteina s različitom zastupljenošću među kontrolnom i pokusnom skupinom na uzorku od 25 jetara, od čega je 12 jetara činilo negativnu skupinu, a 13 jetara invadiranu.

S obzirom na sve navedeno, treba istaknuti kako u dostupnoj znanstvenoj literaturi nema podataka o analizi proteoma jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna*.

3. PRETPOSTAVKA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Primjena semi-kvantitativnog proteomskog pristupa omogućit će izradu i analizu proteomskog profila jetre jelena lopatara (*Dama dama*). Pretpostavka istraživanja je da postoje razlike u proteomskom profilu jetre između kontrolne skupine jelena lopatara i jelena invadiranih metiljem *Fascioloides magna*, te se kod invadirane skupine očekuje da će prevladavati proteini koji sudjeluju u energetske metabolizmu i oksidativnom stresu.

Temeljni ciljevi istraživanja su:

- a) provesti semi-kvantitativnu proteomsku analizu proteina jetre jelena lopatara
- b) usporediti proteom jetre kontrolne skupine i skupine invadirane metiljem *F. magna*
- c) provesti bioinformatičku analizu značajno promijenjenih proteina i bioloških puteva povezanih s njima.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA I UZORKOVANJE

Ovo istraživanje tipa slučaj-kontrola sastoji se od dvije skupine, kontrolne i skupine slučaj (case). Za izračun veličine uzorka za ovo istraživanje, korišten je pristup temeljen na obradi literaturnih podataka (RUXTON i COLEGRAVE, 2016.). Konkretno, iz prethodno objavljene proteomske studije na divljim svinjama invadiranima metiljem *F. magna* (KULEŠ i sur., 2021.) analizirani su podaci o relativnoj zastupljenosti proteina u invadiranih i zdravih divljih svinja pomoću *on-line* dostupnoga Sample Size Calculator-a (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>). Uzimajući u obzir željenu statističku snagu od 80%, što je uobičajena razina u biokemijskim istraživanjima, i vrijednost 0,05 kao vjerojatnost statističke pogreške tipa I, procijenjena veličina uzorka iznosi 12 (srednja vrijednost temeljena na svim značajno različitim proteinima jetre uz prosječnu promjenu u zastupljenosti od 30%).

Zdravstveni status jelena procijenjen je na temelju kliničkog pregleda životinje i makroskopskog izgleda organa (Slika 5).



Slika 5. Invadirana jetra jelena lopatara (foto: K. Jerabek)

Ukupno je za potrebe ovoga istraživanja uzorkovano 13 uzoraka jetri neinvadiranih jedinki i 14 uzoraka tkiva jetre jelena lopatar invadiranih metiljem *F. magna* u dobi od dvije godine ili više. S obzirom da je istraživanje usmjereno isključivo na metilja *F. magna*, pojam neinvadirane ili invadirane jedinke se odnosi samo na prisutnost ovoga metilja, a ne i drugih parazita. Uzorci jetara prikupljeni su tijekom odrobljavanja životinja. Svaka jetra je izrezana na otprilike dva centimetra debele isječke i temeljito obostrano pregledana na znakove prisutnosti metilja *F. magna* ili *Fasciola hepatica* (Slika 6). Tako prikupljeni uzorci tkiva označeni su i pohranjeni na - 80 °C do izvođenja daljnjih analiza.



Slika 6. Pregled jetre jelena lopatar s vidljivim propalom pseudocistom (foto: K. Jerabek)

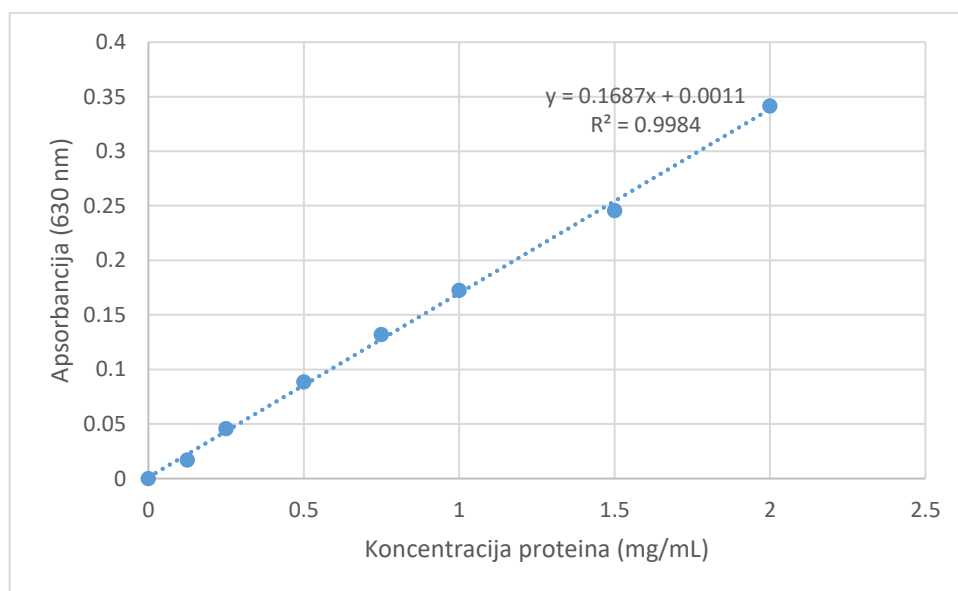
Istraživanje je provedeno u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost IP 8963 "Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna*". Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu odobrilo je istraživanje na 13. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća u akademskoj godini 2021./2022. održanoj dana 21. rujna 2022. godine (Klasa: 640-01/22-02/11, Ur. broj: 251-61-01/139-22-61).

4.2. PROTEOMSKJE ANALIZE TKIVA JETRE

4.2.1. EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA JETRE

Proteomska analiza tkiva jetre provedena je semi-kvantitativnim proteomskim pristupom pomoću izobarnih privjesaka koji omogućavaju multipleksiranje – istovremenu analizu deset uzoraka (KULEŠ i sur., 2021.).

Uzorci tkiva jetre (50 - 100 mg) homogenizirani su u 300 µl pufera za lizu (2% natrijev dodecil sulfat (SDS, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD), 0.05 M ditiotreitol (DTT, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u 0,1 M trietilamonijevom bikarbonatu (TEAB, Thermo Scientific, Rockford, SAD) pomoću Omni TH220 homogenizatora (Omni International, Kennesaw, SAD), zatim dva puta sonicirani na ledu po 10 s na maksimalnoj amplitudi (Qsonica, Newtown, SAD), te centrifugirani (16 000 x g, 4 °C, 20 min). Supernatant je odvojen i premješten u nove tubice i u njemu je određena koncentracija ukupnih proteina pomoću testa bicinoninske kiseline (engl. *BCA assay*) (Thermo Scientific, Rockford, SAD).



Slika 7. Kalibracijska krivulja za izračun ukupne koncentracije proteina u uzorcima jetre jelena lopatara

Koncentracija ukupnih proteina određena je slijedeći protokol za mikrotubice. Kao standard je korišten fetalni goveđi serumski albumin (BSA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

Pripremljeno je 7 razrjeđenja proteinskog standarda u koncentracijama od 0,125 mg/mL do 2 mg/mL proteina, a uzorci ekstrakta proteina iz tkiva jetre razrijeđeni su 100 puta. U mikrotitarsku pločicu nanešeno je 25 µL standarda i uzoraka, te zatim 200 µL radnog reagensa pripremljenog po uputama proizvođača. Nakon pola sata inkubacije na 37 °C, izmjerena je apsorbancija pri 630 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (BioTek Instruments, Vermont, USA). Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima određena je pomoću kalibracijske krivulje (Slika 7) izrađene pomoću programa Excel 2016 (Microsoft, Redmond, SAD).

4.2.2. DIGESTIJA PROTEINA I OBILJEŽAVANJE PEPTIDA

Uzorci su potom pročišćeni pomoću FASP (engl. *Filter-Aided Sample Preparation*) metode komercijalno dostupnim kolonama za ultrafiltraciju (WISNIEWSKI i sur., 2009.). FASP je metoda koja služi za pročišćavanje i ukoncentriravanje proteina te njihovu digestiju. Denaturirani proteini se zadržavaju na filteru veličine pora od 10 kDa gdje se vrši digestija tripsinom i ispiranje soli i detergenata koji nisu kompatibilni sa spektrometrijom masa.

Iz svakog uzorka volumen koji odgovara 35 µg proteina dopunjen je do 200 µl urea puferom (8 M urea u 0,1 M Tris-HCl-u, pH = 8.5), te prenesen na 10 kDa filtere (Microcon YM-10, Merck Millipore). Nakon centrifugiranja (13 000 x g, 20 min, 20 °C) i ponovnog ispiranja urea puferom, proteini su alkilirani (50 mM jodoacetamid, 20 min na sobnoj temperaturi u mraku) (IAA, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, SAD), dva puta isprani urea puferom, te dva puta pomoću 100 µl TEAB-a. Digestija na filteru provedena je dodatkom tripsina (1 mg/mL, inkubacija na 37 °C preko noći) (Trypsin Gold, Promega, Madison, SAD). Sljedeći dan, peptidi su eluirani uz dodatak 50 µL smjese TEAB/acetonitrila (1:1,v/v).

Reagensi s izobarnim privjescima (engl. *Tandem Mass Tag 10plex, TMT, Thermo Scientific, Rockford, IL, SAD*) pripremljeni su prema uputama proizvođača. U svaki uzorak dodano je 19 µl specifičnog privjeska (60 min, na sobnoj temperaturi), a reakcija obilježavanja je zaustavljena dodatkom 8 µl 5% hidroksilamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Devet nasumično odabranih obilježenih uzoraka spojeno je s unutarnjim standardom (pool svih uzoraka koji služi za normalizaciju) u jedan uzorak, osušen pomoću vakuum centrifuge te analiziran uz pomoć vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*).

4.2.3. ANALIZA UZORAKA LC-MS/MS PRISTUPOM

Uzorci obilježeni TMT-om analizirani su pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa visoke rezolucije postupkom podatkovno ovisne akvizicije (DDA, engl. *Data Dependent Acquisition*), kao što je prethodno opisano u dostupnoj literaturi (HORVATIĆ i sur., 2019.).

LC-MS/MS analiza TMT-om obilježenih peptida provedena je korištenjem Dionex UltiMate 3000 RSLCnano sustava (Thermo Fisher Scientific, Gemering, Njemačka) spregnutog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus s hibridnim analizatorom masa kvadrupola i Orbitrapa (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka). Peptidi su otopljeni u puferu za nanošenje uzoraka (2% acetonitril, 0,1% mravlja kiselina) i naneseni na predkolonu (C18 PepMap100, 5 μ m, 100A, 300 μ m $\times$ 5 mm), te razdvojeni na analitičkoj koloni (PepMap™ RSLC C18, 50 cm $\times$ 75 μ m) korištenjem gradijenta od 155 minuta. Pokretna faza A sastojala se od 0,1% mravlje kiseline u vodi, a pokretna faza B bila je 0,1% mravlja kiselina u 80%-om acetonitrilu (Honeywell, Charlotte, NC, SAD).

Ionizacija elektroraspršenjem je postignuta korištenjem nanoraspršenja Flex izvora iona (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka), koji sadrži emiter SilicaTip (New Objective) unutarnjeg promjera 10 μ m. Spektrometrija masa je provedena u pozitivnom načinu rada spektrometra masa koristeći metodu podatkovno ovisne akvizicije DDA Top8. Napon ionskog izvora za MS je bio + 2.00 kV, a temperatura kapilare za prijenos iona 275 °C. Spektar masa snimljen je u rasponu od 350,0 m/z do 1800,0 m/z pri razlučivosti od 70 000, vremenu injektiranja od 120 ms, AGC vrijednošću 1×10^6 , izolacijskom prozoru od $\pm 2,0$ Da i dinamičkom isključenju od 30 s. Fragmentacija HCD provedena je pri normaliziranoj energiji sudara (NCE) (29% i 35%) s razlučivanjem od 17 500 i ciljnom vrijednošću AGC-a od 2×10^5 . Ioni prekursori neodređenog naboja, kao i oni s nabojem +1 i više od +7 bili su isključeni iz daljnjeg odabira fragmentacije.

Za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju proteina korišten je SEQUEST algoritam unutar računalnog programa Proteome Discoverer (verzija 2.3., Thermo Fisher Scientific). Provedena je pretraga baze podataka *Cervidae* preuzete s UniprotKB 9. srpnja 2021. godine, koja je sadržavala 105 671 unosa, prema sljedećim parametrima: dozvoljena dva promašena mjesta cijepanja tripsinom, tolerancija pogreške izmjerene mase prekursora i fragmenata od 10 ppm i 0,05 Da, karbomidometil (C) kao fiksna modifikacija peptida, oksidacija (M) i TMT 6-pleks

(K, peptidni N-kraj) kao dinamičke modifikacije peptida. Postotak krivih očitavanja (engl. *false discovery rate*, *FDR*) prilikom identifikacije peptida izračunat je putem Percolator algoritma unutar računalnog programa Proteome Discoverer. Kvantifikacija proteina postignuta je usporedbom relativnih intenziteta reporterskih iona ekstrahiranih iz tandemskog masenog spektra sa spektrima peptida odabranih za MS/MS fragmentaciju. Interni standard omogućio je usporedbu relativnih rezultata kvantifikacije između različitih 10plexa. Količina proteina normalizirana je na ukupnu količinu proteina i skalirana na prosjek unutarnjeg standarda kako bi se omogućila usporedba unutar jednog 10plexa odnosno između različitih 10plexa. Proteini s najmanje dva jedinstvena peptida i 1% FDR smatrani su pouzdano identificiranima te su korišteni u daljnjim analizama.

4.3. STATISTIČKE I BIOINFORMATIČKE ANALIZE

Proteini koji su bili prisutni u najmanje 50% uzoraka uključeni su u daljnu statističku analizu. Statistička analiza provedena je korištenjem R softvera v.4.1.2. (R CORE TEAM, 2020.), prema prethodno objavljenom internom protokolu (KULEŠ i sur., 2021.). Budući da većina identificiranih proteina nije pratila normalnu distribuciju (kako je utvrđeno Shapiro-Wilkovim testom), razlike između skupina ispitane su neparametrijskim Mann–Whitneyevim U testom, s razinom značajnosti $p < 0,05$. Razlika u ekspresiji između dvije skupine izračunata je kao srednja vrijednost (skupina invadirana metiljem *F. magna*)/srednja vrijednost (kontrolna skupina) i izražena na log2 skali. R paket ggplot2 v3.1.1 (WICKHAM, 2016.) korišten je za analizu glavnih komponenata (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) i raspršeni grafički prikaz (engl. *volcano plot*).

Za bioinformatičku analizu, jedinstvena oznaka proteina prvo je pretvorena u službeni simbol gena pomoću alata za mapiranje UniProtKB ID (THE UNIPROT CONSORTIUM 2020.). Pomoću alata UniProt BLAST oznake gena zamijenjene su s najbližim podudarnim ortologom iz baze *Bos taurus* (najmanje 70% podudarnosti). Kako bi se identificirala i utvrdila uloga značajno promijenjenih proteina između dvije ispitivane skupine, kao i međusobna povezanost u organizmu, korištena je bioinformatička platforma STRINGdb v12.0 (<https://string-db.org/>) (SZKLARCZYK i sur., 2023.). Analizom proteomskih podataka dobivamo listu gena koje možemo povezati s molekularnim i biološkim putevima te funkcionalnim kategorijama kao što je genska ontologija (GO, engl. *gene ontology*)

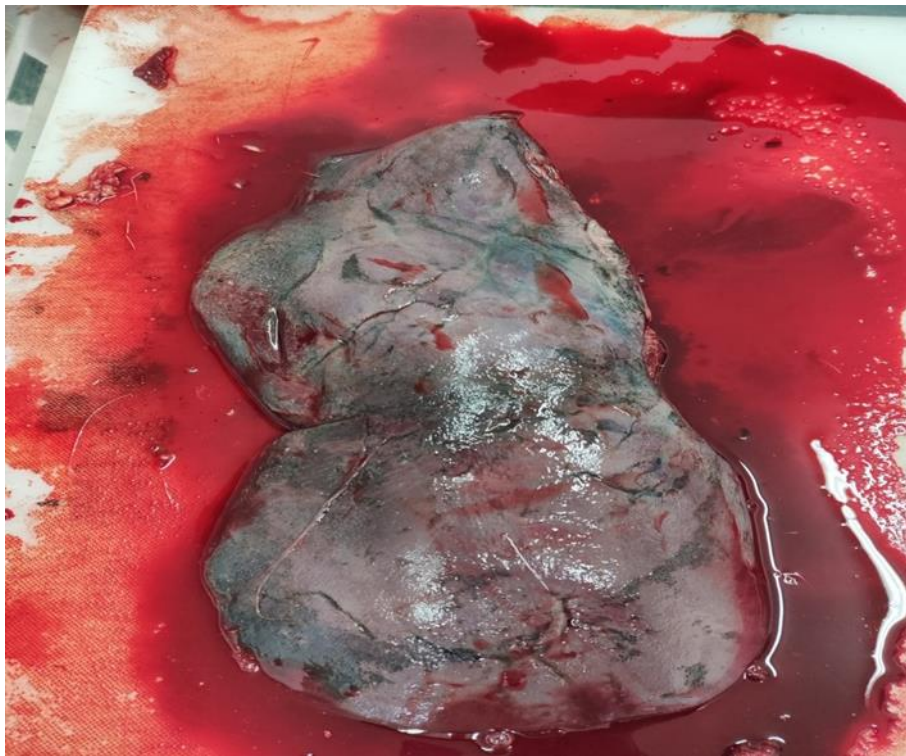
(ASHBURNER i sur., 2000.). Genska ontologija je zapravo katalogizacija određenog gena, a pojmovi se dijele u tri ontologije koje predstavljaju različite biološke aspekte: molekularna funkcija (MF, engl. *molecular function*), biološki proces (BP, engl. *biological proces*) i stanična komponenta (CC, engl. *cellular component*).

Analiza bioloških puteva povezanih s značajno promijenjenima proteinima jetre jelena lopatara napravljena je pomoću alata Reactome koristeći humani genom kao pozadinu i putevi s $FDR < 0,05$ izdvojeni su kao značajni (GILLESPIE i sur., 2021.).

5. REZULTATI

5.1. DIJAGNOZA INVAZIJE METILJEM *F. MAGNA* I PREGLED JETRE

Parazitološki pregled jetre je zlatni standard u dijagnostici fascioloidoze. Jetra životinja sakupljena iz područja na kojem je prisutna invazija pokazala je tragove željezo-porfirina (crni pigment) na površini i rezovima, naslage fibrina na Glissonovoj čahuri, gubitak prozirnosti i nepravilnu površinu jetre (Slika 8). Prisutnost željezo-porfirina karakteristična je samo za invaziju metiljem *F. magna* u Europi, stoga vizualni pregled s temeljitom analizom jetre na način da se tkivo jetre reže na 2 cm debele isječke koji se temeljito obostrano pregledavaju, predstavlja najtočniji oblik dijagnostike fascioloidoze. U migratornim kanalima pozitivnih životinja koje su napravili mladi metilji utvrđene su pseudociste, mladi i odrasli metilji (Slika 9 i 10). Nasuprot tome, jetra neinvadiranih, kontrolnih životinja izgledala je normalno, bez ikakvih patoloških promjena i bez metilja *F. magna*.



Slika 8. Invadirana jetra jelena lopatara s vidljivim zamućenjem kapsule, naslagama fibrina, nepravilnom površinom i tragovima pigmenta željezo - porfirina (foto: K. Jerabek)



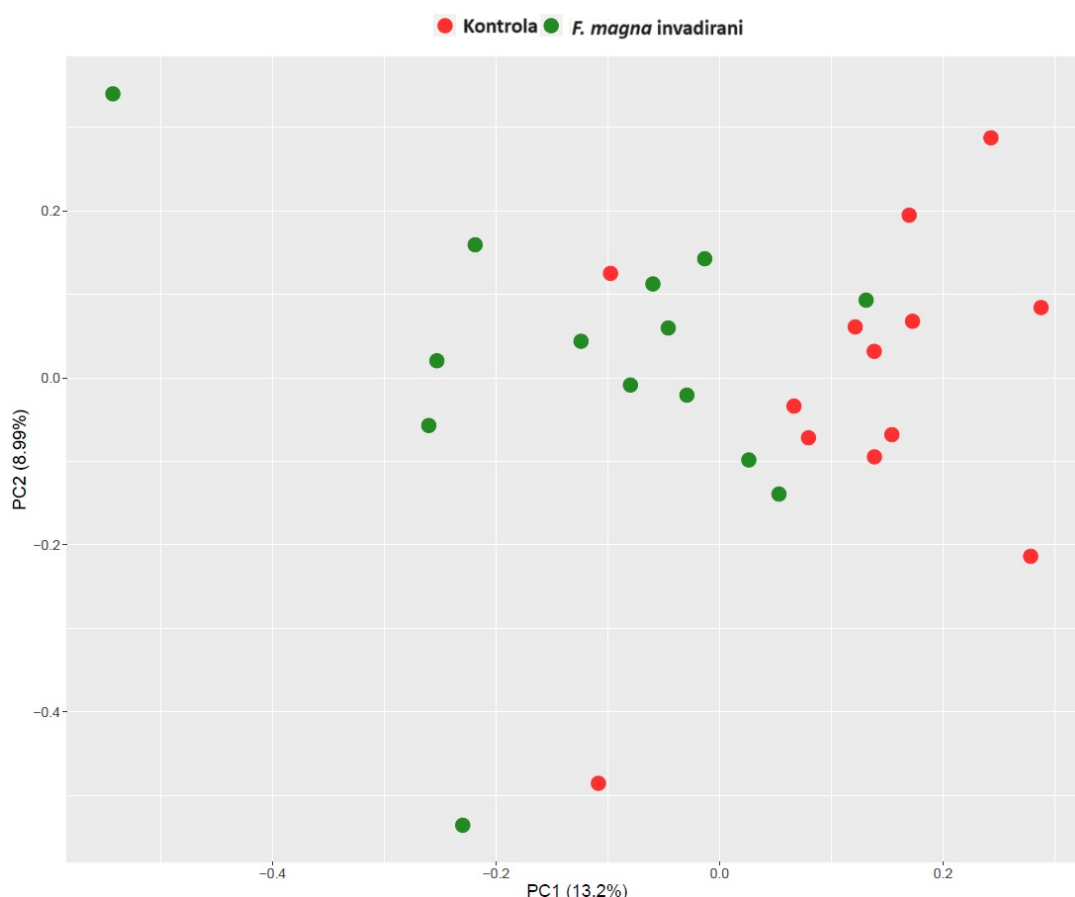
Slika 9. Propala pseudocista (foto: K. Jerabek)



Slika 10. Pseudocista u jetri jelena lopatara (foto: K. Jerabek)

5.2. REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE JETRE JELENA LOPATARA PRIMJENOM TEHNIKA LC-MS/MS

Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om, analizirano je 27 uzoraka jetre jelena lopatara. Analiza prikupljenih podataka u Proteome Discovereru pokazala je da je ukupno identificirano 520 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR. U daljnju statističku i bioinformatičku obradu uključeni su samo proteini koji su bili prisutni u najmanje 50% uzoraka.

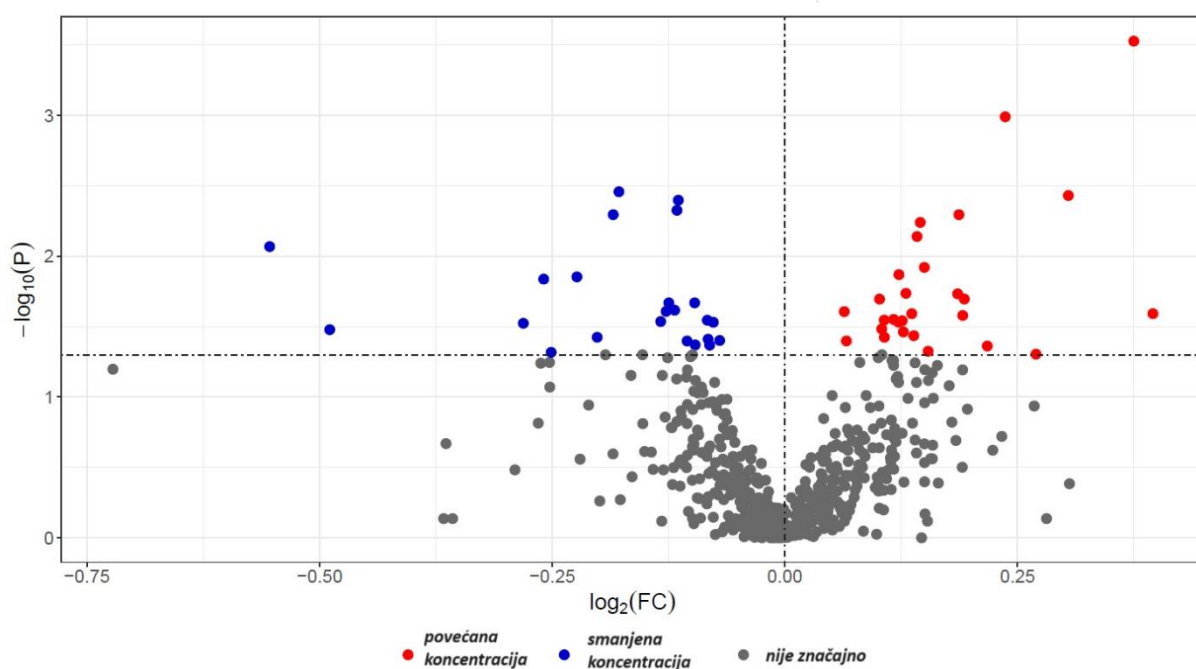


Slika 11. Rezultati analize glavnih komponentata u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* (N = 14) i zdravih jelena (N = 13) analiziranih LC-MS proteomskim pristupom. Crveni kružići predstavljaju kontrolne uzorke, dok zeleni kružići predstavljaju uzorke jetre invadiranih životinja.

Analizom glavnih komponentata istražene su unutarnje varijacije i odstupanja između dviju skupina te je pokazano pretežno jasno odvajanje kontrolne i invadirane skupine (Slika 11).

Skupine su razdvojene na temelju glavne komponente 1 (PC1) koja je obuhvatila 13,2% varijance cijelog skupa podataka, dok je glavna komponenta 2 (PC2) obuhvatila 8,99% varijance.

Statistička analiza proteina identificiranih proteomskim pristupom pokazala je da se 50 proteina razlikuje u zastupljenosti (ekspresiji) između kontrolne i *F. magna* invadirane skupine, pri čemu je 28 proteina s višom, a 22 proteina s manjom ekspresijom u invadiranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, što je i prikazano u grafičkom prikazu (Slika 12). U Tablici 1. prikazani su svi značajno različiti proteini između ispitivanih skupina, zajedno s njihovim identifikacijskim brojem proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt, oznakom gena, nazivom proteina, P vrijednošću, te razlikom u ekspresiji ($\log_2FC$).



Slika 12. Raspršeni grafički prikaz (engl. *volcano plot*) različito eksprimiranih proteina u jetri jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* u odnosu na kontrolnu skupinu. Plavo su označeni proteini manje, a crveno više eksprimirani u uzorcima invadirane skupine. Sivo označeni proteini nisu statistički značajni.

Tablica 1. Tablični prikaz različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* (N = 14) i zdravih jelena (N = 13) analiziranih LC-MS proteomskim pristupom. Prikazan je identifikacijski broj proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt, oznaka gena, naziv proteina, P vrijednost (Mann-Whitney test) i razlika u ekspresiji (log2FC).

Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)	Naziv proteina	log2FC	P vrijednost
A0A212DF69	SHMT2	Serin hidroksimetiltransferaza	0,395	0,026
A0A212CMB3	A0A3Q1M3L6_BOVIN	Protein koji sadrži Ig-sličnu domenu*	0,375	0,000
A0A6J0WI00	SLC25A6	ADP/ATP translokaza	0,305	0,004
A0A6J0ZDH8	SACM1L	Fosfatidilinozimid fosfataza SAC1 izoforma X2	0,270	0,050
A0A5N3V3T4	RPL4	60S ribosomalni protein L4	0,237	0,001
A0A6J0YK26	DDC	Dekarboksilaza aromatske L-aminokiseline	0,218	0,043
A0A6J0Y1X6		Histon H2B	0,193	0,020
A0A5J5N9Y0	LMNB2	Lamin B2*	0,191	0,026
A0A6J0WPM6	PPIB	Peptidil-prolil cis-trans izomeraza	0,187	0,005
A0A5N3VYE6	LOC781988	UDP-glukuronoziltransferaza	0,186	0,019
A0A5J5MZE9	COL6A3	Kolagen tip VI alfa 3 lanac*	0,154	0,047
A0A6J0ZE75	CYP2C87	Citokrom P450 2C19	0,150	0,012
A0A5N3XAY5	NIPSNAP1	Protein koji sadrži NIPSNAP domenu	0,145	0,006
A0A5J5MNC2	FN1	Fibronektin	0,142	0,007
A0A5N3V1K9	LOC540544	UDP-glukuronoziltransferaza	0,138	0,037

Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)	Naziv proteina	log2FC	P vrijednost
A0A5N3XW03	FMO3	Dimetilanilin monooksigenaza [tvori N-oksid]	0,136	0,026
A0A212D8V1	MLEC	Protein koji sadrži domenu malektina	0,130	0,018
A0A6J0WIK2	RPS18	40S ribosomalni protein S18	0,127	0,035
A0A212CZA8	ACSM5	Acil-CoA sintetaza srednjeg lanca 5*	0,126	0,029
A0A6J0XLP6	OGDH	Oksoglutarat dehidrogenaza (prijenos sukcinila)	0,123	0,014
A0A5N3XZ93	KRT18	Protein koji sadrži IF-rod domenu	0,122	0,029
A0A6J0VQK2	SLC37A4	Glukoza-6-fosfat izmjenjivač SLC37A4 izoforma X2	0,117	0,028
A0A6J0WVV4	RPS14	40S ribosomalni protein S14	0,107	0,038
A0A6J0YL12	UBE2V1	Ubikvitin-konjugirajući enzim E2 varijanta 1 izoforma X1	0,107	0,028
A0A6J0WFR2	LOC530553	UDP-glukuronoziltransferaza	0,104	0,033
A0A5N3VS54	RPS6	40S ribosomalni protein S6	0,102	0,020
A0A6J0WSX8	PAPSS2	Bifunkcionalna 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosulfat sintaza 2 izoforma X3	0,066	0,040
A0A6J0XRA7	IQGAP2	Ras GTPaza-aktivirajući protein IQGAP2	0,064	0,025
A0A5N3VWU4	ADI1	1,2-dihidroksi-3-keto-5-metiltiopenten dioksigenaza	-0,077	0,029
A0A212CNB3	ALAD	Dehidrataza delta-aminolevulinske kiseline	-0,081	0,043
A0A5N3VCS9	AMDHD1	Imidazonpropionaza	-0,082	0,039
A0A6J0WFH2	PAH	Fenilalanin 4-monooksigenaza	-0,083	0,028

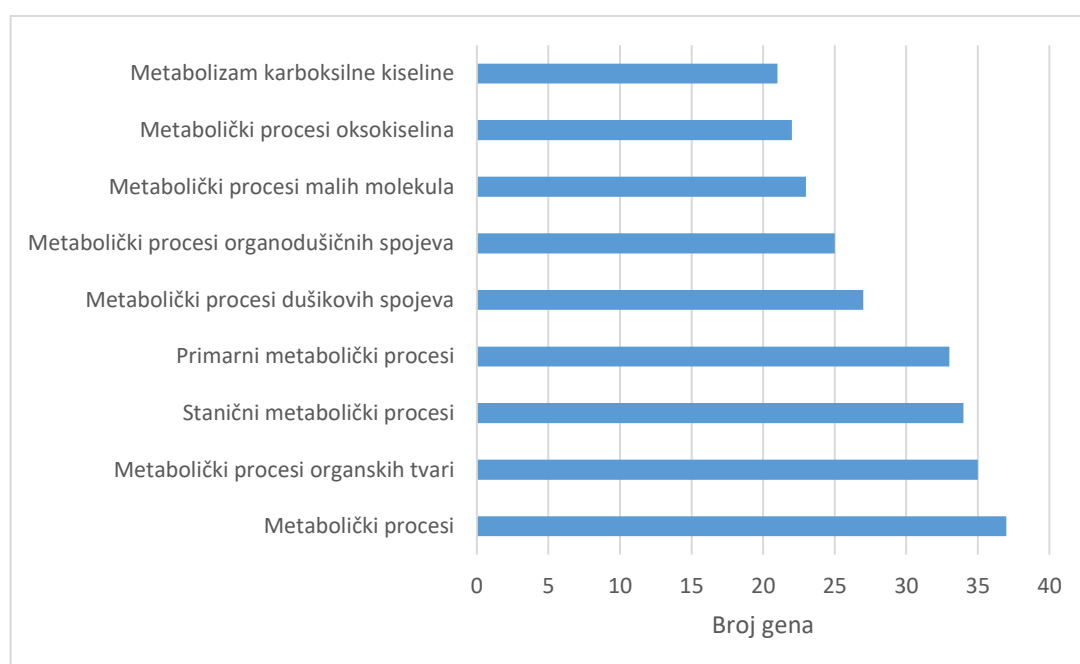
Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)	Naziv proteina	log2FC	P vrijednost
A0A5J5MKP0	MDH1	Malat dehidrogenaza	-0,096	0,043
A0A5N3W8N4	HSPA9	Protein toplinskog šoka 70, mitohondrijski	-0,097	0,021
A0A6J0XRA4	FH	Fumarat hidrataza, mitohondrijska	-0,105	0,040
A0A5N3XVZ5	ALDH1L1	10-formiltetrahidrofolat dehidrogenaza	-0,115	0,004
A0A5N3VNB5	ETFB	Beta podjedinica flavoproteina za prijenos elektrona	-0,116	0,005
A0A6J0WZS6	SLC27A2	Acil-CoA sintetaza dugačkih lanaca	-0,118	0,024
A0A833S4Q0	HSP90AA1	Protein toplinskog šoka 90-alfa*	-0,125	0,021
A0A5N3WFA7	IDH1	Izocitrat dehidrogenaza [NADP]	-0,128	0,025
A0A6J0XRS4	YARS1	Tirozin--tRNA ligaza	-0,133	0,029
A0A6J0YMV4	ALDH6A1	Metilmalonat-semialdehid dehidrogenaza [acilirajuća], mitohondrijska	-0,178	0,003
A0A6J0X7H3	SUCLG2	Sukcinat--CoA ligaza [stvara GDP] podjedinica beta, mitohondrijska	-0,184	0,005
A0A6J0WI12	ECHS1	Enoil-CoA hidrataza, mitohondrijska	-0,202	0,038
A0A5N3W122	HSPA1B	Protein toplinskog šoka 70 kDa 1B*	-0,223	0,014
A0A6J0YQ06	DPYD	Dihidropirimidin dehidrogenaza [NADP(+)]	-0,251	0,048
A0A6J0Y7Z9	LOC527068	Dihidrodiol dehidrogenaza 3-slična	-0,259	0,015
A0A5J5N143	AGXT	Serin-piruvat aminotransferaza	-0,281	0,030
A0A5N3WB21	FGA	Alfa lanac fibrinogena	-0,489	0,033

Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena (<i>Bos taurus</i>)	Naziv proteina	log2FC	P vrijednost
A0A6J0YKY0	PTGR1	Prostaglandin reduktaza 1	-0,554	0,009

*nakon BLAST analize

5.3. REZULTATI BIOINFORMATIČKE ANALIZE PROTEINA JETRE JELENA LOPATARA

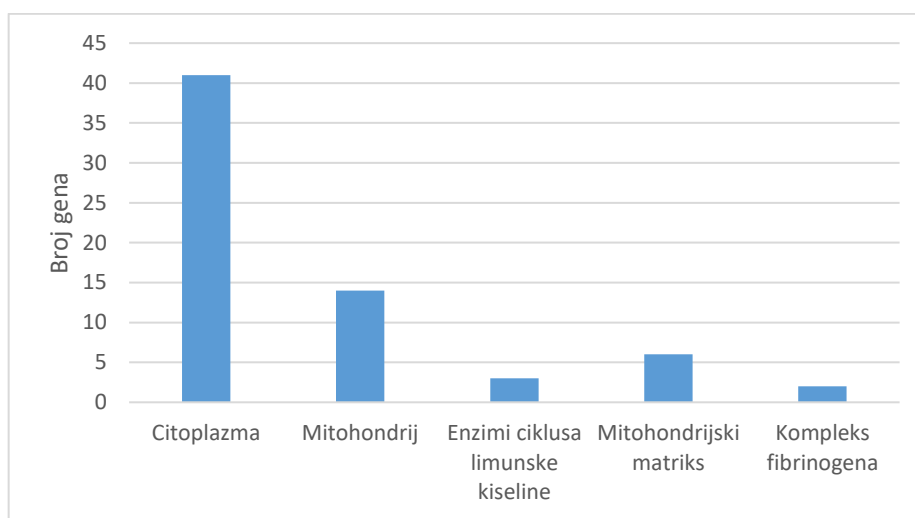
Za bioinformatičku analizu, korištena je bioinformatička platforma STRINGdb v12.0 (<https://string-db.org/>). Baza podataka STRING sustavno prikuplja i integrira protein-protein interakcije, kako fizičke interakcije tako i funkcionalne asocijacije. Podaci potječu iz brojnih izvora: automatiziranog pregleda teksta znanstvene literature, računalnog predviđanja interakcije iz ko-ekspresije, očuvanog genomskog konteksta, baze podataka eksperimenata interakcije i poznatih kompleksa/putova iz odabranih izvora (SZKLARCZYK i sur., 2023.). Sve te interakcije se kritički procjenjuju, ocjenjuju i zatim automatski prenose na manje proučene organizme pomoću hijerarhijskih ortoloških informacija. Jedna od jedinstvenih značajki STRING-a je njegova podrška za veliki izbor nemodelnih organizama: trenutna verzija baze podataka sadrži protein-protein interakcije (i funkcionalne opise proteina) za više od 10 000 različitih genoma. STRING koristi genome iz autoritativnih izvora, uključujući Ensembl (CUNNINGHAM i sur., 2022.), UniProtKB referentne proteome (UniProt Consortium, 2021.) i „reprezentativne genome“ postavljene u bazi podataka proGenomes (MENDE i sur., 2020.).



Slika 13. Grafički prikaz ontologije za biološki proces različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0. Prikazani su samo pojmovi genske ontologije koji sadržavaju 20 i više gena.

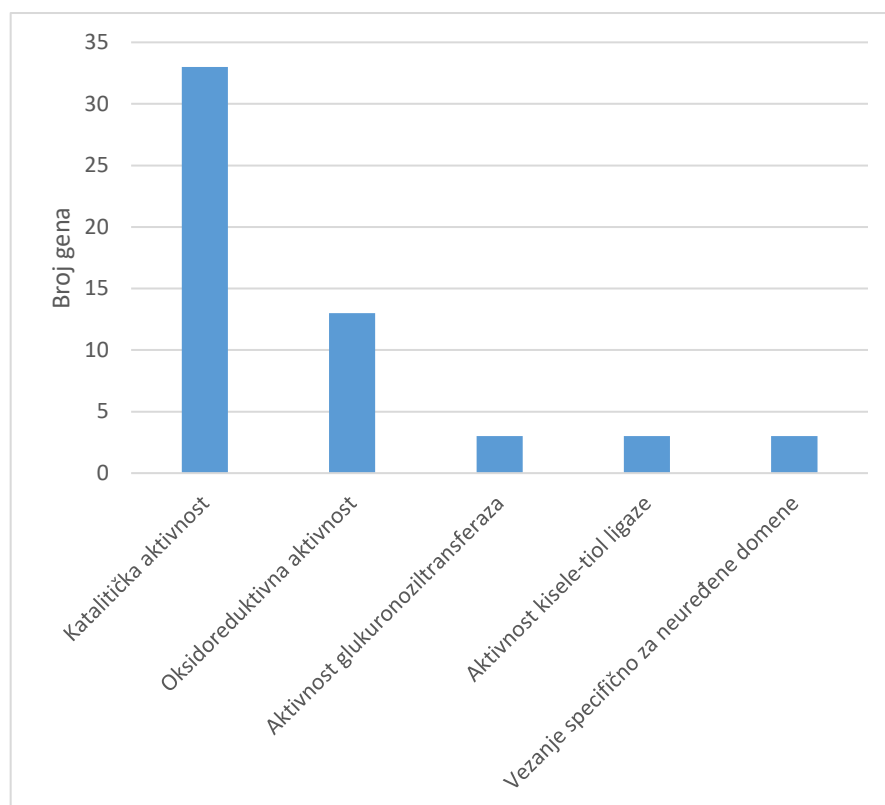
Provedena je analiza genske ontologije pri čemu su korištena imena gena različito eksprimiranih proteina. Genska ontologija za biološki proces pokazala je da je najveći broj gena ($N = 37$) uključen u metaboličke procese, i to metaboličke procese organskih tvari ($N = 35$), stanične metaboličke procese ($N = 34$), te metaboličke procese dušikovih spojeva ($N = 27$). Rezultati genske ontologije za biološki proces prikazani su na Slici 13.

Rezultati analize genske ontologije za staničnu lokalizaciju pokazali su da najviše različito eksprimiranih proteina ima porijeklo iz citoplazme ($N = 41$) i mitohondrija ($N = 14$) (Slika 14).



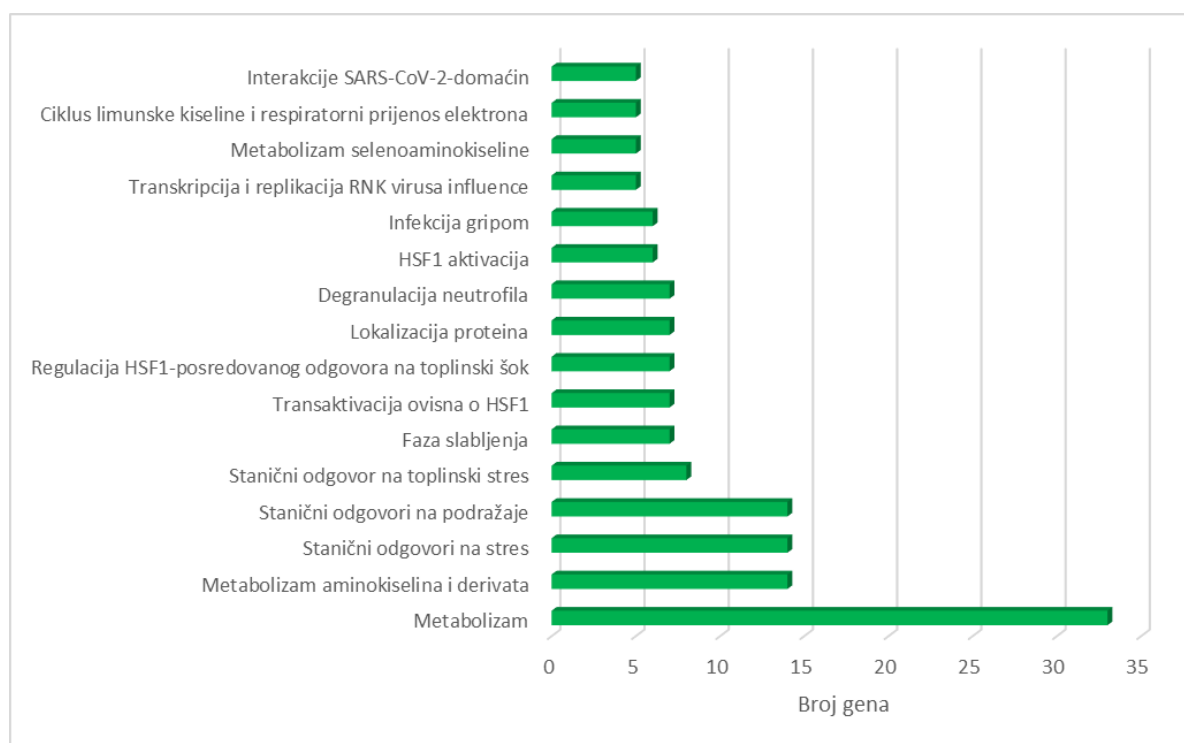
Slika 14. Grafički prikaz genske ontologije za staničnu lokalizaciju različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0.

Analiza genske ontologije za molekularnu funkciju različito eksprimiranih proteina pokazala je da su najzastupljeniji proteini s katalitičkim djelovanjem ($N = 33$) i oksidoreduktaze ($N = 13$) (Slika 15).



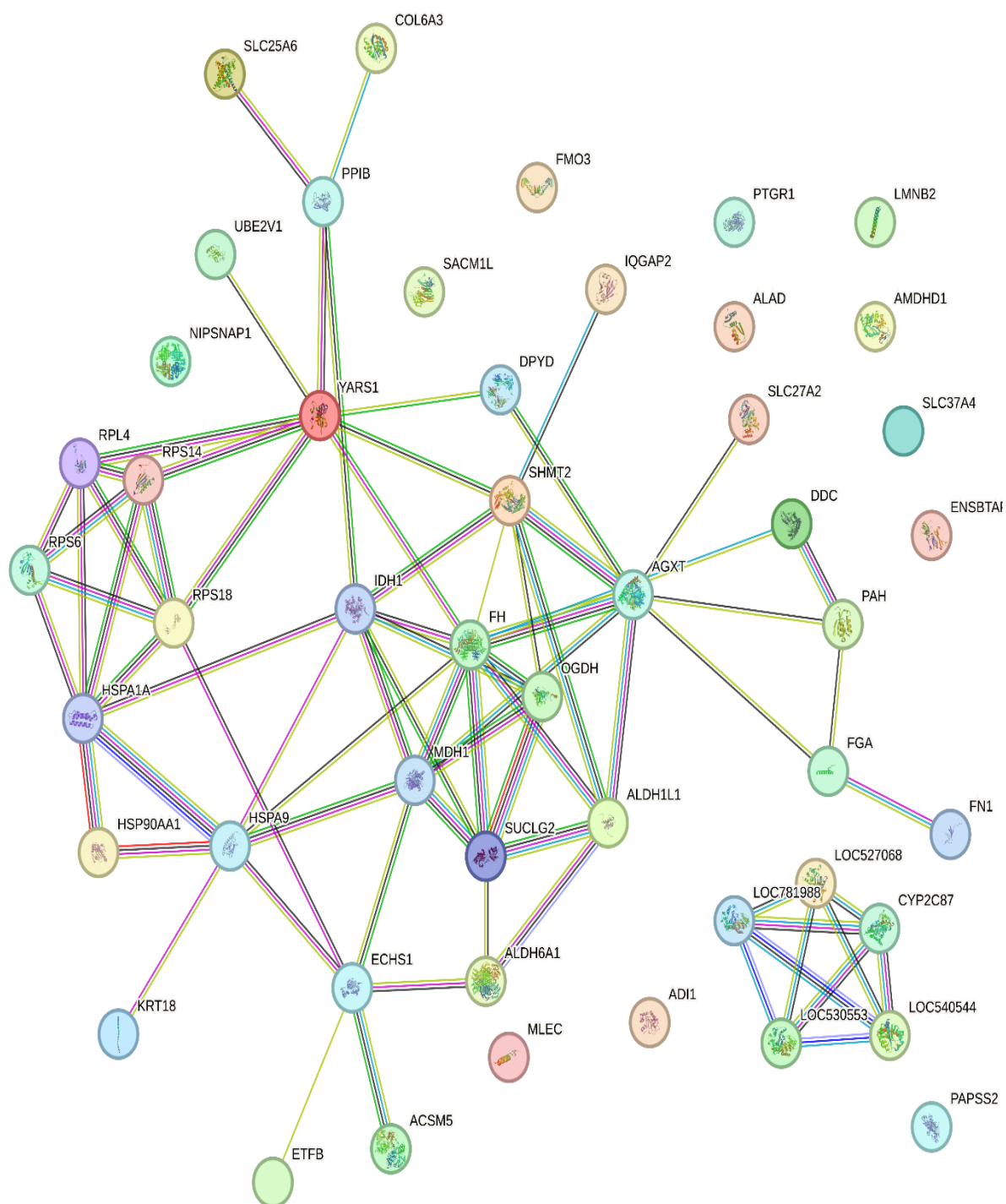
Slika 15. Grafički prikaz genske ontologije za molekularnu funkciju različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0.

Analiza bioloških puteva povezanih s različito eksprimiranim proteinima u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* i zdravih jelena napravljena je uz pomoć bioinformatičkog alata Reactome, te su se 48 bioloških puteva pokazali značajnima ($FDR < 0,05$). Na Slici 16. prikazani su značajno promijenjeni biološki putevi koji uključuju 5 i više gena. Dobiveni rezultati ukazuju da *F. magna* invazija najviše utječe na metabolizam ($N = 33$), stanične odgovore na stres ($N = 14$), podražaje ($N = 14$) i toplinski stres ($N = 8$).



Slika 16. Prikaz značajno obogaćenih bioloških puteva s najmanje 5 gena po putu povezan s *F. magna* invazijom kod jelena lopatara napravljen pomoću alata Reactome.

Međusobna povezanost značajno promijenjenih proteina između dvije ispitivane skupine vidljiva je na mrežnom prikazu (Slika 17.), gdje se uočava povezanost i interakcija različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* i zdravih jelena.



Slika 17. Mrežni prikaz povezanosti i interakcija različito eksprimiranih proteina u uzorcima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* i zdravih jelena dobiven koristeći platformu STRINGdb v12.0. Puni nazivi gena nalaze se u Tablici 1.

6. RASPRAVA

Tijekom dugog niza godina divlje životinje su prepoznate kao potencijalni izvor različitih bolesti za domaće životinje i ljude (MCCALLUM I DOBSON, 1995.; DASZAK i sur., 2000.). S razvojem proteomike i njenom sve većom dostupnošću, mnoge prednosti primjene proteomike na ne-modelnim organizmima dolaze do izražaja. Proteomska analiza divljih životinja otvara nove mogućnosti u biomedicinskim istraživanjima, poljoprivredi i sigurnosti hrane (HECK I NEELY, 2020.). S obzirom na pristup Jedno zdravlje i nedavnu pandemiju SARS-CoV-2, istraživanje divljih životinja postaje sve važnije za proučavanje zoonoza. Ovo je posebno istaknuto kada su u pitanju unosi neautohtonih vrsta parazita na određeno područje. Jedan takav primjer je unos velikog američkog jetrenog metilja u Europu iz Sjeverne Amerike. Patološke promjene, klinički znakovi i ishod invazije parazitom *F. magna* usko su povezani s vrstom nositelja (konačni, aberantni i tipa slijepa ulica) te njihovom različitom tolerancijom na invaziju. Opsežna proteomska istraživanja na različitim vrstama nositelja bit će od ključne važnosti za naše razumijevanje parazitskih invazija, predikciju zoonoza i identifikaciju mogućih terapija.

Proteomsko profiliranje jetre kod jelena lopatara u ovom istraživanju omogućilo je uvid u složene međuodnose nositelja i parazita. Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om, analizirano je 27 uzoraka jetre jelena lopatara. Analiza prikupljenih podataka pokazala je da je ukupno identificirano 520 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR. Daljnja statistička analiza pokazala je da se 50 proteina razlikuje u zastupljenosti između kontrolne i *F. magna* invadirane skupine, pri čemu je 28 proteina više, a 22 proteina manje zastupljeno u invadiranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

Studija proteoma jetre divljih svinja invadiranih parazitom *F. magna* pokazala je da su svi diferencijalni proteini bili manje eksprimirani u invadiranih svinja u usporedbi s onima bez invazije (KULEŠ i sur., 2021.). Nedavno istraživanje provedeno od strane ŠIMONJI i sur. (2022.) analiziralo je promjene u proteomu jetre običnih jelena nakon invazije velikim američkim metiljem, gdje su identificirana 234 proteina s različitom razinom ekspresije između kontrolne i pokusne skupine. Invazija metiljem imala je utjecaj na više od 50% proteoma, s promjenama u oba smjera u usporedbi s kontrolnom skupinom. U istraživanju na jelenu lopataru također su uočene promjene u ekspresiji proteina u oba smjera, ali u manjem opsegu nego kod jelena običnog (oko 10% proteoma). Ipak, interpretacija rezultata zahtijeva oprez s obzirom na

to da su u oba istraživanja proučavani prirodno invadirani slobodno živeći jeleni s različitim stupnjevima invazije i varijabilnosti među pojedinačnim životinjama.

Jeleni lopatari su konačni nositelji za metilja *F. magna*. S obzirom na tropizam parazita, promjene u biološkim putovima unutar jetrenog tkiva predstavljaju primarni cilj istraživanja. Jetra nudi povoljno imunološko okruženje za parazite koji su razvili složene i višeslojne mehanizme s mogućnošću moduliranja odgovora nositelja kako bi suzbili invaziju i popravili oštećenja tkiva. Jetra je najveća žlijezda u organizmu i odgovorna je za proizvodnju većine proteina seruma, uključujući hormone, proteine nosače, apolipoproteine, kao i čimbenike potrebne za zgrušavanje krvi i fibrinolizu. Kao metaboličko središte organizma sisavaca, jetra obavlja širok raspon bioloških funkcija, poput metabolizma aminokiselina, masnih kiselina i ugljikohidrata; sinteze žučnih kiselina i hormona; biogeneze lipoproteina; te detoksikacije ksenobiotika (HE, 2005.).

Jetra također predstavlja jedinstveno okruženje za razvoj i funkciju imunosnog odgovora. Patološki uvjeti poput akutnog i kroničnog upalnog procesa jetre, a koji između ostaloga mogu biti uzrokovani parazitima koji ulaze u jetru, dovode do postupne parcijalne ili potpune disfunkcije jetre. Jetra ima veliku sposobnost regeneracije i zamjene parenhimskih stanica nakon akutne ozljede (prodiranja i migracije jetrenog metilja), dok je u kroničnoj upali zbog trajne ozljede (parazit smješten u jetri) oštećenje hepatocita progresivno i na kraju dovodi do stvaranja fibroznog tkiva. Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da su proteomski profili jetre kontrolnih i invadiranih jelena lopatara pretežno jasno odvojeni, iako dolazi do blagog preklapanja, što je u skladu s kliničkim simptomima, odnosno nedostatkom istih kod konačnog nositelja ovog parazita (Slika 11).

Genska ontologija za biološki proces pokazala je da je najveći broj različito eksprimiranih proteina između invadirane i kontrolne skupine uključen u metaboličke procese, i to metaboličke procese organskih tvari i stanične metaboličke procese. I analiza bioloških puteva pokazala je da je metabolizam najdominantnija kategorija među različito eksprimiranim proteinima jetre jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* i zdravih jelena. Tako su identificirani proteini koji sudjeluju u metabolizmu ugljikohidrata, aminokiselina i masnih kiselina, enzimi ciklusa limunske kiseline, oksidativne fosforilacije i beta oksidacije (među ostalima: ADP/ATP translokaza, acil-CoA sintetaza srednjeg lanca, malat dehidrogenaza, fumarat hidratataza, beta podjedinica flavoproteina za prijenos elektrona, acil-CoA sintetaza dugačkih lanaca, izocitrat dehidrogenaza, enoil-CoA hidratataza).

Jetra je ključni organ u energetsom metabolizmu organizma te ima važnu ulogu u proizvodnji, skladištenju i regulaciji različitih tvari koje su ključne za održavanje energetske ravnoteže tijela. Masne kiseline se razgrađuju u mitohondrijima putem beta-oksidacije, što rezultira stvaranjem acetil-CoA i NADH-a koji se koriste u Krebsovom ciklusu za proizvodnju ATP-a. Ovi procesi energetskeg metabolizma jetre su temeljni za održavanje homeostaze i osiguravanje energije potrebne za normalno funkcioniranje organizma. U ovom istraživanju pokazana je smanjena ekspresija raznih enzima uključenih u metabolizam ugljikohidrata, Krebsov ciklus i oksidativnu fosforilaciju kod jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna*. Ovi su rezultati u skladu s prethodnim istraživanjima koja su pokazala promjene u energetsom metabolizmu u jetri divljih svinja i jelena običnih invadiranih metiljem *F. magna* (KULEŠ i sur., 2021.; ŠIMONJI i sur., 2022.). Također, u bivola invadiranih parazitom *F. gigantica*, smanjena regulacija procesa povezanih s metabolizmom u jetri bila je istaknuta u svim vremenskim točkama (ZHANG i sur., 2019.). Promjene u energetsom metabolizmu jetre dokumentirane su u različitim parazitskim invazijama, uključujući invaziju metiljem *F. hepatica* u jetri ovaca i štakora (RULE i sur., 1989.; LENTON i sur., 1995.)

Značajan broj različito eksprimiranih proteina bio je povezan s metabolizmom lipida i metabolizmom masnih kiselina. Tijekom svog razvoja u jetri, spolno nezreli metilji prelaze s oslanjanja na endogene izvore energije na ovisnost o hranjivim tvarima iz nositelja. Imaju izrazito smanjen metabolizam lipida zbog nemogućnosti procesa beta-oksidacije (FIGUEROA-SANTIAGO i ANA, 2014.). Beta-oksidacija je katabolički proces koji razgrađuje masne kiseline u acetil-CoA i omogućuje proizvodnju energije. Dugolančane masne kiseline esencijalni su izvor energije za jetrene metilje (TIELENS, 1999.). Promjene u ekspresiji proteina povezanih s beta-oksidacijom i metaboličkim procesima lipida naglašava metaboličke poremećaje u jetri invadiranog jelena zbog prisutnosti parazita. Slični rezultati pronađeni su i u proteomskom profilu jetre jelena običnih invadiranih metiljima (ŠIMONJI i sur., 2022.). Sve navedene promjene sugeriraju na strukturne i funkcionalne promjene jetre tijekom invazije metiljem *F. magna* u jelena lopatara, što dovodi do promjena u proizvodnji stanične energije.

Genska ontologija za staničnu lokalizaciju pokazala je da najveći broj različito eksprimiranih proteina između invadirane i kontrolne skupine ima porijeklo iz citoplazme i mitohondrija. Većina tih proteina odnosi se na enzime uključene u energetske metabolizam organizma.

Analiza genske ontologije za molekularnu funkciju različito eksprimiranih proteina pokazala je da su najzastupljeniji proteini s katalitičkim djelovanjem i oksidoreduktaze. Oksidativni stres prepoznat je kao značajan klinički i biokemijski mehanizam patogeneze bolesti te prva linija imunosnog odgovora (BECKER i sur., 2004.). Nastaje zbog poremećene ravnoteže oksidacijsko-redukcijskih procesa uzrokovanog prekomjernom proizvodnjom slobodnih reaktivnih radikala kisika (ROS), smanjenja antioksidativne zaštite i/ili nemogućnosti popravka oksidativnog oštećenja (KELLY i sur., 1998.). Stvaranje slobodnih radikala, koji induciraju peroksidaciju lipida u organima, tkivima i stanicama, jedan je od mehanizama patogeneze parazitarne invazije. Prethodne studije su izvijestile o smanjenoj aktivnosti antioksidativnih enzima uslijed parazitskih invazija. Invazija metiljem *F. hepatica* rezultira smanjenjem antioksidativnih sposobnosti kod ljudi (KAYA i sur., 2007.) i štakora (KOLODZIEJCZYK i sur., 2005.; KOLODZIEJCZYK i sur., 2006.).

Kod štakora invadiranih metiljem *F. hepatica*, promjene antioksidativnih sposobnosti jetre uključuju smanjenje aktivnosti glavnih antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza, te smanjenje sadržaja neenzimskih antioksidansa (glutation, vitamini C, A i E), s izuzetkom katalaze koja je pokazala povećanu aktivnost (KOLODZIEJCZYK i sur., 2005.). Kod jelena običnog s fascioloidozom također su uočene promjene antioksidativnih enzima u jetri kao posljedica invazije (ŠIMONJI i sur., 2022.). Kod divljih svinja invadiranih metiljem *F. magna*, uočene su promijenjene ekspresije peroksiredoksina (PRDX2, PRDX3), te enzima glutation S-transferaza i glutation peroksidaza 1 (KULEŠ i sur., 2021.). Za razliku od navedenih istraživanja, u ovom istraživanju nisu zabilježene promjene u ekspresiji navedenih antioksidativnih enzima.

Među oksido-reduktazama s promijenjenom ekspresijom kod jelena lopatara invadiranih metiljem *F. magna* ističu se proteini koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika poput članova sustava citokroma P450 (CYP2C8T), flavin monooksigenaza (FMO3, PAH) i sličnih proteina (UDP-glukuronoziltransferaze). Osnovna uloga enzima citokroma P450 je metabolizam lijekova i ksenobiotika kojim se strani spojevi degradiraju ili izlučuju iz organizma, te biosinteza signalnih molekula poput steroidnih hormona i vitamina topivih u mastima koji sudjeluju u kontroli razvoja i održavanju homeostaze organizama (WILLIAMS i sur., 2000.). Ove monooksigenaze metaboliziraju široki raspon spojeva, od endogenih lipida do ksenobiotika. Flavin monooksigenaze (FMO) su, uz sustav citokroma P450, drugi važan sustav

mikrosomalnih enzima uključenih u proces metabolizma ne-nutritivnih stranih spojeva odnosno ksenobiotika (ESWARAMOORTHY i sur., 2006.).

Ekspresija enzima citokroma P450 (CYPs) uglavnom je bila smanjena u jetrenom tkivu tijekom odgovora nositelja na upalu ili invaziju i rezultirala otpuštanjem toksina, kao što je pokazano u fasciolози štakora (GALTIER i sur., 1985.; GALTIER i sur., 1991.; STAVROPOULOU i sur., 2018.). Enzimi koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika pokazali su značajne promjene kod jelena i divljih svinja koji su bili invadirani velikim američkim metiljem, te kod ovaca invadiranih metiljem *F. hepatica* (ALVAREZ ROJAS i sur., 2015; KULEŠ i sur., 2021; ŠIMONJI i sur., 2022.). U okviru programa suzbijanja bolesti životinja, bili su dostupni lijekoviti mamci s triklabendazolom, antiparazitskim lijekom. Međutim, uporaba triklabendazola u endemskim područjima fascioloidoze dovela je do razvijanja jetrenih metilja otpornih na ovaj spoj. Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja istaknula su ulogu sustava CYP450 u razvoju rezistencije na antiparazitske lijekove (DEVINE i sur., 2010., 2011., 2012.). Enzimski sustav flavin-monooksigenaza (FMO) pokazao se kao glavni metabolički put uključen u stvaranje otpornosti na triklabendazol (ALVAREZ i sur., 2005.). Naši rezultati podupiru hipotezu o sudjelovanju ovih proteina u razvoju otpornosti na lijekove, što sugerira potrebu za daljnjim istraživanjima.

Kao značajno obogaćeni biološki putevi u jetri jelena lopatara pokazali su se procesi vezani uz imunosni sustav i odgovor imunosnog sustava, kao što su stanični odgovori na stres, podražaje i toplinski stres, te degranulacija neutrofila.

Jetra pruža povoljno imunološko okruženje za parazite koji su razvili složene i višestruke mehanizme kako bi modulirali odgovor nositelja i suprotstavili se invaziji te popravili oštećenja tkiva (McNEILLY i NISBET, 2014.; DESLYPER i sur., 2019.). Utvrđeno je da helminti, unatoč svojoj veličini i lokalnoj te sistemske migraciji kroz tijelo nositelja, razvijaju različite mehanizme za izbjegavanje imunosnog odgovora nositelja kako bi osigurali svoj opstanak (ALLEN i MAIZELS, 2011.). Oštećenja nositelja nastaju ne samo mehaničkim i kemijskim djelovanjem, već i imunosnim odgovorom nositelja. Primjerice, invazija metiljem *F. hepatica* povezana je s snažnim Th2 odgovorom koji je općenito tipičan za mnoge helminte, dok je proinflamatorni Th1 odgovor potisnut (O'NEILL i sur., 2000.; VALERO i sur., 2017.). Th2 odgovor povezan je s proizvodnjom citokina (IL-4 i IL-13) koji doprinose protuupalnom učinku (DALTON i sur., 2013.). Ovaj imunosni obrazac sprječava ozbiljno oštećenje tkiva nositelja

(DALTON i sur., 2013.; HILL i sur., 2007.), dok osigurava dugovječnost parazita u svom nositelju (McSORLEY i sur., 2013.).

Naši rezultati podudaraju se s prethodnim nalazima o imunosnom odgovoru na parazitske bolesti. Značajno promijenjeni biološki putevi, poput staničnog odgovora na podražaje, staničnog odgovora na stres, staničnog odgovora na toplinski stres, te degranulacija neutrofila, potvrđuju da je imunosni odgovor izazvan invazijom metiljem *F. magna* povezan s urođenim imunosnim odgovorom.

Među proteinima s značajno različitom ekspresijom između ispitivanih skupina, nalazi se nekoliko članova proteina toplinskog šoka (HSPA9, HSP90AA1, HSP1B). Proteini toplinskog šoka (engl. *heat-shock proteins, HSPs*) ili proteini stresa, velika su obitelj evolucijski visoko očuvanih i imunogenih proteina s ključnim ulogama u preživljavanju i razvoju stanica (ABAZA, 2014.). Djeluju kao molekularni šaperoni i imaju ključnu ulogu u staničnom održavanju strukture proteina. Kontroliraju pravilno smatanje proteina, održavanje njihove trodimenzionalne konformacije, sastavljanje multiproteinskih kompleksa, transport proteina u ispravne subcelularne odjeljke pa sve do razgradnje nepravilno smotanih proteina koji mogu biti štetni za stanicu. Također, imaju ulogu u pojačavanju imunosnog odgovora nositelja, i predstavljaju dominantne antigene u mnogim bolestima (TSAN i GAO, 2009.). HSP70 i HSP90 posreduju između urođenog i stečenog imunosnog odgovora putem aktivacije limfocita i stanica koje predstavljaju antigen kao što su dendritične stanice (MCNULTY i sur., 2013.). Oni su snažni stimulatori urođenog imunosnog odgovora, omogućujući proizvodnju proupalnih citokina, aktivaciju kao i izlučivanje interferona (IFN)- γ (BRELOER i sur., 2001.).

Nekoliko članova obitelji HSP-a identificirano je s povećanom ekspresijom kod jelena običnog invadiranog metiljem *F. magna* (HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA9, HSPD1) u usporedbi s neinvadiranim jelenima, što ukazuje na imunosni odgovor nositelja i oštećenje tkiva zbog parazita (ŠIMONJI i sur., 2022.). S druge strane, kod divlje svinje, nositelja tipa slijepa ulica za *F. magna*, nađene su niže vrijednosti ovih proteina u usporedbi s kontrolama (KULEŠ i sur., 2021.). U našem istraživanju, smanjena ekspresija ovih proteina upućuje na supresiju Th1 imuniteta, čija je uloga orkestrirati zaštitne proupalne imunosne odgovore.

Veliki broj različito eksprimiranih proteina među ispitivanim skupinama pripadao je ribosomalnim proteinima (RPL4, RPS18, RPS14, RPS6), komponentama nukleosoma (histon

H2B), translacijskim enzimima (tirozin-tRNA ligaza), te podjedinicama proteasoma (UBE2V1), odnosno proteinima uključenima u sintezu i razgradnju proteina.

Sinteza proteina na ribosomima temeljni je biološki proces koji je usko povezan s rastom i proliferacijom stanica i smatra se jednim od procesa koji troše najviše energije u proliferirajućim stanicama sisavaca (MOSS, 2004.; THOMPSON i sur., 2013.; KANG i sur., 2021.). Pored sinteze proteina, mnogi ribosomalni proteini reguliraju apoptozu i stanični ciklus (BHAVSAR i sur., 2010.). Migracija juvenilnih stadija metilja *F. hepatica* unutar jetre povezana je s povećanom sintezom proteina, odnosno intenzivnom translacijskom aktivnošću (CWIKLINSKI i sur., 2021.).

Selektivna razgradnja proteina, koja se odvija kroz ubikvitin-proteasomski sustav (UPS), kritična je za većinu staničnih procesa, kao što su stanični ciklus, stanični odgovor na stres i izvanstanične efekte, modulaciju receptora stanične površine, ionskih kanala, i popravak DNA (SCHWARTZ i CIECHANOVER, 1999.; YEN i sur., 2008.). UPS također ima ključnu ulogu u povezivanju staničnog ciklusa s metaboličkim aktivnostima kroz kontrolu izmjene proteina (BENANTI, 2012.). Veliki broj značajno promijenjenih proteina povezanih s translacijskim procesima, kao i proteina vezanih uz proteasomski sustav nađen je i u jetri jelena običnog invadiranog parazitom *F. magna* (ŠIMONJI i sur., 2022.).

Navedeni rezultati upućuju da kontrola izmjene proteina služi kao mehanizam odgovora nositelja na promjene u okolišu uzrokovane invazijom *F. magna*.

Zbog sposobnosti metilja *F. magna* da izbjegne imunosne mehanizme, fascioloidoza se održava kao kronična invazija. Paralelno s kontinuiranom upalnom ozljedom, ekstracelularni matriks se nakuplja u jetrenom parenhimu, postupno zamjenjujući funkcionalno tkivo jetre što rezultira fibrozom (FAGONE i sur., 2015.). U ovom istraživanju identificirano je nekoliko proteina povezanih s fibrozom, preuređenjem citoskeleta i nakupljanjem ekstracelularnog matriksa, kao što su fibronektin (FN) i kolagen tipa VI (COL6A3).

Fibronektin je multifunkcionalni glikoprotein i komponenta ekstracelularnog matriksa koji se nalazi u staničnoj membrani i citoplazmi. Potreban je za *in vitro* i *in vivo* sastavljanje kolagenskog matriksa (KAWELKE i sur., 2011.). Pored toga, fibronektin je povezan s progresijom staničnog ciklusa, sudjeluje u adheziji i proliferaciji stanica te ima važnu ulogu u progresiji fibroze. Iako je kolagen glavna komponenta ekstracelularnog matriksa fibrotičnog

tkiva, prekomjerno nakupljanje fibronektina događa se prije nakupljanja kolagena. Promjene u jetrenom arhitektonskom sustavu nastaju zbog kombiniranog povećanja sinteze proteinskih komponenti citoskeleta i nesposobnosti razgradnje tih proteina, što rezultira fibrozom jetre. *In vivo* i *in vitro* istraživanja su pokazala da povećana ekspresija fibronektina dosljedno odražava stupanj fibroze jetre i stupanj nakupljanja ekstracelularnog matriksa, te je važan marker jetrene fibroze (LIU i sur., 2016.).

Slične promjene proteina povezanih s fibrozom jetre i nakupljanjem ekstracelularnog matriksa u jetrenom parenhimu pronađene su i kod jelena običnog invadiranog parazitom *F. magna* (ŠIMONJI i sur., 2022.). Stoga ovi rezultati upućuju na lokalni odgovor na migraciju metilja kroz jetru i kontinuirani proces remodeliranja ekstracelularnog matriksa kao odgovor na invaziju *F. magna*.

Razumijevanje mehanizama kroz koje nositelj reagira na jetrene metilje ključno je za praćenje bolesti, kao i za razvoj učinkovitih novih intervencija protiv istih. Ovo proteomsko istraživanje invazije metiljem *F. magna* kod jelena lopatara predstavlja vrijedan doprinos u razumijevanju patogeneze jetrene metiljavosti. Patogeneza fascioloidoze kod konačnih nositelja povezana je s oštećenjem jetre zbog prisutnosti pseudocista, kao i s imunosnim reakcijama nositelja na molekule izlučene od strane parazita. Naše istraživanje pokazalo je da je kronična invazija metiljem *F. magna* povezana s imunosnim odgovorom kod konačnog nositelja, oksidativnim stresom, fibrozom, translacijskom aktivnošću i promjenama u energetske metabolizmu u jetri. Identificirani proteini i povezani biološki putevi predstavljaju vrijedan doprinos razumijevanju interakcija nositelj-parazit i patogeneze fascioloidoze.

7. ZAKLJUČCI

Analiziranjem rezultata dobivenih u ovom istraživanju te njihovom usporedbom s drugim istraživanjima moguće je iznijeti sljedeće zaključke:

➤ Proteomskim pristupom temeljenim na obilježavanju TMT-om, te LC-MS/MS analizom identificirano je 520 proteina s pomoću najmanje dva jedinstvena peptida i uz 1% FDR u jetri jelena lopatara, a 50 proteina je pokazalo značajne razlike u ekspresiji između kontrolne skupine i skupine invadirane velikim američkim metiljem *Fascioloides magna*.

➤ Genska ontologija za biološki proces pokazala je da je najveći broj diferencijalnih proteina uključen u metaboličke procese, a rezultati analize genske ontologije za molekularnu funkciju različito eksprimiranih proteina pokazala je da su najzastupljeniji proteini s katalitičkim djelovanjem i oksidoreduktaze.

➤ Kao značajno obogaćeni biološki putevi u jetri jelena lopatara pokazali su se procesi vezani uz energetske metabolizam i odgovor imunološkog sustava.

Iz svega navedenog proizlazi da je istraživanje potvrdilo početne pretpostavke: u proteomskom profilu jetre između kontrolne skupine jelena lopatara i jelena invadiranih s *F. magna* postoje razlike te kod invadirane skupine prevladavaju proteini koji sudjeluju u energetske metabolizmu i oksidativnom stresu.

8. LITERATURA

ABAZA, S. (2014): Heat shock proteins and parasitic diseases: part 1: Helminths. *Parasitolog. United J.* 7, 93–103. DOI: 10.4103/1687-7942.149556

ALLEN, J. E., R.M. MAIZELS (2011): Diversity and dialogue in immunity to helminths, *Nat. Rev. Immunol.* 11, 375–388. DOI: 10.1038/nri2992

ALVAREZ, L. I., H. D. SOLANA, M. L. MOTTIER, G. L. VIRKEL, I. FAIRWEATHER, C. E. LANUSSE (2005): Altered drug influx/efflux and enhanced metabolic activity in triclabendazole-resistant liver flukes. *Parasitol.* 131, 501–510. DOI: 10.1017/S0031182005007997

ALVAREZ ROJAS, C. A., B. R. E. ANSELL, R. S. HALL, R. B. GASSER, N. D. YOUNG, A. R. JEX, J.-P. Y. SCHEERLINCK (2015): Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. *Parasites Vectors*, 8, 124. DOI: 10.1186/s13071-015-0715-7

ANONIMUS (2018): Zakon o lovstvu. Narodne novine br. 99/2018.

ASHBURNER, M., C. A. BALL, J. A. BLAKE, D. BOTSTEIN, H. BUTLER, J. M. CHERRY, A. P. DAVIS, K. DOLINSKI, S. S. DWIGHT, J. T. EPPIG, M. A. HARRIS, D. P. HILL, L. ISSEL-TARVER, A. KASARSKIS, S. LEWIS, J. C. MATESE, J. E. RICHARDSON, M. RINGWALD, G. M. RUBIN, G. SHERLOCK (2000): Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29. DOI: 10.1038/75556

BASSI, R. (1875): Sulla cachessia ittero-verminosa, o marciaia, causata dal *Distomum magnum*. *Medico Vet. Torino* 4, 497-515.

BAZSALOVICSOVÁ, E., I. KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, J. RADVÁNSZKY, R. BECK (2013): The origin of the giant liver fluke, *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae) from Croatia determined by high-res-olution melting screening of mitochondrial cox1 haplotypes. *Parasitol. Res.* 112, 2661-2666. DOI: 10.1007/s00436-013-3433-0

BECKER, K., K. L. TILLEY, J. L. VENNERSTROM, D. ROBERTS, S. ROGERSON, H. GINSBURG (2004): Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host–parasite interactions, *Int. J. Parasitol.* 34 , 163–189. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.09.011

BENANTI, J. A. (2012): Coordination of cell growth and division by the ubiquitin-proteasome system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 492–498. DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.04.005

BENNETT, A.P.S., M.W. ROBINSON (2021), Trematode Proteomics: Recent Advances and Future Directions, *Pathogens* (2021) 348. DOI: 10.3390/pathogens10030348

BHAVSAR, R. B., L. N. MAKLEY, P. A. TSONIS (2010): The other lives of ribosomal proteins. *Hum. Genom.* 4: 327. DOI: 10.1186/1479-7364-4-5-327

BILIĆ, PETRA, J. KULEŠ, A. GALAN, L. GOMES DE PONTES, N. GUILLEMIN, A. HORVATIĆ, A. F. SABES, V. MRLJAK, P. D. ECKERSALL (2018) Proteomics in Veterinary Medicine and Animal Science: Neglected Scientific Opportunities with Immediate Impact, *Proteomics* 2018: 1800047. DOI: 10.1002/pmic.201800047

BLAŽINA, D. (2004.): Jelen lopatar (*Dama dama*). U: Lovstvo (MUSTAPIĆ, Z., ur.), Hrvatski lovački savez, Zagreb, str. 57-60.

BODZON-KULAKOWSKA, A., BIERCZYNSKA-KRZYSIK, A., DYLAG, T., DRABIK, A., SUDER, P., NOGA, M., ET AL. (2007) Methods for Samples Preparation in Proteomic Research. *Journal of Chromatography B*, 849, 1-31. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.10.040

BOJOVIĆ, D., L. K. HALLS (1984): Central Europe. In: White-tailed deer ecology and management (Halls, L. K., ed). Stackpole Books, Harrisburg.

BRELOER, M., B. DORNER, S. H. MOR'E, T. RODERIAN, B. FLEISCHER, A. VON BONIN (2001): Heat shock proteins as “danger signals”: eukaryotic Hsp60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells, *Eur. J. Immunol.* 31, 2051–2059. DOI: 10.1002/1521-4141(200107)31:7<2051::AID-IMMU2051>3.0.CO;2-H

CANTACESSI, C., A. HOFMANN, N.D. YOUNG, U. BRODER, R.S. HALL, A. LOUKAS, R.B. GASSER (2012.): Insights into SCP/TAPS Proteins of Liver Flukes Based on Large-Scale Bioinformatic Analyses of Sequence Datasets. *PLOS ONE*, 7(2), e31164. DOI: 10.1371/journal.pone.0031164

CHEN, M. G., K. E. MOTT (1990): Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Trop. Dis. Bul.* 57, 1-38.

CONBOY, G. A., B. E. STROMBERG (1991): Hematology and clinical pathology of experimental *Fascioloides magna* infection in cattle and guinea pigs. *Vet. Parasitol.* 40, 241-255. DOI: 10.1016/0304-4017(91)90104-4

CHROUST, K. (1987): Současný stav a možnosti tlumení motolice obrovské (*Fascioloides magna*) u zvěře. *Veterinářství* 37, 514-515. (in Czech)

CUNNINGHAM, F., J. E. ALLEN, J. ALLEN, J. ALVAREZ-JARRETA, M. R. AMODE, I. M. ARMEAN, O. AUSTINE-ORIMOLOYE, A. G. AZOV, I. BARNES, R. BENNETT, A. BERRY, J. BHAI, A. BIGNELL, K. BILLIS, S. BODDU, L. BROOKS, M. CHARKHCHI, C. CUMMINS, L. DA RIN FIORETTO, C. DAVIDSON, K. DODIYA, S. DONALDSON, B. EL HOUDAIGUI, T. EL NABOULSI, R. FATIMA, C. GARCIA GIRON, T. GENEZ, J. GONZALEZ MARTINEZ, C. GUIJARRO-CLARKE, A. GYMER, M. HARDY, Z. HOLLIS, T. HOURLIER, T. HUNT, T. JUETTEMANN, V. KAIKALA, M. KAY, I. LAVIDAS, T. LE, D. LEMOS, J. CARLOS MARUGÁN, S. MOHANAN, A. MUSHTAQ, M. NAVEN, D. N. OGEH, A. PARKER, A. PARTON, M. PERRY, I. PILIŽOTA, I. PROSOVETSKAIA, M. PANDIAN SAKTHIVEL, A. IMRAN ABDUL SALAM, B. M. SCHMITT, H. SCHUILENBURG, D. SHEPPARD, J. G. PÉREZ-SILVA, W. STARK, E. STEED, K. SUTINEN, R. SUKUMARAN, D. SUMATHIPALA, M.-M. SUNER, M. SZPAK, A. THORMANN, F. FLORIANA TRICOMI, D. URBINA-GÓMEZ, A. VEIDENBERG, T. A. WALSH, B. WALTS, N. WILLHOFT, A. WINTERBOTTOM, E. WASS, M. CHAKIACHVILI, B. FLINT, A. FRANKISH, S. GIORGETTI, L. HAGGERTY, S. E. HUNT, G. R. IISLEY, J. E. LOVELAND, F. J. MARTIN, B. MOORE, J. M. MUDGE, M. MUFFATO, E. PERRY, M. RUFFIER, J. TATE, D. THYBERT, S. J. TREVANION, S. DYER, P. W. HARRISON, K. L. HOWE, A. D. YATES, D. R. ZERBINO, P. FLICEK (2022): Ensembl 2022. *Nucleic Acids, Res.* 50, D988–D995. DOI: 10.1093/nar/gkab1049

CWIKLINSKI K., M. W. ROBINSON, S. DONNELLY, J. P. DALTON (2021): Complementary transcriptomic and proteomic analyses reveal the cellular and molecular processes that drive growth and development of *Fasciola hepatica* in the host liver. *BMC Genomics* 22(1): 46. DOI: 10.1186/s12864-020-07326-y

DALTON, J. P., M. W. ROBINSON, G. MULCAHY, S. M. O'NEILL, S. DONNELLY (2013): Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: candidates for both vaccine and

immunotherapeutic development, Vet. Parasitol. 195, 272–285. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.04.008

DEMIASZKIEWICZ, A. W., I. KULIGOWSKA, A. M, PYZIEL, J. LACHOWICZ, R. KOWALCZYK (2015): Extension of occurrence area of the American fluke *Fascioloides magna* in south-western Poland. Ann. Parasitol. 61, 93-96.

DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, A. D. HYATT (2000): Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. Science 287, 443-449. DOI: 10.1126/science.287.5452.443

DESLYPER, G., D. G. DOHERTY, J. C. CAROLAN, C. V. HOLLAND (2019): The role of the liver in the migration of parasites of global significance. Parasites Vectors 12, 531. DOI: 10.1186/s13071-019-3791-2

DEVINE, C., G. P. BRENNAN, C. E. LANUSSE, L. I. ALVAREZ, A. TRUDGETT, E. HOEY, I. FAIRWEATHER (2010): Inhibition of cytochrome P450-mediated metabolism enhances ex vivo susceptibility of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. Parasitol. 137, 871–880. DOI: 10.1017/S003118200999148X

DEVINE, C., G. P. BRENNAN, C. E. LANUSSE, L. I. ALVAREZ, A. TRUDGETT, E. HOEY, I. FAIRWEATHER (2011): Inhibition of triclabendazole metabolism in vitro by ketoconazole increases disruption to the tegument of a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 109, 981–995. DOI: 10.1007/s00436-011-2304-9

DEVINE, C., G. P. BRENNAN, C. E. LANUSSE, L. I. ALVAREZ, A. TRUDGETT, E. HOEY, I. FAIRWEATHER (2012): Potentiation of triclabendazole action in vivo against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole. Vet. Parasitol. 184, 37–47. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.08.006

DONG, Z., S. HAINES, D. COATES (2020): Proteomic profiling of stem cell tissues during regeneration of deer antler - a model of mammalian organ regeneration. J. Proteome Res. 19, 1760-1775. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00026

ERHARDOVA, B. (1961): *Fascioloides magna* in Europe. Helminthologia 3, 91-106.

ERHARDOVA-KOTRLA, B. (1971): The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Czechoslovak Academy of Science, Prague, Czechoslovakia, 155 pp.

ESWARAMOORTHY, S., J. B. BONANNO, S. K. BURLEY, S. SWAMINATHAN (2006): Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 9832-9837. DOI: 10.1073/pnas.0602398103

FAGONE, P., K. MANGANO, S. MAMMANA, A. PESCE, A. PESCE, R. CALTABIANO, A. GIORLANDINO, T. R. PORTALE, E. CAVALLI, G. A. LOMBARDO, M. COCO, S. PULEO, F. NICOLETTI (2015): Identification of novel targets for the diagnosis and treatment of liver fibrosis. Int. J. Mol. Med. 36, 747-752. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2264

FIGUEROA-SANTIAGO, O., M. E. ANA (2014): *Fasciola hepatica* Fatty Acid Binding Protein Induces the Alternative Activation of Human Macrophages. Infect. Immun. 82, 5005–5012. DOI: 10.1128/IAI.02541-14

FLORIJAČIĆ, T. (2006): Epizootiološka istraživanja fascioloidoze običnog jelena (*Cervus elaphus*) u istočnoj Hrvatskoj. Doktorski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska

FOREYT, W. J. (1992): Experimental *Fascioloides magna* infections of mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). J. Wildl. Dis. 28, 183-187. DOI: 10.7589/0090-3558-28.2.183

FOREYT, W. J. (1996): Susceptibility of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) to experimentally- induced fascioloides magna infections. J. Wildl. Dis. 32, 556-559. DOI: 10.7589/0090-3558-32.3.556

FOREYT, W. J., A. C. TODD (1976): The development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. J. Parasitol. 62, 26-32. DOI: 10.2307/3279036

GALTIER, P., G. LARRIEU, P. LESCA (1985): Induction of drug metabolizing enzymes in the liver of rats infested with *Fasciola hepatica*. J. Pharm. Pharmacol. 37, 751–754. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1985.tb04960.x

GALTIER, P., Y. VANDENBERGHE, S. COECKE, C. EECKHOUTTE, G. LARRIEU, A. VERCROYSSSE (1991): Differential inhibition of rat hepatic glutathione S-transferase isoenzymes in the course of fascioliasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 255–260. DOI: 10.1016/0166-6851(91)90011-T

GILLESPIE, M., B. JASSAL, R. STEPHAN, M. MILACIC, K. ROTHFELS, A. SENFF-RIBEIRO, J. GRISS, C. SEVILLA, L. MATTHEWS, C. GONG, C. DENG, T. VARUSAI, E. RAGUENEAU, Y. HAIDER, B. MAY, V. SHAMOVSKY, J. WEISER, T. BRUNSON, N. SANATI, L. BECKMAN, X. SHAO, A. FABREGAT, K. SIDIROPOULOS, J. MURILLO, G. VITERI, J. COOK, S. SHORSER, G. BADER, E. DEMIR, C. SANDER, R. HAW, G. WU, L. STEIN, H. HERMJAKOB, P. D'EUSTACHIO (2022): The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucl. Acids Res.* 50 (D1), D687-D692. DOI: 10.1093/nar/gkab1028

GRAVES, P. R., T. A. J. HAYSTEAD (2002): Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 39-63. DOI: 10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002

HACARIZ, O., G. SAYERS, A.T. BAYKAL, (2012): A Proteomic Approach To Investigate the Distribution and Abundance of Surface and Internal *Fasciola hepatica* Proteins during the Chronic Stage of Natural Liver Fluke Infection in Cattle. *J. Proteome Res.* 11(7), pp.3592-3604. DOI: 10.1021/pr300015p

HE, F. (2005): Human liver proteome project. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 1841-1848. DOI: 10.1074/mcp.R500013-MCP200

HECK, M., B. A. NEELY (2020): Proteomics in Non-model Organisms: A New Analytical Frontier. *J. Proteome Res.* 19, 3595–3606. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00448

HILL, J. A., C. BENOIST, D. MATHIS (2007): Treg cells: guardians for life. *Nat. Immunol.* 8, 124–125. DOI: 10.1038/ni0207-124

HORVATIĆ, A., N. GUILLEMIN, H. KAABB, D. MCKEEGAN, E. O'REILLY, M. BAIN, J. KULEŠ, D. P. ECKERSALL (2019): Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin. *J. Proteomics* 192, 64-77. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.08.009

JANICKI, Z., D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2005): Monitoring and Treatment of *Fascioloides magna* in Semi-Farm Red Deer Husbandry in Croatia. Vet. Res. Commun. 29 (Suppl 2), 83–88. DOI: 10.1007/s11259-005-0027-z

JANICKI, Z., A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2007): Zoologija divljači. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 17-22.

JONES, A. (2005): Family Fasciolidae. In: Keys to the Trematoda: Volume 2 (Gibson D. I., A. Jones, R. A. Bray, eds.). CABI Publishing, New York. pp. 79-87. DOI: 10.1079/9780851995878.0079

KANG, J., N. BRAJANOVSKI, K. T. CHAN, J. XUAN, R. B. PEARSON, E. SANIJ (2021): Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. Sig. Transduct. Target. Ther. 6: 323. DOI: 10.1038/s41392-021-00728-8

KARAMON, J., M. LARSKA, A. JASIK, B. SELL (2015): First report of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in farmed fallow deer (*Dama dama*) in Poland-pathomorphological changes and molecular identification. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 59, 339 – 344. DOI: 10.1515/bvip-2015-0050

KAWELKE, N., M. VASEL, C. SENS, A. VON AU, S. DOOLEY (2011): Fibronectin Protects from Excessive Liver Fibrosis by Modulating the Availability of and Responsiveness of Stellate Cells to Active TGF- β . PLOS ONE 6(11): e28181. DOI: 10.1371/journal.pone.0028181

KAYA, S., R. SÜTÇÜ, E. S. CETIN, B. C. ARIDOGAN, N. DELIBAS, M. DEMIRCI (2007): Lipid peroxidation level and antioxidant enzyme activities in the blood of patients with acute and chronic fascioliasis, Int. J. Infect. Dis. 11, 251–255. DOI: 10.1016/j.ijid.2006.05.003

KELLY, S. A., C. M. HAVRILLA, T. C. BRADY, K. H. ABRAMO, E. D. LEVIN (1998): Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. Envir. Health Persp. 106, 375-384. DOI: 10.1289/ehp.98106375

KOŁODZIEJCZYK, L., E. SIEMIENIUK, E. SKRZYDLEWSKA (2005): Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. Parasitol. Res. 96, 367–372. DOI: 10.1007/s00436-005-1377-8

KOŁODZIEJCZYK, L., E. SIEMIENIUK, E. SKRZYDLEWSKA (2006): *Fasciola hepatica*: effects on the antioxidative properties and lipid peroxidation of rat serum. Exp. Parasitol. 113, 43–48. DOI: 10.1016/j.exppara.2005.12.005

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, V. ERMAN, A. GUDAN KURILJ, T. ŽIVIČNJAK, K. SEVERIN, S. TOMIĆ, F. MARTINKOVIĆ (2017): New data on wild boar (*Sus scrofa* L.) a dead-end host for large American liver fluke (*Fascioloides magna*). Helminthologia 54, 77-80. DOI: 10.1515/helm-2017-0006

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, A. BECK, R. BECK, F. MARTINKOVIĆ, Z. JANICKI (2021): First record of chronic *Fascioloides magna* infection in roe deer (*Capreolus capreolus*). Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl. 15, 173-176. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2021.05.006

KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., E. BAZSALOVICSOVÁ, J. ŠTEFKA, M. ŠPAKULOVÁ, S. VÁVROVÁ, T. SZEMES, V. TKACH, A., TRUDGETT, M. PYBUS (2011): Multiple origins of European populations of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), a liver parasite of ruminants. Int. J. Parasitol. 41, 373–383. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.10.010

KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., L. JUHÁSOVÁ, E. BAZSALOVICSOVÁ (2016): The giant liver fluke, *Fascioloides magna*: Past, present and future research. Springer, Cham, Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-29508-4

KULEŠ, J., L. LOVRIĆ, A. GELEMANOVIĆ, B. BEER LJUBIĆ, I. RUBIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2021): Complementary liver and serum protein profile in wild boars infected by the giant liver fluke *Fascioloides magna* using tandem mass tags quantitative approach. J. Proteomics 247, 104332. DOI: 10.1016/j.jprot.2021.104332

LENTON, L. M. C. A. BEHM, F. L. BYGRAVE (1995): Aberrant mitochondrial respiration in the livers of rats infected with *Fasciola hepatica*: the role of elevated non-esterified fatty acids and altered phospholipid composition, Biochem. J. 307, 425–431. DOI: 10.1042/bj3070425

LIU, X. Y., R. X. LIU, F. HOU, L. J. CUI, C. Y. LI, C. CHI, E. YI, Y. WEN, C. H. YIN (2016): Fibronectin expression is critical for liver fibrogenesis in vivo and in vitro. Mol. Med. Rep. 14, 3669-3675. DOI: 10.3892/mmr.2016.5673

LÓPEZ-PEDROUSO, M., F. DANIEL, M. P. SERRANO, A. MAGGIOLINO, T. LANDETE-ASTILLEJOS, P. DE PALO, J. M. LORENZO (2019): A proteomic-based approach for the search of biomarkers in Iberian wild deer (*Cervus elaphus*) as indicators of meat quality. J. Proteomics 205, 103422. DOI: 10.1016/j.jprot.2019.103422

MARINCULIĆ, A., N. DŽAKULA, Z. JANICKI, Z. HARDY, S. LUČINGER, T. ŽIVIČNJAK (2002): Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia - a case report. Vet. arhiv 72, 319-325.

MARINKOVIĆ, D., V. KUKOLJ, S. ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, M. JOVANOVIĆ, M. KNEŽEVIĆ (2013): The role of hepatic myofibroblasts in liver cirrhosis in fallow deer (*Dama dama*) naturally infected with giant liver fluke (*Fascioloides magna*). BMC Vet. Res. 9, 45. DOI: 10.1186/1746-6148-9-45

McCALLUM, H., A. DOBSON (1995): Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. Trends Ecol. Evol. 10, 190-194. DOI: 10.1016/S0169-5347(00)89050-3

McMANUS, D.P. (2020): Recent progress in the development of liver fluke and blood fluke vaccines. Vaccines, 1-15. DOI: 10.3390/vaccines8030553

McNEILLY, T. N., A. J. NISBET (2014): Immune modulation by helminth parasites of ruminants: implications for vaccine development and host immune competence, Parasite 21: 51. DOI: 10.1051/parasite/2014051

McNULTY, S., C. A. COLACO, L. E. BLANDFORD, C. R. BAILEY, S. BASCHIERI, S. TODRYK (2013): Heat-shock proteins as dendritic cell-targeting vaccines—getting warmer. Immunol. 139, 407–415. DOI: 10.1111/imm.12104

McSORLEY, H. J., J. P. HEWITSON, R. M. MAIZELS (2013): Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators, Int. J. Parasitol. 43, 301–310. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.11.011

MENDE, D. R., I. LETUNIC, O. M. MAISTRENKO, T. S. B. SCHMIDT, A. MILANESE, L. PAOLI, A. HERNÁNDEZ-PLAZA, A. N. ORAKOV, S. K. FORSLUND, S. SUNAGAWA, G. ZELLER, J. HUERTA-CEPAS, L. PEDRO COELHO, P. BORK (2020): proGenomes2: an improved database for accurate and consistent habitat, taxonomic and functional annotations of prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 48, D621–D625. DOI: 10.1093/nar/gkz1002

MOLINA-HERNANDEZ, V., G. MULCAHY, J. PEREZ, A. MARTÍNEZ-MORENO, S. DONNELLY, S. M. O'NEILL, J.P. DALTON, K. CWIKLINSKI (2015): *Fasciola hepatica* vaccine: We may not be there yet but we're on the right road. *Vet. Parasitol.* 208, 101-111. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.01.004

MOSS, T. (2004): At the crossroads of growth control: making ribosomal RNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 210–217. DOI: 10.1016/j.gde.2004.02.005

MULVEY, M., J. M. AHO, C. LYDEARD, P. L. LEBERG, M. H. SMITH (1991): Comparative population genetic structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. *Evolution* 45, 1628-1640. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1991.tb02668.x

NDAO, M. (2009) Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. DOI: 10.1155/2009/278246

O'FARRELL, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)41496-8

O'NEILL, S. M., M. T. BRADY, J. J. CALLANAN, G. MULCAHY, P. JOYCE, K. H. MILLS, J. P. DALTON (2000): *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice, *Parasite Immunol.* 22, 147–155. DOI: 10.1046/j.1365-3024.2000.00290.x

PANDEY, A., M. MANN (2000): Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846. DOI: 10.1038/35015709

PARK, H. J., L. DO HEE, S. G. PARK, S. C. LEE, S. CHO, H. K. KIM, J. J. KIM, H. BAE, B. C. PARK (2004): Proteome analysis of red deer antlers. *Proteomics* 4, 3642-3653. DOI: 10.1002/pmic.200401027

PYBUS, M. J. (2001): Liver flukes. In: Parasitic diseases of wild mammals (Samuel W. M., Pybus M. J., Kocan A. A., eds.):. Manson Publishing/The Veterinary Press, Iowa State University Press, p. 121. DOI: 10.1002/9780470377000.ch6

R CORE TEAM (2020): A Language and Environment for Statistical Computing 2020. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

ROBINSON, M.W., R. MENON, S. M. DONNELLY, J. P. DALTON, S. RANGANATHAN, (2009): An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics*, 907-1891. DOI: 10.1074/mcp.M900045-MCP200

RULE, C. J., C. A. BEHM, F. L. BYGRAVE (1989): Aberrant energy-linked reactions in mitochondria isolated from the livers of rats infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Biochem. J.* 260, 517–523. DOI: 10.1042/bj2600517

RUXTON, G. D., N. COLEGRAVE (2016): Dizajniranje istraživanja u biomedicinskim znanostima. 1. hrvatsko izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska, str. 60-73.

SCHWARTZ, A. L., A. CIECHANOVER (1999): The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57–74. DOI: 10.1146/annurev.med.50.1.57

SCHWARTZ, W. L., D. B. LAWHORN, E. MONTGOMERY (1993): *Fascioloides magna* in a feral pig. *J. Swine Health Prod.* 1, 27.

SEVERIN, K., F. MARTINKOVIĆ, D. KONJEVIĆ, A. MARINCULIĆ, Z. JANICKI, T. MAŠEK, P. DŽAJA (2015a): Evaluation of different diagnostic techniques for the diagnosis of fascioloidosis in red deer. In: Proceedings off the 6th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine (Pendovski, L., ed.). Struga, Macedonia, p. 59.

SEVERIN, K., F. MARTINKOVIĆ, Z. JANICKI, A. MARINCULIĆ, A. SLAVICA, D. ŽELE, G. VENGUŠT, P. DŽAJA, Z. VIDIĆ, D. KONJEVIĆ (2015b): Indirect ELISA and Western blotting as tools to diagnose fascioloidosis in a population of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. arhiv* 85, 563-576. [VA85\(5\)-08-Severi.indd \(unizg.hr\)](#)

SILVANE, L., D.P. CELIAS, P.A. ROMAGNOLI, B.A. MALETTO, M.F. SANCHEZ VALLECILLO, L. S. CHIAPELLO, S.D. PALMA, D.A. ALLEMANDI, R.E.F. SANABRIA, C.I. PRUZZO, C. C. MOTR'AN, L. CERVI (2020): A Vaccine Based on Kunitz-Type Molecule Confers Protection Against *Fasciola hepatica* Challenge by Inducing IFN- γ and Antibody Immune Responses Through IL-17A Production. *Front. Immunol.* 11, 2087. DOI: 10.3389/fimmu.2020.02087

SLUSARSKI, W. (1955): Studia nad europejskim przedstawicielami przywry *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) I. Ponowne wykrycie inwazji u jeleni na Slacsku. *Acta Parasitol. Pol.* 3, 1-59.

STAVROPOULOU, E., G.G. PIRCALABIORU, E. BEZIRTZOGLU, The Role of Cytochromes P450 in Infection, *Front. Immunol.* 9 (89) (2018). DOI: 10.3389/fimmu.2018.00089

STILES, C., M. BUJANIĆ, F. MARTINKOVIĆ, I.-C. ŠOŠTARIĆ ZUCKERMANN, D. KONJEVIĆ (2021). Severe pulmonary fascioloidosis in a wild mouflon (*Ovis musimon*)-a case report. *Helminthologia* 58, 394–399. DOI: 10.2478/helm-2021-0036

STILES, C. W., A. HASSAL (1895): The anatomy of the large American liver fluke (*Fasciola magna*) and a comparison with other species of the genus *Fasciola*. *J. Comp. Med. Vet. Arch.* 16, 139–147.

SZKLARCZYK, D, R. KIRSCH, M. KOUTROULI, K. NASTOU, F. MEHRYARY, R. HACHILIF, G.L. ANNIKA, T. FANG, N.T. DONCHEVA, S. PYYSALO, P. BORK, L.J. JENSEN, C. VON MERING (2023): The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 51(D1), D638-D646. DOI: 10.1093/nar/gkac1000

SWALES, W. E. (1935): The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) the large liver fluke of ruminants in Canada. *Can. J. Res.* 12, 177-215. DOI: 10.1139/cjr35-015

ŠIMONJI, K., D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, I. RUBIĆ, V. FARKAŠ, A. BELETIĆ, L. GRBAVAC, J. KULEŠ (2022): Liver Proteome Alterations in Red Deer (*Cervus elaphus*) Infected by the Giant Liver Fluke *Fascioloides magna*. *Pathogens*, 11(12): 1503. DOI: 10.3390/pathogens11121503.

ŠPAKULOVÁ, M., D. RAJSKÝ, J. SOKOL, M. VODŇANSKÝ (2003.): Cicavica obrovská (*Fascioloides magna*). Významný pečňový parazit prežúvavcov. PaRPRESS, Bratislava (in Slovakian).

THE UNIPROT CONSORTIUM (2020): UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucl. Acids Res. 49 (D1), D480-D489.

THE UNIPROT CONSORTIUM (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucleic Acids Res. 49, D480–D489. DOI: 10.1093/nar/gkaa1100

THOMPSON, R. C. A., S. J. KUTZ, A. SMITH (2009): Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. Int. J. Environ. Res. Public Health 6, 678-693. DOI: 10.3390/ijerph6020678

TIELENS, A., J. DALTON (1999); Metabolism in Fasciolosis; CABI Publishing: Wallingford, UK, pp. 277–305.

TSAN, M. F., B. GAO (2009): Heat shock proteins and immune system, J. Leukoc. Biol. 85, 905–910. DOI: 10.1189/jlb.0109005

ULLRICH, K. (1930): Über das Vorkommen von seltenen oder wenig bekannten Parasiten der Säugetiere und Vögel in Böhmen und Mähren. Prag. Arch. Tiermed. 10, 19-43.

VALERO, M. A., I. PEREZ-CRESPO, C. CHILLÓN-MARINAS, M. KHOUBBANE, C. QUESADA, M. REGUERA-GOMEZ, S. MAS-COMA, M. FRESNO, N. GIRONES (2017): *Fasciola hepatica* reinfection potentiates a mixed Th1/Th2/Th17/Treg response and correlates with the clinical phenotypes of anemia. PLoS One 12 (3): e0173456. DOI: 10.1371/journal.pone.0173456

WASINGER, V.C., S.J. CORDWELL, A. CERPA-POLJAK, J.X. YAN, A.A. GOOLEY, M.R.WILKINS, M.W. DUNCAN, R. HARRIS, K.L. WILLIAMS, I. HUMPHERY-SMITH (1995): Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis 16: 1090–1094. DOI: 10.1002/elps.11501601185

WICKHAM, H. (2016): ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer, New York, USA. DOI: 10.1007/978-3-319-24277-4_9

WILLIAMS, P. A., J. COSME, V. SRIDHAR, E. F. JOHNSON, D. E. MCREE (2000): Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell.* 5, 121-131. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80408-6

WINKELMAYER, R., H. PROSL (2001): Riesenleberegel—jetzt auch bei uns? *Österreichisches Weidwerk* 3, 42–44. (in German)

WISNIEWSKI, J. R., A. ZOUGMAN, N. NAGARAJ, M. MANN (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 6, 359. DOI: 10.1038/nmeth.1322

YATES, J. R., C. I. RUSE, A. NAKORCHEVSKY (2009): Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11:49-79. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-061008-124934

YEN, H. C., Q. XU, D. M. CHOU, Z. ZHAO, S. J. ELLEDGE (2008): Global protein stability profiling in mammalian cells. *Science* 322, 918–923. DOI: 10.1126/science.1160489

ZHANG, F. K., R. S. HU, H. M. ELSHEIKHA, Z. A. SHENG, W. Y. ZHANG, W. B. ZHENG, X. Q. ZHU, J. J. HE (2019): Global serum proteomic changes in water buffaloes infected with *Fasciola gigantica*. *Parasit. Vectors* 12: 281. DOI: 10.1186/s13071-019-3533-5

9. ŽIVOTOPIS

Siniša Mandek, rođen je 1975. u Zagrebu. Diplomirao je 2001. godine na Sveučilištu u Zagrebu na Veterinarskom fakultetu i stekao je zvanje doktora veterinarske medicine. Šest godina radio je kao veterinar u Veterinarskoj stanici Remetinec d.o.o., a od toga i tri godine kao ovlašteni veterinar. Od 2007. godine radi u Ministarstvu poljoprivrede, gdje je prošao cijeli karijerni razvoj državnog službenika od suradnika do danas načelnika sektora. Veći dio proveo je u Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane, a manji dio i u Upravi ribarstva. Radno i stručno iskustvo stjecao je radom u državnoj službi na politici i u poslovima razvojne strategije za veterinarski sektor s posebnim naglaskom na organizaciju veterinarske djelatnosti, identifikaciju i registraciju (I&R) životinja te veterinarski informacijski sustav. Radio je na području veterinarske inspekcije kao viši državni inspektor za dobrobit životinja, u Upravi ribarstva u području EU fondova i državnih potpora u ribarstvu. Tijekom karijere stalno je obučavan u različitim programima EC, u području politike i kontrole zdravlja životinja, identifikacije i registracije životinja, dobrobiti životinja te potpora. Od samih početaka rada u državnoj službi aktivno radi na razvoju veterinarskih informacijskih sustava. Sudjelovao je u ispunjavanju predpristupnih uvjeta u procesu pristupanja Republike Hrvatske u Europsku uniju te sudjelovao u izradi mnogih propisa iz područja veterinarstva i sigurnosti hrane, a vezanih uz nacionalno i zakonodavstvo EU.

Od 2002. godine je i član je Hrvatske veterinarske komore.

Objavio je sljedeće znanstvene i stručne radove:

1. MANDEK, SINIŠA; BUJANIĆ, MILJENKO; KULEŠ, JOSIPA; MARTINKOVIĆ, FRANJO; SINDIČIĆ, MAGDA; KONJEVIĆ, DEAN, Primjena proteomike u istraživanju invazijskih bolesti divljih životinja // Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora, 29 (2021), 52-58 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni).

2. HENGL, BRIGITA; ZDOLEC, NEVIJO; JURAS, MIRELA; MANDEK, SINIŠA; KIŠ, TOMISLAV. KOZAČINSKI, LIDIJA, Legislative framework for meat inspection system in Croatia // 2nd RIBMINS Scientific Conference „Towards the Future of Meat Safety Assurance“: Book of abstracts / Antunović, Boris ; Carrasco Jiménez, Elena ; Guldemann, Claudia ; Johler, Sophia ; Sperner, Brigitte ; Blagojević, Bojan (ur.). Cordoba, 2022. str. 36-36 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

3. ERMAN, VLATKA; BUJANIĆ, MILJENKO; ŠKVORC, NIKOLINA; MANDEK, SINIŠA; KONJEVIĆ, DEAN, Značajke invazije divljih svinja (*Sus scrofa* L.) metiljem *Fascioloides magna* // Zbornik radova Veterinarski dani 2022 / Severin, Krešimir (ur.). Poreč: Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu, Hrvatski veterinarski institut, 2022. str. 81-84 (predavanje, recenziran, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni).

4. MANDEK, SINIŠA; PAŠALIĆ, VALERIJA; Premještanje kopnenih životinja, analiza postojećeg stanja i promjene u odnosu na Zakon o zdravlju životinja // Veterinarski dani 2023, Osijek, Hrvatska veterinarska Komora (predavanje, prezentacija).

5. MALTAR, LJUPKA; MANDEK, SINIŠA; LOHMAN JANKOVIĆ, IVANA; ACINGER-ROGIĆ, ŽAKLIN; MIŠKIĆ, TIHANA; Zakon o zdravlju životinja – uloga veterinarske struke u strategiji zdravlja životinja, Veterinarski dani 2022, Poreč, Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu, Hrvatski veterinarski institut, (predavanje, prezentacija).

6. MANDEK, SINIŠA; FILIPEC, DUBRAVKA; Putovnica za kućne ljubimce // Zbornik radova Veterinarski dani 2015 / Harapin, Ivica (ur.). Opatija: Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu, Hrvatski veterinarski institut, 2015. str. 37-42 (predavanje, recenziran, stručni).

7. MANDEK, SINIŠA; Kontrolna tijela // Zbornik radova Veterinarski dani 2013, / Harapin, Ivica (ur.). Opatija: Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet u Zagrebu, Hrvatski veterinarski institut, 2013. str. 21-33 (predavanje, recenziran).

8. MANDEK, SINIŠA; Provedba mjera deratizacije na gospodarstvima koja drže svinje u Republici Hrvatskoj // Zbornik radova DDD i ZUPP Novi izazovi, / Korunić, Javorka (ur.). Split: Hrvatska udruga za dezinfekciju, dezinskciju i deratizaciju, Korunić d.o.o., 2013. str. 251-256 (predavanje, recenziran).