



Sveučilište u Zagrebu  
Veterinarski fakultet

Filip Kajin

**Istraživanje bioloških biljega bolesti donjih  
dišnih puteva pasa u uzorcima  
bronhoalveolarnog ispirka, sline i seruma**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Veterinary Faculty

Filip Kajin

**BIOMARKER ANALYSIS OF  
BRONCHOALVEOLAR LAVAGE SAMPLES,  
SALIVA AND SERUM IN DOGS WITH  
LOWER AIRWAY DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu  
Veterinarski fakultet

Filip Kajin

**Istraživanje bioloških biljega bolesti donjih  
dišnih puteva pasa u uzorcima  
bronhoalveolarnog ispirka, sline i seruma**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Iva Šmit, dr. med. vet

izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović, dr. med. vet.

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Veterinary Faculty

Filip Kajin

**BIOMARKER ANALYSIS OF  
BRONCHOALVEOLAR LAVAGE SAMPLES,  
SALIVA AND SERUM IN DOGS WITH  
LOWER AIRWAY DISEASE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Assoc. Prof. Iva Šmit PhD

Assoc. Prof. Vladimir Stevanović PhD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

## IZJAVA

Ja, Filip Kajin, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristilo drugim izvorima do onih navedenih u radu.

---

(potpis studenta)

Zagreb, 2024.

## ZAHVALE

*Prvenstveno se zahvaljujem mojim mentorima Ivi i Vladi na inspiraciji, savjetima, (moralnoj) pomoći, strpljenju i “guranju”; bez vas ovo istraživanje nikako ne bi bilo moguće. Hvala vam što ste me vodili kroz ovaj labirint riječi.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Klinike za unutarnje bolesti i Laboratorija koji su moralno pomagali i bili podrška u raznim fazama izrade doktorata, te na razumijevanju prilikom pisanja. Vaša mi je podrška omogućila nesmetano istraživanje i pisanje i bez vas ne bi bilo ovog rada.*

*Veliko hvala prof. Mrljaku i djelatnicima Laboratorija za proteomiku, Josipi, Dini i Ivani, na ogromnoj pomoći, dijeljenju znanja, dobroj volji i angažmanu koji su bili nužni za ovaj doktorat.*

*Zahvaljujem se djelatnicima Virusološkog laboratorija na pomoći prilikom obrade uzoraka i podataka, kao i profesoricama Habuš, Hadžini i Štritof na podijeljenom znanju i savjetima.*

*Hvala Željani na lekturi teksta, kao i na zanimljivim diskusijama o gramatici i pravopisu hrvatskog jezika.*

*Ani, Relji i Holgeru, mojim “bivšim” mentorima, čije me vodstvo u svijetu veterine oblikovalo i pružilo mi okvire, koji su mi i dalje uzor ne samo zbog znanja koje nesebično dijele, već i zbog ljudskosti, prizemljenosti i osobnog integriteta, kombinacije na koju se rijetko nailazi.*

*Hvala mojim roditeljima i bratu (i ostatku šire obitelji), što me već dugi niz godina strpljivo prate i pružaju podršku kroz mirne i nemirne vode, (strpljivo) slušaju sva moja lamentiranja i pružaju mi potporu u praćenju mojih snova.*

*Hvala i mojim prijateljima, koji su vjerovali u mene i kada ja nisam, i koji su vjerno pratili moje uspone i padove.*

*Posljednje, ali najvažnije zahvale:*

*Mojoj supruzi Ines, na najljepšoj ljubavnoj priči, bezgraničnoj podršci, podmetanju leđa. Hvala ti što si hodala sa mnom kroz ovo iskustvo od samoga početka, bez tebe ne bih bio ovdje.*

*Mojim sinovima, Lucasu i Nikolaju, koji me inspiriraju i pune moje srce veseljem svaki dan. Nadam se da će ono što radim poslužiti i vama kao inspiracija da uvijek pratite vaše snove.*

## SAŽETAK

Bolesti donjih dišnih puteva česte su u pasa, s varirajućim kliničkim znakovima, od blagog kroničnog kašlja pa sve do otežanog disanja i kolapsa. Bolesti donjih dišnih puteva obuhvaćaju upalne (sterilne ili zarazne), tumorske te neupalne i neneoplastične bolesti koje zahvaćaju strukture dušnika, bronha, bronhiola, alveola, plućnog intersticija i vaskulature pluća.

S obzirom na to da je dijagnostika navedenih bolesti često komplicirana, dugotrajna i invazivna, a pretragom dostupne literature uočava se nedostatak manje invazivnih dijagnostičkih metoda, poput bioloških biljega koji bi se mogli dokazati u lakše dostupnim uzorcima poput sline ili seruma, cilj ovog istraživanja bio je otkriti kliničke, laboratorijske i molekularne biološke biljege te provesti proteomsku analizu bronhoalveolarnih ispiraka, seruma i sline pasa oboljelih od bolesti donjih dišnih puteva, sa svrhom otkrivanja proteina koji bi mogli poslužiti kao biomarkeri u budućim istraživanjima.

Rezultati rada pokazali su da su upalne bolesti bile najzastupljenije u našoj populaciji pasa, da su uzročnici koji se povezuju sa zaraznim kašljem pasa rijetko izolirani molekularnom metodom iz uzoraka bronhoalveolarnih ispiraka, da je suhi kašalj bio značajno prisutniji u skupini pas sa upalnim bolestima, dok je vrijednost hematokrita bila značajno niža, a koncentracija C-reakativnog proteina značajno viša u skupini s neoplastičnim bolestima u odnosu na ostale skupine. Proteomskom analizom analizirano je 36 uzoraka seruma, 37 uzoraka bronhoalveolarnih ispiraka te 22 uzorka sline pasa s bolešću donjih dišnih puteva i kontrolne skupine bez bolesti donjih dišnih puteva, te je utvrđeno 28 proteina čija se zastupljenost statistički značajno razlikovala među skupinama. Većina navedenih proteina usko je povezana s imunskim sustavom i sustavom zgrušavanja, koji su međusobno isprepleteni sa svrhom obrane organizma. Analiza proteoma daje uvid u brojne važne funkcije organizma i otkriva potencijalne biološke biljege bolesti.

**Ključne riječi:** pas, proteomika, dišni sustav, biomarkeri, bioinformatika, PCR, zarazni kašalj



## **EXTENDED ABSTRACT**

### **INTRODUCTION**

Lower airway disease is common in dogs, and includes a plethora of sterile and infectious inflammatory, neoplastic and degenerative disease of the trachea, bronchi, bronchioles, alveoli, pulmonary interstitium and lung vasculature. Depending on the severity of the disease, they can manifest variably; from a mild, barely noticeable cough to reduced activity tolerance, rapid and difficult breathing, weakness and collapse due to disturbances in blood oxygenation. Therefore, the goal of evaluating a dog with signs of respiratory tract disease is to arrive at a specific diagnosis, using the least invasive means as possible.

The clinical approach to a dog with suspected lower respiratory tract disease often presents a diagnostic challenge and requires the application of numerous diagnostic procedures such as: imaging diagnostics, parasitological, microbiological and cytological examinations of samples obtained by bronchoalveolar lavage, bronchoscopy, transthoracic lung puncture, lung tissue biopsy. These are, in the long run, financially demanding and invasive. Some, such as bronchoscopy and bronchoalveolar lavage, computed tomography, require sedation or general anesthesia, which is difficult to perform in certain patients for medical or material reasons, which necessitates the discovery of novel less invasive and speedier biomarkers.

A biomarker is a characteristic objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention. A significant subset of the molecules used as biological markers are proteins, and, because the expression of proteins depends on the state and environment in which the cell is located pathological conditions lead to different protein expression, making the proteome of a given cell or organism dynamic. Currently, there is no established biomarker that can be used with high sensitivity and specificity to prove a certain disease of the lower respiratory tract, while at the same time excluding other diseases, causing numerous workgroups trying to discover a potential biomarker. Surfactant A, C-reactive protein, MUC5AC-like messenger ribonucleic acid, the chemokines CCL2 and CXCL8, transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) have all been researched in serum or bronchoalveolar

lavage fluid of dogs with lower respiratory disease, none providing adequate diagnostic yield in the clinical setting.

Proteomics, as a study of proteins, enables a comprehensive analysis of the whole proteome of a cell or tissue, leading to improved disease diagnosis, novel drug discovery, and therapeutic interventions, all aimed at enhancing animal and human health alike. In this context, proteomics emerges as a critical new technology, focusing on detailed examinations of protein composition, abundance, structure, function, and interactions. Novel biomarkers are being discovered using this method as of recent, providing an advancement in the field of minimally invasive diagnostics.

## HYPOTHESIS AND AIMS OF THE RESEARCH

The review of current knowledge did not identify any potential biological markers used for the diagnosis or monitoring of neoplastic diseases of the lower respiratory tract, and the diagnostic process is also complicated due to the common isolation of pathogens associated with the canine infectious respiratory disease complex (CIRDC) from dogs with lower respiratory tract disease, some of which have still equivocal significance in other inflammatory or even neoplastic disease.

Therefore, the objectives of this research are to determine the presence and clinical manifestations of lower respiratory tract disease of dogs in our clinical setting, to determine the presence of pathogens associated with CIRDC and to apply proteomics as a means of identifying possible biomarkers of inflammatory, neoplastic and noninflammatory/nonneoplastic disease under the hypothesis that protein expression will differ between the groups, making identification of novel biomarker-candidates possible.

## MATERIAL AND METHODS

Clinical data, examination and laboratory findings, as well as aliquoted serum, saliva and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples were retrospectively collected from dogs that underwent routine diagnostics due to respiratory clinical signs.

Data from the patient's history, clinical examination, laboratory findings, parasitological examination, diagnostic imaging, bronchoscopy as well as cytological and microbiological examination of the bronchoalveolar lavage samples were collected for statistical analysis. Patients were grouped into four categories, based on the final diagnosis that was reached. The groups were: inflammatory disease, neoplastic disease and non-inflammatory/non-neoplastic disease. A control group of dogs that underwent diagnostic procedures for respiratory tract disease, but a diagnosis of lower respiratory tract disease was excluded, formed the control group for this research.

Samples of serum, saliva and bronchoalveolar lavage fluid stored at -80°C were retrieved for analysis which included molecular PCR analysis and proteomic analysis of the samples. PCR for detection of pathogens associated with CIRDC was conducted on BALF and included: canine adenovirus 2, canine distemper virus, canine influenza viruses, canine herpesvirus 1, canine parainfluenza virus, canine respiratory coronavirus, *Bordetella bronchiseptica* (Bb), *Mycoplasma* spp. and *Mycoplasma cynos*. Proteomic analysis of serum, saliva and BALF was conducted applying a semi-quantitative proteomic approach using isobaric tags that allow multiplexing - simultaneous analysis of six samples according to the previously described protocol using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Statistical and bioinformatic analyses were performed on the proteomics data.

## RESULTS

Thirty-seven (37) dogs were included in the study after applying the exclusion criteria. Aliquoted serum samples (N=36), bronchoalveolar fluid samples (N=37) and saliva samples (N=22) from these dogs were retrieved for further proteomic analysis, and the bronchoalveolar fluid samples for molecular analysis as well.

Based on the final diagnosis, four different groups were distinguished for further proteomic and statistical analysis: “inflammatory disease”, (46%) “neoplastic disease” (22%), “noninflammatory/nonneoplastic disease” (16%) and the control group (16%). The most frequently diagnosed diseases were from the group of inflammatory diseases of the lower respiratory tract; chronic bronchitis (N = 6), purulent bronchopneumonia (N = 5), CIRDC (N

= 3), eosinophilic bronchopneumopathy (N = 2), and purulent tracheobronchitis (N = 1). From the group of neoplastic diseases, both primary lung neoplasms (N = 4) and secondary (metastatic) lung neoplasms (N = 4) were diagnosed. From the group of non-inflammatory and non-neoplastic diseases, bronchial collapse was most diagnosed (N = 6), of which one dog also had hypoplasia of the trachea, and another had tracheal collapse along with bronchial collapse. The control group included dogs with the following final diagnoses: purulent rhinitis, bilateral laryngeal paralysis, brachycephalic airway obstruction syndrome, bilateral pneumothorax with simultaneous chest effusion of unknown aetiology, chest effusion of unknown aetiology and primary megaesophagus.

Data on the signalment, history and clinical presentation did not reveal any relevant deviation to the data from published literature. A dry cough was significantly present in the majority of dogs with inflammatory diseases compared to other groups. Statistical analysis of the laboratory findings revealed that the hematocrit value was significantly lower, and the concentration of serum C-reactive protein significantly higher in the group with neoplastic diseases compared to the other groups.

Causative agents associated with canine infectious respiratory disease complex were rarely isolated by molecular methods from bronchoalveolar lavage samples with *B. bronchyseptica* being isolated in only one dog, whilst the microbiological examination of the bronchoalveolar fluid revealed this agent in four dogs. *Mycoplasma* species nucleic acid was found in bronchoalveolar fluid samples of 11 dogs, none of which had *Mycoplasma cynos*.

Proteomic analysis analysed 36 serum samples, 37 bronchoalveolar lavage samples, and 22 saliva samples from dogs with lower respiratory tract diseases and a control group without lower respiratory tract diseases. In total, 28 proteins with at least two unique peptides, present in at least 50 % of all samples were determined, with statistically significantly different abundances between the four groups. Most of the mentioned proteins are closely related to the immune system and coagulation, which are intertwined with the purpose of defending the host. Proteome analysis provides insight into numerous important functions of the organism and reveals potential biological markers of lower respiratory disease of the dog.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>2</b>
2.1. DIJAGNOSTIČKI PRISTUP PSU S BOLEŠĆU DONJIH DIŠNIH PUTEVA.....	2
2.1.1. ANAMNEZA, NACIONAL I KLINIČKI ZNAKOVI .....	2
2.2. BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA U PASA.....	21
2.2.1. UPALNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA .....	22
2.2.2. NEOPLASTIČNE BOLESTI.....	34
2.2.3. NEUPALNE I NENEOPLASTIČNE BOLESTI.....	36
2.3. PROTEOMIKA.....	45
2.3.1. PROTEOMIKA U HUMANOJ I VETERINARSKOJ MEDICINI .....	48
<b>3. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>50</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>52</b>
4.1. ODOBRENJE.....	52
4.2. UZORCI.....	52
4.3. PODATCI KLINIČKE OBRADE.....	52
4.4. PODACI O NALAZIMA LABORATORIJSKIH PRETRAGA.....	53
4.5. DIJAGNOSTIKA KARDIOPULMONALNE DIROFILARIOZE I ANGIOSTRONGILOZE .....	54
4.6. BRONHOSKOPIJA I BRONHOALVEOLARNO ISPIRANJE .....	55
4.7. CITOLOŠKA PRETRAGA BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA.....	57
4.8. MIKROBIOLOŠKA PRETRAGA BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA.....	58
4.9. MOLEKULARNA METODA DOKAZA UZROČNIKA POVEZANIH SA ZARAZNIM KAŠLJEM PASA .....	59
4.9.1. PCR PROTOKOL .....	59
4.10. UZORCI SLINE .....	64
4.11. FORMIRANJE SKUPINA.....	64
4.11.1. UPALNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA .....	66
4.11.2. NEOPLASTIČNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA .....	68
4.11.3. NEUPALNE I NENEOPLASTIČNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA ....	69

4.11.4.	<i>KONTROLNA SKUPINA</i> .....	71
4.12.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	71
4.13.	PROTEOMIKA I ANALIZA PODATAKA.....	72
4.13.1.	<i>PRIPREMA UZORAKA</i> .....	72
4.13.2.	<i>OBRADA PODATAKA SPEKTROMETRIJE MASA, STATISTIČKA I BIOINFORMATIČKA OBRADA</i> .....	74
<b>5.</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>77</b>
5.1.	PODACI O PSIMA UKLJUČENIMA U ISTRAŽIVANJE.....	77
5.2.	REZULTATI LABORATORIJSKIH PRETRAGA.....	83
5.3.	REZULTATI PARAZITOLŠKIH PRETRAGA.....	86
5.4.	REZULTATI SLIKOVNE DIJAGNOSTIKE I ENDOSKOPSKE PRETRAGE DUŠNIKA I BRONHA.....	87
5.5.	REZULTATI CITOLOŠKE, BAKTERIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE PRETRAGE UZORAKA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA.....	88
5.6.	REZULTATI MOLEKULARNE PRETRAGE UZORAKA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA.....	90
5.7.	KONAČNA DIJAGNOZA.....	93
5.8.	REZULTATI STATISTIČKE OBRADE PODATAKA.....	94
5.9.	REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE.....	100
5.9.1.	<i>REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE SERUMA</i> .....	100
5.9.2.	<i>REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA</i> <i>110</i>	
5.9.3.	<i>REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE SLINE</i> .....	117
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>119</b>
6.1.	PODATCI O ŽIVOTINJAMA I NALAZIMA DIJAGNOSTIČKIH PRETRAGA	119
6.2.	PROTEOMSKA ANALIZA.....	132
6.2.1.	<i>PROTEOMSKA ANALIZA SERUMA ISTRAŽIVANIH PASA</i> .....	133
6.2.2.	<i>PROTEOMSKA ANALIZA BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA</i> <i>ISTRAŽIVANIH PASA</i> .....	138
6.2.3.	<i>PROTEOMSKA ANALIZA SLINE ISTRAŽIVANIH PASA</i> .....	142
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>144</b>

<b>8. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>145</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA.....</b>	<b>177</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

- APOH – beta-2-glikoprotein 1 (engl. *beta-2-glycoprotein 1*)
- AMBP – protein AMBP
- APOA2 – apolipoprotein A-II
- BAL – bronhoalveolarno ispiranje (engl. *bronchoalveolar lavage*)
- B-BAL – bronhoskopsko bronhoalveolarno ispiranje
- BCS – procjena tjelesne kondicije (engl. *body condition score*)
- CAV-2 – pseći adenovirus 2 (engl. *canine adenovirus type 2*)
- CCL2 – kemokinski ligand 2 (engl. *chemokine ligand 2*)
- CDV – virus štenećaka (engl. *canine distemper virus*)
- CaHV-1 – pseći herpesvirus 1 (engl. *canine alphaherpesvirus type 1*)
- CFU – jedinica formirajućih kolonija (engl. *colony forming unit*)
- CLEC3B – C-tip lektina domene obitelji 3 član B (engl. *C-type lectin domain family 3 member B*)
- CIRDC – kompleks zaraznih dišnih bolesti pasa, kašalj štenare, zarazni kašalj pasa (engl. *canine infectious respiratory disease complex*)
- CIV – virus influence pasa H3N8 (engl. *canine influenza virus H3N8*)
- CnPnV – pneumovirus pasa (engl. *canine pneumovirus*)
- CPIV – virus parainfluence pasa (engl. *canine parainfluenza virus*)
- CRCoV – respiratorni koronavirus pasa (engl. *canine respiratory coronavirus*)
- CRP – C-reaktivni protein
- CT – kompjutorizirana tomografija (engl. *computed tomography*)
- EDTA – etilen-diamino-tetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EGFR – receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor*)
- F – čimbenik zgrušavanja (engl. *coagulation factor*)
- F2 – protrombin
- FDR – postotak krivih očitavanja (engl. *false discovery rate*)
- GO – genska ontologija
- ITIH3 – inter-alfa-tripsin inhibitor teškog lanca (engl. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*)
- IQR – interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)



ITIH3 – teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina (engl. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*)

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

LC – tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

LAHPS – sindrom lupus antikoagulans-hipoprotrombinemije

MMP-9 – matrikalna metaloproteinaza-9

MR – magnetska rezonancija (engl. *magnetic resonance*)

mRNK – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger ribonucleic acid*)

MS – spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)

MUC-5AC – mucin-5AC

*m/z* – omjer mase i naboja iona (engl. *mass-to-charge ratio*)

NB-BAL – nebronhoskopsko bronhoalveolarno ispiranje („slijepo“ bronhoalveolarno ispiranje)

PaO<sub>2</sub> – parcijalni tlak kisika

PaCO<sub>2</sub> – parcijalni tlak ugljičnog dioksida

PIIINP – prokolagen tipa III aminoterminalnog propeptida

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PCA – analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*)

protein AMBP – protein prekursor alfa-1-mikroglobulina/bikunina (engl. *protein alpha-1-microglobulin/bikunin precursor*)

RT-PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*)

SERPING1 – član 1 obitelji serpina G (engl. *serpin family G member 1*)

Th2 limfociti – pomoćnički T-limfociti tip 2 (engl. *T helper 2*)

UZV – ultrazvuk

## 1. UVOD

Bolesti donjih dišnih puteva česte su u pasa, a zbog poremećaja u oksigenaciji krvi mogu biti životno ugrožavajuće za pacijenta. U ovom će se radu termin *bolesti donjih dišnih puteva* odnositi na bolesti koje zahvaćaju dušnik, bronhe, bronhiole, alveole, plućni intersticij i vaskulaturu pluća (HAWKINS, 2020.). Bolesti donjih dišnih puteva mogu se podijeliti na: upalne i neoplastične bolesti traheje i bronha, upalne (sterilne, bakterijske, virusne, gljivične i parazitske pneumonije) i neoplastične bolesti plućnog parenhima, edem pluća (kardiogeni i nekardiogeni) i intersticijske bolesti pluća (neupalne, neneoplastične bolesti plućnog intersticija) (ETTINGER i sur., 2024.).

Klinički su znakovi promjenjivi, od blagog, tek zamjetnog kašlja do smanjene tolerancije aktivnosti, ubrzanog i otežanog disanja, slabosti i kolapsa (HAWKINS, 2020.). Oni mogu dramatično smanjiti kvalitetu života i biti neugodni i uznemirujući za vlasnike pasa (HSIEH i BEETS, 2020.). Zbog toga je cilj procjene psa sa znakovima bolesti dišnog sustava doći do specifične dijagnoze što prije, koristeći se pritom najmanje invazivnom dijagnostikom.

Klinički pristup psu sa sumnjom na bolest donjih dišnih puteva često je dijagnostički izazov i zahtijeva primjenu mnogobrojnih dijagnostičkih postupaka, poput slikovne dijagnostike, parazitoloških, mikrobioloških i citoloških pretraga uzoraka dobivenih bronhoalveolarnim ispiranjem, bronhoskopije, transtorakalne punkcije pluća, biopsije plućnog tkiva i slično (HAWKINS, 2020.). Navedene pretrage su dugotrajne, financijski zahtjevne i invazivne. Za neke, poput bronhoskopije i bronhoalveolarnog ispiranja, kompjutorizirane tomografije, potrebna je sedacija ili opća anestezija, što je u određenih pacijenata, iz medicinskih ili materijalnih razloga, teško provedivo.

## **2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. DIJAGNOSTIČKI PRISTUP PSU S BOLEŠĆU DONJIH DIŠNIH PUTEVA**

#### **2.1.1. ANAMNEZA, NACIONAL I KLINIČKI ZNAKOVI**

Dijagnostički pristup psu kod kojega se sumnja na bolest donjih dišnih puteva počinje već prilikom uzimanja podataka o životinji i povijesti bolesti. Podatci o životinji omogućuju prioritiziranje liste diferencijalnih dijagnoza, npr. mladi, imunokompromitirani ili necijepljeni psi imaju veću vjerojatnost imati zaraznu bolest dok je u starih životinja mogućnost novotvorine kao uzroka bolesti veća nego u mladima (ETTINGER i sur., 2024.). Pojedine pasmine pasa predisponirane su za određene genetske ili nasljedne bolesti, poput kronične plućne fibroze u zapadnoškotskih terijera (HEIKKILA i sur., 2011.). Građa lubanje također može pružiti tragove o etiologiji bolesti, pa su tako dolichocefalične pasmine sklonije tumorima nosa ili aspergilozi, dok su brachicefalične pasmine sklonije hipoplaziji dušnika (koja uz produljenje mekog nepca i promjene na nosnicama pridonosi opstrukciji dišnih puteva) (RIECKS i sur., 2007.; ETTINGER i sur., 2024.).

Najčešći klinički znak u pasa s bolestima donjih dišnih puteva jest kašalj, a u slučaju da bolest dovodi do poremećaja u oksigenaciji krvi, mogu se vidjeti i znakovi poput nepodnošenja tjelesnog napora, slabosti, cijanoze vidljivih sluznica, sinkope i respiratornog distresa (HAWKINS, 2020.). U nekim životinja mogu se vidjeti i nespecifični znakovi bolesti, koji ne pomažu u lokalizaciji, poput povišenja tjelesne temperature, anoreksije, letargije i gubitka tjelesne mase (HAWKINS, 2020.).

Kašalj je obrambeni mehanizam, odnosno refleks, koji uključuje eksplozivno oslobađanje zraka iz pluća kroz usta (HAWKINS, 2020.). Nastaje kao posljedica udisanja iritantnih ili štetnih tvari, iako upala i pritisak na ždrijelo ili traheobronhalno stablo mogu potaknuti ovaj refleks (ETTINGER i sur., 2024.). U ljudi se lista diferencijalnih dijagnoza smanjuje klasificirajući kašalj kao produktivan ili neproduktivan, ali u veterinarskoj medicini to je često nepraktično, jer kod bolesti koje bi trebale uzrokovati produktivan kašalj on često ne uočava (HAWKINS, 2020.). Produktivan kašalj se najčešće povezuje s upalnim bolestima (zaraznim ili sterilnim) dišnih puteva ili alveola, te sa zatajavanjem srca (JOHNSON, 2010.).

Hemoptiza, iskašljavanje krvi, je neučestali znak oboljenja donjih dišnih puteva i najčešće se pojavljuje kod kardiopulmonalne dirofilarijaze i kod novotvorina pluća, a rjeđe kod gljivičnih pneumonija, stranih tijela, teškog zastojnog zatajivanja srca, plućne tromboembolije, torzije plućnog krila ili koagulopatija (HAWKINS, 2020.).

Razlike u zvuku kašlja mogu pomoći u lokalizaciji i određivanju prirode nastanka istog. Primjerice, kašalj koji nastaje u velikim dišnim putevima (dušnik, glavni bronhi) je često praćen zvukom nalik na glasanje guske (engl. „*goose honk*“) koji nastaje ako se zrak s naporom izbacuje kroz sužene ili kolabirane segmente (ETTINGER i sur, 2024.). Često se takav kašalj pojavljuje u paroksizmima koji su neprogresivni, odnosno, svaki kašalj nalikuje na prethodni. S druge strane, kašalj koji nastaje zbog bolesti alveola ili malih dišnih puteva (bolesti poput bronhopneumonije ili kroničnog bronhitisa) često je praćen dubokim udahom i može se pojaviti u paroksizmima, koji počinju tiho i naknadno bivaju glasniji, prateći sekret koji se pomiče prema velikim dišnim putevima (ETTINGER i sur, 2024.).

Bolesti koje dovode do smanjene sposobnosti pluća da oksigeniraju krv dovest će (ovisno o trajanju i težini bolesti) do znakova od blagog ubrzanja frekvencije disanja, smanjene aktivnosti, pa sve do nepodnošenja tjelesnog napora i respiratornog distresa u mirovanju (HAWKINS, 2020.). Psi u respiratornom distresu često stoje ispruženih vratova i laktova u abdukciji te imaju naglašene pokrete abdominalne muskulature (HAWKINS, 2020.). Psi tada vrlo često dišu otvorenih usta kako bi izbjegli otpor prisutan u nosu i nazofarinksu (ETTINGER i sur., 2024.).

Boja vidljivih sluznica daje dodatan podatak o oksigenaciji krvi, pa je tako bljedilo sluznica povezano s akutnom hipoksemijom, dok je cijanoza (plavičasto obojenje sluznica) znak teške hipoksemije i označava da su prijeđene mogućnosti kompenzacije za taj stupanj respiratorne disfunkcije (HAWKINS, 2020.).

Pacijenti u respiratornom distresu zbog bolesti donjih dišnih puteva, koje zahvaćaju velike dišne puteve, najčešće imaju fiziološku (ili blago povišenu) frekvenciju disanja s naglašenim i glasnim ekspirijem, dok pacijenti s bolestima malih donjih dišnih puteva imaju ubrzano i plitko disanje (ETTINGER i sur., 2017.; HAWKINS, 2020.).

Fiziološki šum nad plućnim poljem nastaje zbog turbulentnog strujanja zraka unutar velikih dišnih puteva, dok laminarno strujanje unutar manjih dišnih puteva ne generira zvuk u zdravih životinja. On može biti bronhalan (nastaje nad velikim dišnim putevima, poput vjetra na olujni dan, glasan, oštar, frekvencije oko 75 – 1000 Hz), vezikularan (nad malim dišnim putevima na samoj periferiji prsne šupljine, poput lišća na blagom vjetru, ispod 400 Hz) ili pak kombinacija navedenih, tzv. bronhovezikularni zvukovi (ENGLAR, 2019b.). Naglašeni, tzv. oštriji dišni šumovi mogu biti prisutni u zdravih i u bolesnih pasa. Tipičan je primjer tjeskoban pas koji zbog dahtanja i tahipneje ima naglašeniji dišni šum nad plućnim poljem. S druge strane, bilo kakav patološki proces koji promijeni odnosno naglasi turbulentno strujanje zraka kroz dišne puteve može dovesti do pooštrenja dišnog šuma (ENGLAR, 2019b.). Stišani dišni šum također se može pojaviti u zdravih i bolesnih jedinki, tim više što pojedine pasmine pasa imaju debele dlačne pokrivače ili su pak pretili, što onemogućuje prijenos dišnih šumova do stetoskopa (ENGLAR, 2019b.) Osim toga, krzno može pridonijeti i stvaranju artefaktnih zvukova koji mogu biti pogrešno protumačeni kao patološki zvukovi nad plućnim poljem. Stišan ili odsutan dišni šum može uputiti na prisutnost tkiva ili tekućine između stijenke prsnog koša i dišnih puteva (RIJNBERK i VAN SLUJIS, 2009.). Od patoloških zvukova, nad plućnim poljem mogu se zabilježiti hropci i krepitacije (engl. *crackles*) koji predstavljaju kratke, isprekidane zvukove poput pucketanja, ili poput razdvajanja čičak (Velcro) trake, a mogu biti finijeg ili grubljeg karaktera, ovisno o veličini zahvaćenih dišnih puteva. Hropci i krepitacije pripisuju se brojnim bolestima koje dovode do nakupljanja tekućine (edemske ili upalne) unutar dišnih puteva, pa se često bilježe u pasa s kroničnim bronhitisom, edemom pluća i pneumonijom (ENGLAR, 2019b.). Zvižduci su, uz hropce/krepitacije, još jedan patološki zvuk koji se može čuti nad plućnim poljem. Za razliku od hropaca i krepitacija, zvižduci su muzikalni, kontinuirani zvuk koji nastaje zbog vibracije dišnih puteva uzrokovane zadebljanjem njegove stijenke (ENGLAR, 2017.). U pasa se najčešće opisuju kod kroničnog bronhitisa.

### **2.1.2. METODE DIJAGNOSTIKE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA U PASA**

Nakon inicijalnog uzimanje anamneze, dijagnostički pristup uključuje opći klinički pregled, rendgensku pretragu prsne šupljine i minimalnu laboratorijsku bazu podataka, te se

daljnji plan i dijagnostički testovi određuju iz informacija dobivenih tim pretragama (HAWKINS, 2020.). Respiratorni znakovi mogu biti u potpunosti posljedica bolesti koje zahvaćaju dišni sustav, ali mogu biti i očitovanje disfunkcije drugih organskih sustava (npr. probavnog, središnjeg živčanog sustava, krvožilnog itd.) (ETTINGER i sur., 2024.).

#### **2.1.1.1. KLINIČKI PREGLED**

Klinički pregled dišnog sustava služi da bi dalje usmjerio dijagnostičku obradu na temelju podataka dobivenih iz uzete anamneze, a osim toga služi i za dobivanje informacija o drugim organskim sustavima i na taj način pomaže otkriti druge bolesti ili sistemske bolesti koje se odražavaju na dišni sustav (npr. metastatske novotvorine) (ETTINGER i sur., 2024.; HAWKINS, 2020.). Posebno je važno da se obuhvate svi dijelovi dišnog sustava, auskultiraju pluća i srca, pregledaju vidljivi dijelovi dišnog sustava (nosnice), te usna šupljina (ETTINGER i sur., 2024.). Srčani šum u pasa s mitralnom insuficijencijom je česti nalaz u starijih pasa malih pasmina koji se zaprimaju s anamnezom kašlja. On može biti sporedan nalaz, ali i doprinosti kašlju u pasa sa zastojskim popuštanjem srca i povećanjem lijevog atrija (HAWKINS, 2020.).

#### **2.1.1.2. RENDGENSKA DIJAGNOSTIKA**

Rendgenografija prsne šupljine uvijek je indicirana kod bolesti donjih dišnih puteva (osim u pacijenata u respiratornom distresu) i pomaže lokalizirati patološke promjene unutar različitih anatomskih struktura (srce, pluća, medijastinum, pleuralni prostor) ili lokalizirati ih unutar samog dišnog sustava (vaskularni, bronhijalno, alveolarno, intersticijski) (HAWKINS, 2020.).

#### **2.1.1.3. MINIMALNA LABORATORIJSKA BAZA PODATAKA**

Rezultati inicijalne minimalne laboratorijske baze podataka pomažu u sužavanju liste diferencijalnih dijagnoza i prioritiziranju vjerojatnijih uzroka respiratornih znakova, a istodobno su minimalnoinvazivni (ETTINGER i sur., 2024.). Dijagnostički postupci za probir (engl. *screening*) uključuju kompletnu krvnu sliku, biokemijske pretrage i analizu urina (ETTINGER i sur., 2024.).

#### 2.1.1.4. DOKAZ PRISUTNOSTI UZROČNIKA ZARAZNIH I INVAZIJSKIH BOLESTI

U slučaju sumnje na zaraznu ili invazijsku bolest mogu se primijeniti serološke, molekularne ili parazitološke pretrage uzoraka seruma, pune krvi i/ili bronhoalveolarnog ispirka (HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). Isključivanje prisutnosti srčanog crva (*Dirofilaria immitis*) savjetuje se kao rutinska pretraga u bilo kojeg psa koji kašlje, a detaljan popis najčešćih uzročnika bolesti donjih dišnih puteva nalazi se u tablici 1.

Tablica 1. Učestali virusni, bakterijski, protozoalni i uzročnici bolesti donjih dišnih puteva u pasa

pasa	
<b>Virusi</b>	Virus štenećaka
	Pseći adenovirus 2
	Pseći herpesvirus
	Virus parainfluence pasa
	Pseći koronavirus
	Virus influence pasa H3N8
	Pseći pneumovirus
<b>Bakterije</b>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Mycoplasma cynos</i>
	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>
<b>Protozoe</b>	<i>Toxoplasma</i> spp.
	<i>Neospora</i> spp.
<b>Paraziti</b>	<i>Dirofilaria immitis</i>
	<i>Angiostrongylus vasorum</i>
	<i>Paragonimus kellicotti</i>
	<i>Crenosoma vulpis</i>
	<i>Oslerus osleri</i>
	<i>Eucoles aerophilus</i>

### 2.1.1.5. NAPREDNA SLIKOVNA DIJAGNOSTIKA

Kompjutorizirana tomografija (engl. *computed tomography*, CT) pruža optimalnu mogućnost dijagnostike bolesti donjih dišnih puteva jer pruža detaljan, trodimenzionalni prikaz struktura u kratkom vremenu (ETTINGER i sur., 2024.). CT pruža bolji kontrast među prikazanim tkivima te omogućuje bolju detekciju čvorića od standardne rendgenografije (ARMBRUST i sur., 2012.). Stupanj detalja koji CT pruža omogućuje i kvantificiranje morfoloških lezija poput mjerenja promjera dišnih puteva ili mjerenja debljine bronhalne stijenke (CANNON i sur., 2013.; SZABO i sur., 2015.). CT snimke s tankim rezovima omogućuju i naknadnu izradu trodimenzionalnih slika koje mogu pomoći u lokalizaciji lezije i olakšati uzorkovanje lezije (ETTINGER i sur., 2024.).

Magnetska rezonancija (MR) omogućuje bolju rezoluciju mekih tkiva od one koja se dobiva radiografijom ili CT-om (ETTINGER i sur., 2024.). Ograničenje MR-a je loša detekcija lezija kostiju ili hrskavice, a zbog tehničkih i praktičnih ograničenja (dugo trajanje snimanja, visoki troškovi, artefakti zbog pomicanja prilikom disanja) nije dobra metoda za slikovnu dijagnostiku donjih dišnih puteva (THRALL, 2023.).

Fluoroskopija omogućuje prikaz dinamičkih struktura u stvarnom vremenu te prikaz dišnog sustava za vrijeme „mirovanja“ i za vrijeme kliničkih znakova (poput kašlja), ili tijekom i nakon mogućih okidača (gutanje, trčanje) (ETTINGER i sur., 2024.). U kontekstu pretrage donjih dišnih puteva fluoroskopija je korisna u otkrivanju dinamičnih poremećaja dušnika ili bronha, poput kolapsa te stupnjevanju težine tih poremećaja (MACREADY i sur., 2007.). Navedeni se poremećaji mogu promatrati i nakon indukcije kašlja, a također se može prosuditi utjecaj kardiomegalije i pokreta srca na kolaps intratorakalnih dišnih puteva (ETTINGER i sur., 2024.).

S obzirom na to da se ultrazvučni valovi odbijaju na granici između mekih tkiva i zraka, te kosti i zraka, ultrazvuk (UZV) je od ograničene koristi u dijagnostici bolesti donjih dišnih puteva (ETTINGER i sur., 2024.). Ultrazvuk može pomoći u identifikaciji i karakterizaciji pleuralnih lezija poput masa prsnog koša, pleuralnih masa, pleuralne tekućine, perifernih masa pluća, konsolidacije pluća, atelektaza ili apscesa (PACHOLEC i sur., 2021.). Pod nadzorom

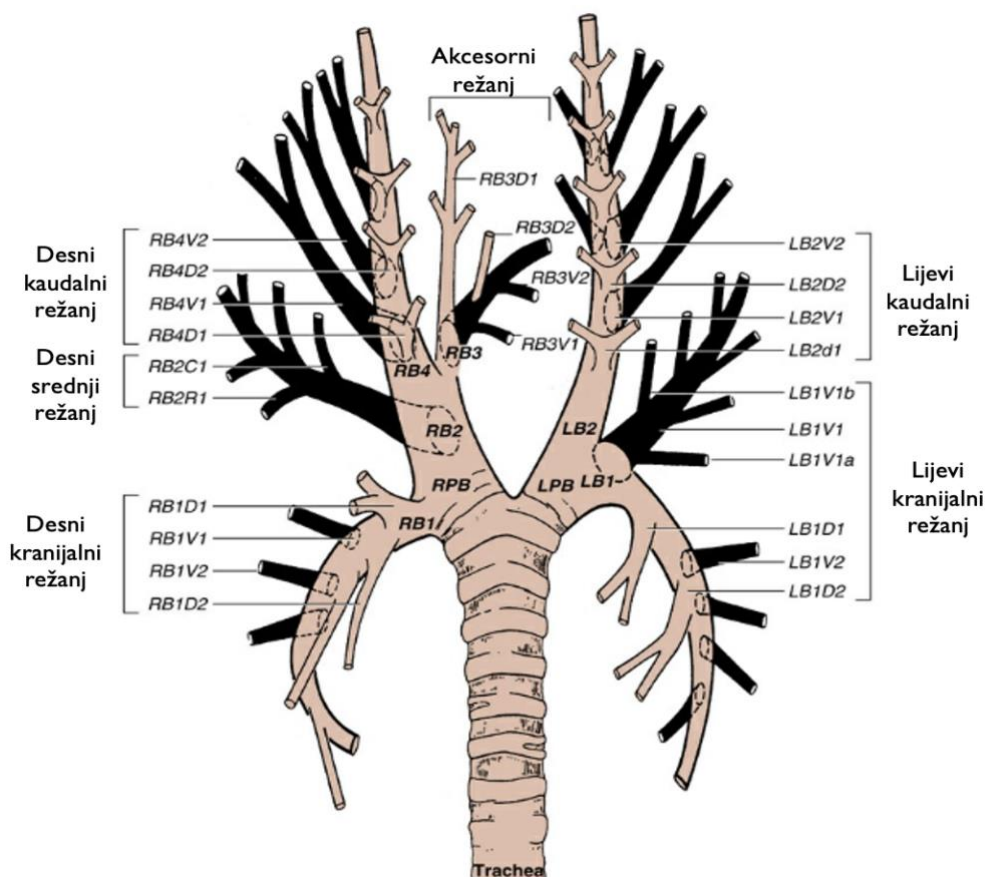


UZV-a može se učiniti perkutana punkcija masa ili pleuralne tekućine za potrebe citoloških, mikrobioloških ili molekularnih pretraga (WOOD i sur., 1998.).

Nuklearna scintigrafija provodi se apliciranjem radionuklida pacijentu te promatranjem radioaktivnog raspada u području interesa, a u veterinarskoj se medicini za tu svrhu najčešće koristi tehnecij 99m (ETTINGER i sur., 2024.). Indikacije za nuklearnu scintigrafiju uključuju pomoć pri dijagnostici cilijarne diskinezije, poremećaja plućne perfuzije i ventilacije te u dijagnostici plućne tromboembolije (HAWKINS, 2020.). Ograničenja ovakve dijagnostike uključuju lošu prostornu rezoluciju (zbog čega se najčešće kombinira s drugim modalitetima slikovne dijagnostike), potrebe za specijaliziranom infrastrukturom, nadzorom rada i sigurnosnim zahtjevima, zbog čega se uglavnom primjenjuje u akademskim ustanovama (ETTINGER i sur., 2024.).

#### **2.1.1.6. ENDOSKOPSKA PRETRAGA DONJIH DIŠNIH PUTEVA**

Endoskopija omogućuje izravan prikaz lumena proksimalnih dijelova respiratornog trakta, a u pasa se endoskopija može primijeniti i za pregled usne šupljine, orofarinksa, nosne šupljine i nazofarinksa, grkljana, dušnika te prvih nekoliko generacija bronhijalnog stabla (slika 1). Također može olakšati postupke dijagnostičkog uzorkovanja iz respiratornog trakta (ETTINGER i sur., 2024.). Endoskopska pretraga donjih dišnih puteva naziva se traheobronhoskopijom i smatra se jednom od najkorisnijih tehnika za postizanje konačne dijagnoze bolesti donjih dišnih puteva zbog toga što omogućuje određivanje lokacije, stupnja i opseg kolapsa trahealnih prstenova za planiranje stabilizacije putem kirurškog zahvata ili ugradnje stenta, identificirati izbočenje dorzalne trahealne membrane u trahealni lumen, dokumentirati izgled sluznice dušnika, prikazati intratorakalni kolaps bronha ili dišnih puteva te omogućiti prikupljanje bronhoalveolarnog ispirka za daljnje dijagnostičke postupke (poput mikrobiološke, molekularne ili citološke pretrage) (JOHNSON, 2010.). Nadalje, mogu se odabrati ciljana mjesta za uzimanje uzoraka u kućnih ljubimaca s fokalnim lezijama (ETTINGER i sur., 2024.).



Slika 1. Prikaz fiziološke anatomije bronha pasa. V1 – prvi segmentalni ventralni bronh; V2 – drugi segmentalni ventralni bronh; D1 – prvi segmentalni dorzalni bronh; D2 – drugi segmentalni dorzalni bronh; C1 – prvi segmentalni kaudalni bronh; R1 – rostralni segmentalni bronh. Segmentalni bronhi su podijeljeni na supsegmentalne bronhe: V1a – prvi supsegmentalni bronh; V1b – drugi supsegmentalni bronh. LB1 – lobarni bronh lijevog kranijalnog reznja pluća; LB2 – lobarni bronh lijevog kaudalnog reznja pluća; LPB – glavni bronh lijevog plućnog reznja; RB1 – lobarni bronh desnog kranijalnog reznja pluća; RB2 – lobarni bronh desnog srednjeg reznja pluća; RB3 – lobarni bronh dodatnog reznja pluća; RB4 – lobarni bronh desnog kaudalnog reznja pluća; RPB – glavni bronh desnog plućnog reznja. Prilagođeno iz: Amis T. C., B. C. McKiernan (1986): Systematic identification of endobronchial anatomy during bronchoscopy in the dog. Am J Vet Res;47:2649.

Za traheobronhoskopiju se upotrebljava fleksibilni videobronhoskop koji se sastoji od insercijske cijevi i upravljačke jedinice, kojom se ručno upravlja i koja je spojena na izvor svjetla. Pomoću upravljačke jedinice savija se distalni dio cijevi što omogućuje rotacijske pokrete tog dijela endoskopa i bolji prikaz (ŠMIT i VUČKOVIĆ, 2024.). Bronhoskopi manjeg

promjera koriste se u mačaka i malih pasa, ali mali promjer bronhoskopa ograničava i veličinu radnog kanala. Radni kanal pruža mogućnost upotrebe instrumenta koji može biti vrlo koristan.

Traheobronhoskopija podrazumijeva pregled dušnika, gdje se procjenjuje izgled sluznice, količina i kvaliteta prisutnog sekreta te bilo kakvih znakova kolapsa. Zatim se identificira karina te svaki režanj pluća sustavno pregledava. Opisuju se abnormalnosti poput čepova sluzi, mukopurulentni iscjetka, krvarenja, stranih tijela, statičkog ili dinamičkog kolapsa dišnih puteva, masa ili čvorova te parazita (ETTINGER i sur., 2024.). Fiziološki dušnik u presjeku izgleda okruglo do ovalno, s minimalnom opuštenošću dorzalne trahealne membrane. Na karini račvanje na lijevi i desni glavni bronh daje orijentir za procjenu položaja unutar dišnih puteva. Normalni dišni putevi (slika 2) izgledaju okruglo do ovalno, pokazuju minimalnu promjenu oblika ili promjera tijekom disanja, sluznica je glatka, sjajna, vlažna i svjetloružičaste boje te mogu sadržavati minimalnu količinu iscjetka (JOHNSON, 2010.). Svi dostupni dišni putevi trebaju biti procijenjeni, a abnormalna područja s hiperemijom sluznice ili nakupljanjem sluzi trebaju biti identificirana kao mjesta za bronhoalveolarno ispiranje (BAL). Ako očito mjesto patološkog procesa nije prikazano, desni srednji režanj ili kaudalni dio lijevog kranijalnog reznja često se izabiru za BAL jer su usmjereni ventralno i sekret ima tendenciju nakupljanja u tim reznjevima (JOHNSON, 2010.). Prilikom ulaska u dišne puteve, endoskop treba držati u sredini lumena dišnih puteva kako bi se ograničila kontaminacija iz gornjih dišnih puteva.

Komplikacije koje se mogu pojaviti nakon bronhoskopije jesu pogoršani kašalj ili povećana opstrukcija dišnih puteva. Ove se komplikacije najčešće pojavljuju u pasa koji imaju težak kolaps dušnika ili bronhomalaciju jer iritacija dišnih puteva pojačava kašalj, a suzbijanje respiratornog napora anestezijskim sredstvima omogućuje pasivni kolaps oboljelih velikih i malih dišnih puteva (JOHNSON, 2010.).



Slika 2. Prikaz fiziološke sluznice bronha psa. (autor: I. Šmit)

#### **2.1.1.7. BRONHOALVEOLARNO ISPIRANJE**

Bronhoalveolarno ispiranje minimalno je invazivan dijagnostički postupak koji služi za postizanje dijagnoze kod bolesti donjih dišnih puteva, osobito kod difuznih bolesti bronha, plućnog intersticija ili alveola (ŠMIT i VUČKOVIĆ, 2024.). Ovo je često primjenjivana tehnika uzorkovanja za dobivanje materijala potrebnog za citološku, mikrobiološku i molekularnu pretragu (ETTINGER i sur., 2024.). Moguće komplikacije BAL-a uključuju smanjenje zasićenja kisikom, bronhospazam i pneumotoraks. Preporučuje se preoksigenacija 100 %-tnim kisikom prije i poslije BAL-a (pogotovo životinjama sa smanjenom respiratornom funkcijom (ETTINGER i sur., 2024.). Tijekom aspiracije također se može izvesti kupaža kako bi se olakšalo vraćanje uzorka. Postupak se može ponoviti kako bi se dobili adekvatni uzorci, ovisno o volumenu upotrijebljene fiziološke otopine, veličini pacijenta i respiratornom statusu pacijenta (ETTINGER i sur., 2024.). Makroskopski, bronhoalveolarni ispirak izgleda kao zamućena, pjenasta tekućina zbog prisutnosti surfaktanta iz alveola, a ovisno o karakteru patološkog procesa može imati i krvavu ili gnojnu komponentu (HAWKINS, 2020.). Dio uzorka može se odvojiti i u EDTA epruvete za potrebe citološke pretrage.

Bronhoalveolarno ispiranje putem bronhoskopa (B-BAL) izvodi se nakon što su pregledani svi dostupni režnjevi pluća, nakon čega se bronhoskop usmjerava prema željenom bronhu, a zatim se nježno gura dok se ne zaglavi ili ne zatvori dišni put (ETTINGER i sur., 2024.). U lumen prikazanog dišnog puta kroz priključak za uzorkovanje ubrizgava se topla

sterilna 0,9 %-tna fiziološka otopina i odmah se aspirira. Aspiracija se može izvesti ručno, aspiracijom brizgalicom ili putem usisne pumpe (ETTINGER i sur., 2024.).

Nebrohoskopsko bronhoalveolarno ispiranje (NB-BAL) služi za dijagnostičku evaluaciju pacijenata s bolestima pluća koje zahvaćaju intersticij, male dišne puteve ili alveole. Primjenom NB-BAL metode najčešće se uzorkuje kaudalni režanj pluća i potencijalno zaobilazi eksudat većih dišnih puteva. Stoga se NB-BAL primarno smatra dobrom metodom uzorkovanja za pacijente s difuznom intersticijskom bolešću pluća (HAWKINS, 2020.). Bronhoalveolarno ispiranje uvijek se izvodi nakon završetka pregleda, ali prije drugih invazivnijih postupaka uzorkovanja. Invazivniji postupci uzorkovanja poput biopsije ili četkanja mogu uzrokovati krvarenje, što može promijeniti rezultate BAL (ŠMIT i VUČKOVIĆ, 2024.).

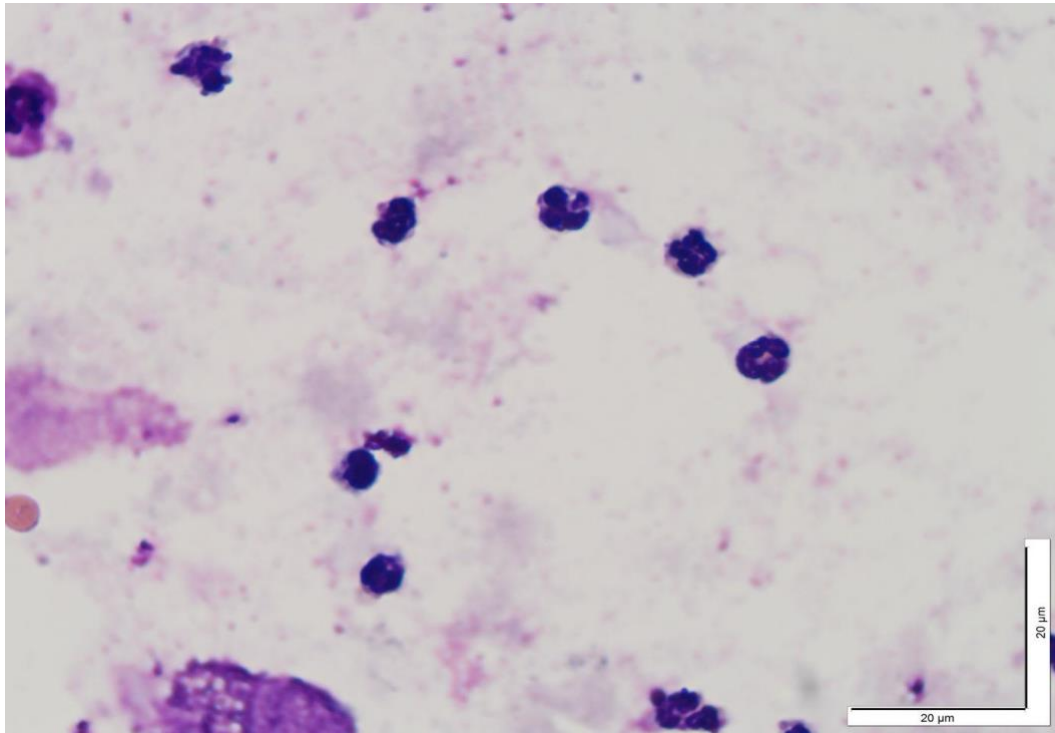
#### **2.1.1.8. CITOLOŠKA PRETRAGA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA**

Citološka pretraga jest analiza stanica tijela, odnosno uzoraka (poput bronhoalveolarnog ispirka), pod mikroskopom. Citološka pretraga uzoraka dobivenih bronhoalveolarnim ispiranjem pomaže u klasifikaciji bolesti donjih dišnih puteva (JOHNSON i VERNAU, 2019.). Citologijom se postavlja konačna dijagnoza ili barem pomaže (zajedno s ostalim pretragama) u formiranju konačne dijagnoze u do 75 % slučajeva (HAWKINS i sur., 1995.). Varijacije u tipu pojedinih stanica iz BAL ispiraka služe za postavljanje dijagnoze upalnih bolesti donjih dišnih puteva poput kroničnog bronhitisa, eozinofilne bronhopneumopatije ili bakterijske bronhopneumonije (JOHNSON i VERNAU, 2019.).

Citološka se pretraga uzoraka dobivenih BAL-om provodi na uzorcima skupljenima u EDTA epruvete, zbog boljeg očuvanja morfologije stanica. Idealno bi bilo koristiti se citospin tehnikom prilikom pripreme uzorka za citološku pretragu, osobito ako se procjenjuje bronhoalveolarni ispirak s niskim ukupnim brojem (HAWKINS, 2020.). Pohrana uzoraka dovodi do promjena morfologije stanica što može promijeniti konačnu citološku dijagnozu u do 57 % pohranjenih uzoraka, stoga bi citološka analiza bronhoalveolarnog ispirka trebala biti provedena promptno (NAFE i sur., 2011.). Pojedini autori preporučuju određivanje i ukupnog broja stanica s jezgrom, ali interpretacija tih rezultata kontroverzna je zbog toga što ovise o

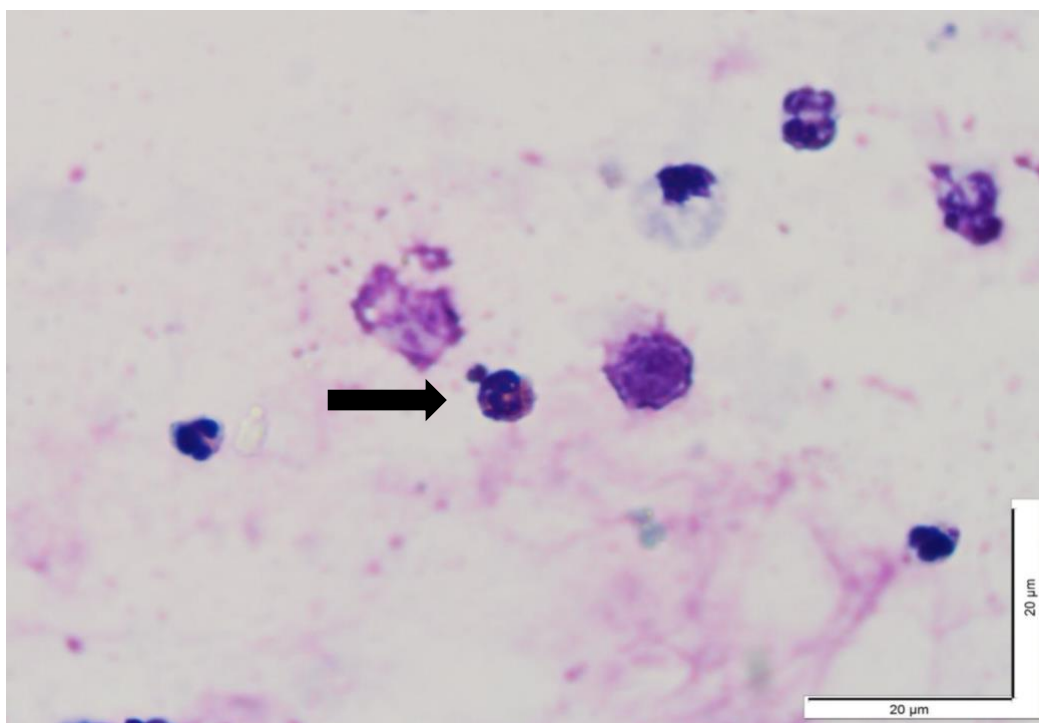
količini unesene fiziološke otopine (REBAR i sur., 1980.; MORDELET-DAMBRINE i sur., 1984., ŠMIT i VUČKOVIĆ, 2024.). Fiziološke citološke vrijednosti bronhoalveolarnog ispirka nekonzistentne su i razlikuju se i među zdravim psima, poglavito zbog individualne varijacije i različitosti tehnika uzorkovanja (HAWKINS, 2020.). Najbrojniju populaciju stanica u BAL tekućini čine makrofagi (> 70%), zatim limfociti, neutrofil i eozinofili (15 – 18 %) te epitelne stanice (koje uključuju trepetljikave epitelne stanice i vrčaste stanice (slika 5), a vidljiv je i surfaktant, koji je odgovoran za stvaranje pjene (ANDREASEN, 2003.).

Iako pojedini autori predlažu kvantificiranje stanica u ispicima, VALENCIANO i COWELL (2014.) smatraju određivanje broja stanica iz uzoraka BAL otežanim i neprikladnim (pretežito zbog nekonzistentnih referentnih vrijednosti i metoda uzorkovanja u brojnim studijama) za svakodnevne kliničke uvjete te predlažu kvalitativnu procjenu staničnosti obojenih razmaza sedimenta BAL tekućine. Citološka analiza uključuje procjenu količine i izgleda sluzi, vrste i morfologije te postotak rezidencijalnih i nerezidencijalnih stanica donjih dišnih puteva (VALENCIANO i COWELL, 2014.). Osim toga, opisuje se i prisutnost eventualnih mikroorganizama. Ako je dostupna kvantitativna bakteriološka pretraga, rast organizama veći od  $1,7 \times 10^3$  jedinica formirajućih kolonija (engl. *colony forming units* - CFU) (HAWKINS, 2020.) upućuje na klinički relevantnu infekciju. Očekuje se različit postotak i morfologija stanica ovisno o bolesti koja je dovela do nastanka respiratornih znakova, poput relativnog povećanja udjela raznih leukocita prilikom upale (ŠMIT i VUČKOVIĆ, 2024.). Nalaz povećanog udjela neutrofila, pogotovo ako su degenerirani ili sadržavaju intracelularne bakterije (slika 7), obično ukazuje na bakterijsku bronhopneumoniju (JOHNSON i VERNAU, 2019.). Povećan udio neutrofila (slika 3.) povezuje se s upalnim stanjima, bilo sterilnima ili infektivnima. Infektivni uzroci uključuju bakterijske, gljivične, mikoplazmalne i protozoalne bolesti, a sterilne (neinfektivne) uključuju alergijske bolesti (poput kroničnog bronhitisa), iritaciju/nekrozu tkiva posljedično inhalaciji toksičnih supstanci (poput dima) ili upalu zbog prisutnosti stranog tijela (VALENCIANO i COWELL, 2014.).



Slika 3. Prikaz neutrofilnih granulocita u uzorku bronhoalveolarnog ispirka psa s kroničnim bronhitisom. (Ljubaznošću Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti, May-Grünwald-Giemsa, povećanje objektiva 100x).

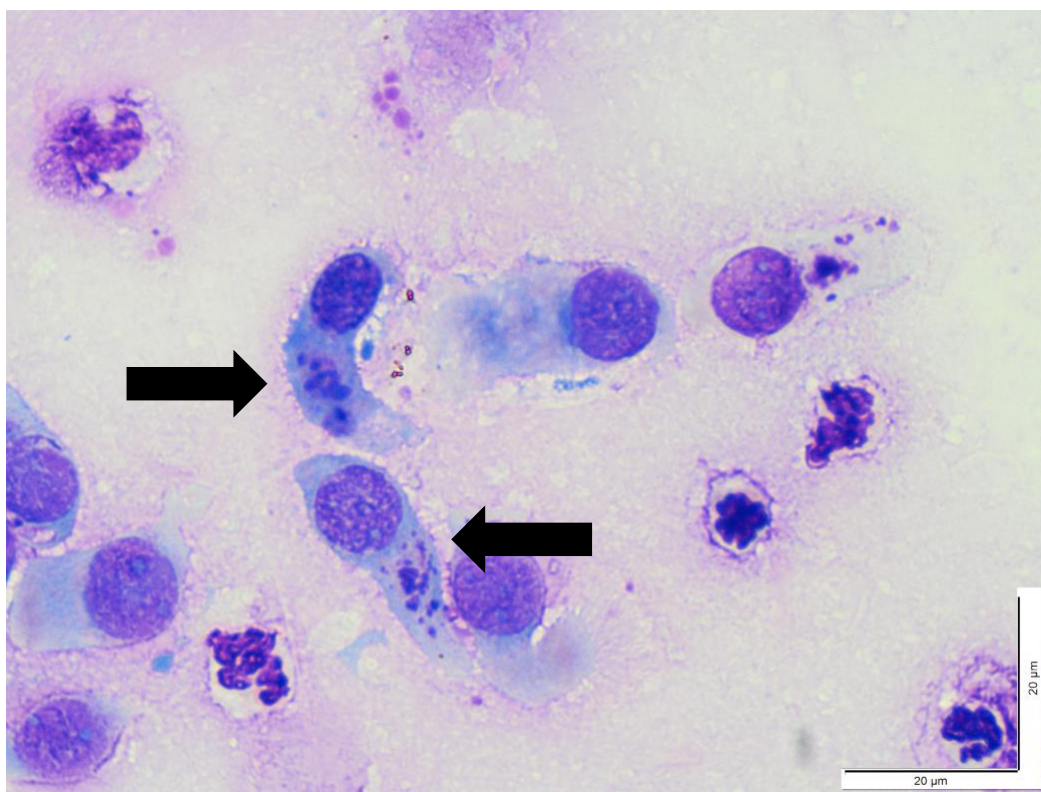
Povećan udio eozinofilnih granulocita (slika 4) povezuje se s reakcijama preosjetljivosti, alergijskim bronhitisom, parazitskim invazijama (poput plućnih vlasaca) te eozinofilnom bronhopneumopatijom (VALENCIANO i COWELL, 2014.). U istraživanju provedenom na 104 psa (JOHNSON i VERNAU 2019.) zaključeno je da je povećan broj limfocita bio uobičajen nalaz u BAL tekućini i vjerojatno predstavlja uobičajen odgovor na ozljedu dišnih puteva. Povećan udio makrofaga (slika 6) nalazi se uglavnom kod kroničnih bolesti pluća, poput kroničnih perzistirajućih infekcija ili zastojnog zatajivanja srca (HENDERSON, 1984.).



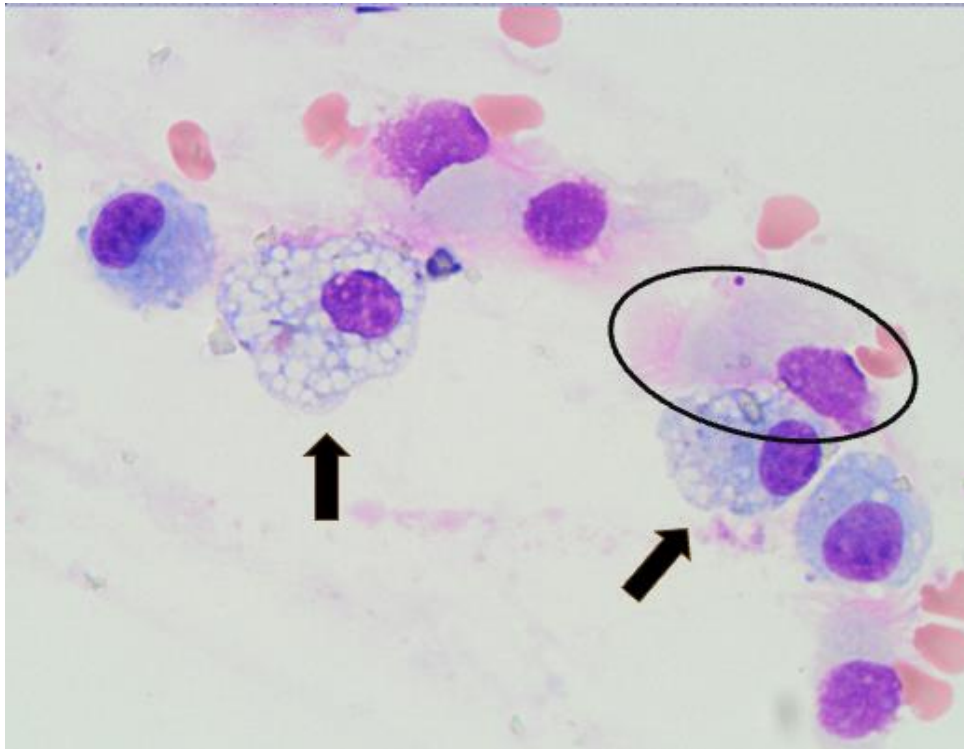
Slika 4. Prikaz eozinofilnog granulocita (crna strelica) u bronhoalveolarnom ispirku psa s kroničnim bronitisom. (Ljubaznošću Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti, May-Grünwald-Giemsa, povećanje objektiva 100x).

U rjeđim slučajevima mogu biti pronađene i neoplastične stanice, ali nekoliko istraživanja upućuje na suboptimalnu korelaciju između citologije bronhoalveolarnog ispirka i histopatološke pretrage, zbog činjenice da svi tumori ne otpuštaju stanice jednakim intenzitetom, kao i zbog činjenice da se metastatski tumori najčešće nalaze u intersticiju i ne bivaju obuhvaćeni BAL-om (VALENCIANO i COWELL, 2014.). Najčešći su primarni tumori pluća u pasa karcinomi i mogu se dijagnosticirati citološkom pretragom BAL tekućine (VALENCIANO i COWELL, 2014.). U istraživanju pasa s multicentričnim limfomom koji zahvaća pluća citologija BAL ispirka sadržavala je neoplastične limfocite u 66 % slučajeva (HAWKINS i sur., 1993.).

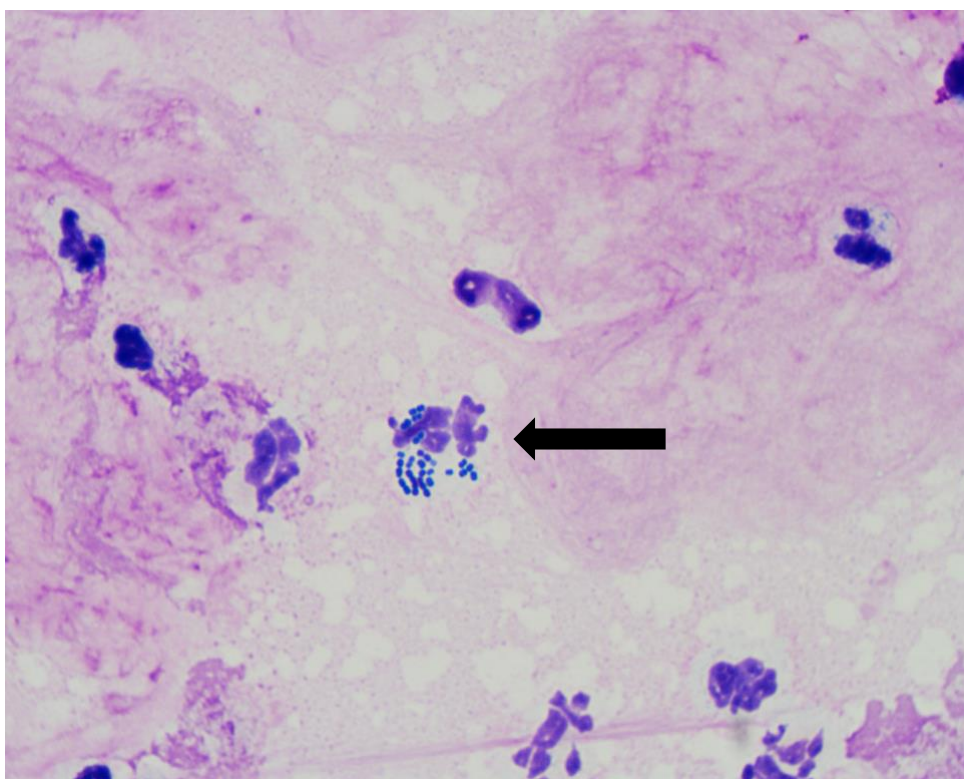




Slika 5. Prikaz vrčastih stanica (crne strelice) u citološkom uzorku bronhoalveolarnog ispirka psa. (Ljubaznošću Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti, May-Grünwald-Giemsa, povećanje objektiva 100x).



Slika 6. Plućni makrofagi (crne strelice) i prizmatični cilijarni epitel (zaokružen) pripadaju u rezidencijalne stanice koje se mogu prikazati u bronhoalveolarnim uzorcima pasa (Ljubaznošću Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti, May-Grünwald-Giemsa, povećanje objektiva 100x).



Slika 7. Prikaz intracelularnih kokoidnih bakterija u neutrofilnim granulocitima koji pokazuju degenerativne promjene (crna strelica). Gusta eozinofilna pozadina predstavlja sluz. (Ljubaznošću Laboratorija Klinike za unutarnje bolesti, May-Grünwald-Giemsa, povećanje objektiva 100x).

#### **2.1.1.9. MIKROBIOLOŠKA PRETRAGA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA**

Mikrobiološka pretraga bronhoalveolarnog ispirka važna je za dijagnostiku infektivnih uzročnika upalnih stanja donjih dišnih puteva. Dišni putevi nisu sterilni, a mikrobiom pluća pasa tek je nedavno proučavan i dostupni su ograničeni podaci (ERICSSON i sur., 2016.; FASTRÈS i sur., 2019.). Uzorci BAL tekućine mogu se čuvati na 4 °C tijekom 24 sata bez promjene rezultata kulturološke pretrage (CURRAN i sur., 2020.). Istraživanje PEETERS i suradnika (2008.) pokazalo je da nalaz bakterija u količini većoj od  $1,7 \times 10^3$  CFU/mL bronhoalveolarnog ispirka ima osjetljivost od 86 % i specifičnost od 100 % za dijagnozu respiratorne bakterijske infekcije, no moguće je da to svedjedno neće točno predvidjeti je li potrebna primjena antibiotske terapije (LEBASTARD i sur., 2022.). Bakterije koje se najčešće

izoliraju iz bronhoalveolarnih ispiraka su *Mycoplasma* spp., *Pasteurella* spp., *Bordetella bronhiseptica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas* spp. i gljivica *Cryptococcus neoformans* (PEETERS i sur., 2008.).

Osim bakterijskih infekcija, mikološka pretraga bronhoalveolarnog ispirka može biti korisna u identifikaciji gljivičnih infekcija koja zahvaćaju pluća (HAWKINS, 2020.). U nedostatku kvantitativne analize rast mikroorganizama na ploči izravno inokuliranoj s BAL ispirkom smatra se značajnim, dok rast iz ispirka koji se događa samo nakon predobogaćivanja upućuje na kontaminacije. Pacijenti koji već primaju antibiotike u vrijeme uzimanja uzorka mogu imati znatnu infekciju s malo porasta ili bez porasta bakterija u kulturi (HAWKINS, 2020.).

#### **2.1.1.10. ANALIZA PLINOVA U KRVI**

Mjerenje parcijalnih tlakova kisika ( $\text{PaO}_2$ ) i ugljikova dioksida ( $\text{PaCO}_2$ ) u uzorcima arterijske krvi pruža informacije o plućnoj funkciji. Analiza venske krvi manje je korisna jer su tlakovi kisika u venskoj krvi pod velikim utjecajem srčane funkcije i periferne cirkulacije (HAWKINS, 2020.).

Analiza plinova u uzorcima arterijske krvi smatra se zlatnim standardom procjenjivanja plućne sposobnosti izmjene plinova (ETTINGER i sur., 2024.). Mjerenje arterijskih plinova indicirano je kako bi se dokumentiralo zatajenje pluća, razlikovala hipoventilacija od drugih uzroka hipoksemije, odredila potrebu za potpornom terapijom i pratio odgovor na liječenje. Potrebno je izrazito smanjenje respiratorne funkcije kako bi se abnormalnosti mogle detektirati jer organizam posjeduje znatne kompenzacijske mehanizme (HAWKINS, 2020.).

Plućna oksigenacija procjenjuje se procjenom  $\text{PaO}_2$ . Hipoksemija se definira kao  $\text{PaO}_2$  manji od 80 mm Hg. Diferencijalne dijagnoze za hipoksemiju uključuju nizak parcijalni tlak udahnutog kisika (niski  $\text{PiO}_2$ ), alveolarna hipoventilacija, nerazmjer ventilacije i perfuzije (zbog plućne bolesti), desno-lijevi pretok (engl. *shunt*) i poremećaj difuzije (intersticijska bolest pluća, emfizem). Analiza plinova arterijske krvi također pruža metodu za procjenu alveolarnog parcijalnog tlaka kisika ( $\text{PaO}_2$ ) pomoću jednadžbe alveolarnog plina. Razlika između procijenjenog alveolarnog parcijalnog tlaka kisika i izmjerene arterijske parcijalnog tlaka kisika ( $\text{PAO}_2 - \text{PaO}_2$ ) naziva se A-a gradijent i normalno je  $< 15$  mm Hg u pacijentima koji udišu sobni zrak. Izračun A-a gradijenta daje metodu za kvantificiranje disfunkcije izmjene plinova, a također omogućuje razlikovanje uzroka hipoksemije. Hipoksemija povezana s povećanim gradijentom A-a posljedica je nejednakosti ventilacije i perfuzije, difuzijske

barijere ili desno-lijevog pretoka. hipoksemija s normalnim A-a gradijentom posljedica je niskog  $PiO_2$  (npr. disanje na visini) ili alveolarnu hipoventilaciju, te upućuje na to da je funkcija izmjene plinova u plućima normalna. Alveolarna ventilacija odnosi se na ispuštanje  $CO_2$  iz alveola i procjenjuje se na temelju parcijalnog tlaka ugljikova dioksida u arterijskoj krvi ( $PaCO_2$ ). Kada je alveolarna ventilacija oslabljena, alveolarni (i arterijski)  $CO_2$  se zadržava, a  $PaCO_2$  raste iznad normale (hipoventilacija). Uobičajeni uzroci hipoventilacija uključuje depresiju središnjeg živčanog sustava, opstrukciju dišnih puteva, bolest pleuralnog prostora, abnormalnosti stijenke prsnog koša i anesteziju. Hipoventilacija se također pojavljuje kao kompenzacijski odgovor na metaboličku alkalozu. Povećanjem alveolarne ventilacije povećava se izlučivanje  $CO_2$  preko pluća, a  $PaCO_2$  se smanjuje (hiperventilacija). Uobičajen uzroci hiperventilacije uključuju hipoksemiju, stimulaciju središnjeg živčanog sustava, bol i uzbuđenje. Alveolarna hiperventilacija također se može pojaviti kao kompenzacijski odgovor na primarnu metaboličku acidozu (ETTINGER i sur., 2024.).

#### **2.1.1.11. PULSNA OKSIMETRIJA**

Pulsna oksimetrija metoda je praćenja zasićenosti krvi kisikom. Neinvazivna je i može poslužiti za kontinuirani nadzor, pruža trenutačne rezultate i pristupačna je za većinu ordinacija. To je posebno koristan uređaj za praćenje životinja s bolestima dišnog sustava koje se moraju podvrgnuti postupcima koji zahtijevaju anesteziju. U nekim se slučajevima može koristiti i za praćenje napredovanja bolesti ili odgovora na terapiju. Pulsni oksimetri sadržavaju sondu koja se pričvršćuje na nabor tkiva, kao što su jezik, usna, uška, ingvinalni kožni nabor, nožni prst ili rep (HAWKINS, 2020.). Sonde mjere apsorpciju svjetlosti kroz tkiva ili reflektirano svjetlo i mogu staviti na sluznice ili unutar jednjaka ili rektuma. Arterijska se krv identificira kao komponenta koja se mijenja u pulsevima, dok se nepulsirajuća apsorpcija smatra pozadinom. Uobičajeni problemi koji mogu ometati točnu detekciju pulsa uključuju neadekvatan položaj sonde, vanjsko svjetlo, kretanje životinje (npr. disanje, drhtanje) i slab ili nepravilan pulsni tlak (npr. tahikardija, hipovolemija, hipotermija, aritmije). Izmjerena vrijednost pokazuje zasićenje hemoglobina u lokalnoj cirkulaciji. No ova vrijednost može biti pod utjecajem čimbenika koji nisu plućna funkcija, kao što je vazokonstrikcija, nizak minutni volumen srca i lokalna staza krvi. Drugi intrinzični čimbenici koji mogu utjecati na očitavanje oksimetrije uključuju anemiju, hiperbilirubinemiju, karboksihemoglobinemiju i methemoglobinemiju (ETTINGER i sur., 2024.).

### **2.1.1.12. BIOLOŠKI BILJEZI**

U kontekstu biomedicine biološki biljeg ili biomarker jest mjerljiv indikator biološkog stanja. Biološki biljezi često se mjere u krvi i urinu, ali i ostalim tkivima i uzorcima, kako bi se dobio uvid u biološke i patološke procese te pratio odgovor na farmakološku terapiju (BIOMARKERS DEFINITION WORKING GROUP, 2001.). Znatno dio molekula koje služe kao biološki biljezi po svojoj su prirodi proteini čija ekspresija ovisi o stanju i okolišu u kojemu se stanica nalazi. Patološka stanja dovode do drukčije ekspresije proteina, samim time je i proteom dane stanice ili organizma dinamičan (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.). Trenutačno nema uvriježenog biomarkera koji s visokom osjetljivošću i specifičnošću može poslužiti za dokazivanje određene bolesti donjih dišnih puteva a da pritom isključuje ostale bolesti, te brojna istraživanja pokušavaju otkriti takvu molekulu.

U istraživanju bioloških biljega u pasa s bolestima donjih dišnih puteva YAMAYA i suradnici (2014.) pokazali su da je razina surfaktanta A u serumu pasa oboljelih od intersticijskih bolesti pluća viša nego u pasa koji boluju od kroničnog bronhitisa. Slično, razina serumskog C-reaktivnog proteina bila je viša u slučajevima bakterijske bronhopneumonije nego u pasa oboljelih od kroničnog bronhitisa (VIITANEN i sur., 2014.). Psi koji boluju od kroničnog bronhitisa imali su i do tri puta višu razinu mucin-5AC-slične (MUC5AC) glesničke ribonukleinske kiseline u usporedbi sa zdravim psima (HAWKINS i sur., 2007.). Kemokini kemokinski ligand 2 (CCL2) i interleukin 8 pokazali su se kao potencijalni biološki biljezi jer se nalaze u znatno većim količinama u bronhoalveolarnim ispircima pasa s idiopatskom plućnom fibrozom u usporedbi sa zdravim psima, a više razine CCL2 zabilježene su i u serumu pasa s plućnom fibrozom (ROELS i sur., 2015.). KRAFFT i suradnici (2014.) zabilježili su i višu razinu transformacijskog faktora rasta  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) u pasmina pasa predisponiranih za idiopatsku plućnu fibrozu u usporedbi s drugim pasminama zbog čega se TGF- $\beta 1$  smatra značajnim u patologiji te bolesti u pasa i mačaka, kao i u ljudi. JUNG i suradnici (2024.) zabilježili su znatno više razine matriksne metaloproteinaze 9 (MMP-9) u pasa s kolapsom dušnika koji su imali klinički jači kašalj.

## **2.2. BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA U PASA**

Bolesti koje zahvaćaju donje dišne puteve u pasa mogu se grupirati i sistematizirati ovisno o anatomskoj strukturi koju zahvaćaju ili ovisno o etiopatogenetskom mehanizmu. Za potrebe ovog istraživanja bolesti donjih dišnih puteva grupirane su ovisno o etiopatogenetskom mehanizmu bolesti na upalne i neoplastične bolesti te one koje nisu primarno upalne ili neoplastične etiologije (tablica 2.)

Tablica 2. Popis diferencijalnih dijagnoza bolesti donjih dišnih puteva pasa.

CIRDC – kompleks zaraznih dišnih bolesti pasa (engl. *canine infectious respiratory disease complex*)

Upalne	CIRDC
	Kronični bronhitis
	Pneumonija (bakterijska, virusna, gljivična, protozoalna, parazitska, aspiracijska)
Neupalne i neneoplastične	Eozinofilna bronhopneumopatija
	Kolaps dušnika
	Intersticijska fibroza pluća
	Primarna cilijarna diskinezija
	Plućna tromboembolija
	Bronhiektazije
Neoplastične	Bronhomalacija
	Primarne novotvorine donjih dišnih puteva
	Sekundarne (metastatske) novotvorine donjih dišnih puteva

## 2.2.1. UPALNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA

### 2.2.1.1. ZARAZNI KAŠALJ PASA

Zarazni kašalj pasa (engl. *canine infectious respiratory disease complex*, CIRDC), poznat i kao “kašalj štenare” ili “zarazni traheobronhitis pasa” akutna je infekcija koja zahvaća ponajprije grkljan, dušnik i bronhe te katkad i pluća (FORD, 2012.). Ove su infekcije posebno

važne kada je velik broj pasa smješten zajedno, primjerice u skloništima za životinje, hotelima za životinje ili veterinarskim ustanovama (REAGAN i SYKES, 2020.).

Zarazni kašalj pasa među najčešćim je uzrocima akutne pojave respiratornih znakova u pasa (FORD et. al, 2012.). Etiologija je multikauzalna i u nju je uključeno više različitih virusnih i bakterijskih patogena (slika 8), gdje nekad samo pojedinačni patogen, ali češće njihova kombinacija, dovode do pojave bolesti (DAY i sur., 2020.). Virusni patogeni uključuju virus štenećaka (CDV), virus parainfluence pasa (CPIV), pseći adenovirus 2 (CAV-2), virus influence pasa (CIV), pseći herpesvirus (CaHV-1), pseći respiratorni koronavirus (CRCoV) i pseći pneumovirus (CnPnV) (FORD, 2012.; MABONI i sur., 2019.; OKONKOWSKI i sur., 2021.). Emergentni virusni patogeni povezani s CIRDC-om uključuju pseći bokavirus, hepaticivirus i pikornavirus (MABONI i sur., 2019.; MATSUU i sur., 2020.). Bakterijski patogeni koji se najčešće povezuju s CIRDC-om su *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma* spp. i *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (FORD, 2012.; MABONI i sur., 2019.). Iako se brojni virusi i bakterije upleću u etiopatogenezu ove bolesti, infekcija je najčešće uzrokovana jednim od četiri glavna patogena: *B. bronhiseptica*, CPIV, CIV i CAV-2 (FORD, 2012.).

Prevalencija različitih patogena uključenih u CIRDC razlikuje se ovisno o geografskom području. U istraživanju 175 uzoraka pasa iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD) koji su imali kliničke znakove u dišnom sustavu, 51 je bio pozitivan na CIV soj H3N2; 38 ih je bilo pozitivno na CPIV, a 33 na CRCoV (PRIESTNALL i sur., 2014.). U drugom istraživanju na 68 kućnih pasa s respiratornim znakovima u Japanu, 10,3 % bilo je pozitivno na *B. bronchiseptica*, a CPIV je otkriven u 7,4 % pasa (MOCHIZUKI i sur., 2008.). U novijem istraživanju iz Japana *B. bronchiseptica* je bio najčešće otkrivan mikroorganizam, a slijede ga CHV-1, CPIV, CnPnV, *M. cynos* i CAV-2 (MATSUU i sur., 2020.). U kanadskom istraživanju na 64 oboljela psa, 42 % bilo je pozitivno na CPIV, a 81 % bilo je pozitivno na *Mycoplasma cynos* (JOFFE i sur., 2016). Istraživanje s Novog Zelanda na 56 pasa s CIRDC-om i 60 kontrolnih pasa pokazuje da je 25 % pasa s CIRDC-om bilo pozitivno na CnPnV, a samo 4 % bilo je pozitivno na CPIV (MORE i sur., 2021.).

Ispravno tumačenje uloge pojedinačnih uzročnika u etiopatogenezi ovog stanja otežano je činjenicom da i klinički zdravi psi također mogu biti inficirani. U istraživanju provedenom na asimptomatskim psima, 240/503 (47,7 %) bilo je PCR pozitivno na najmanje jedan patogen



CIRDC-a, a 12,7 % na najmanje dva patogena (LAVAN i KNESI, 2015.). U tom su istraživanju najčešće otkriveni patogeni bili *M. cynos*, *B. bronchiseptica*, CAV-2, CDV i CPIV (LAVAN i KNESI, 2015.). Drugo istraživanje na 125 pasa bez respiratornih znakova koji su bili hospitalizirani u sveučilišnoj veterinarskoj bolnici u Francuskoj pokazalo je da je 32,8 % bilo PCR pozitivno na barem jedan patogen koji se povezuje s CIRDC-om, a od pasa koji su bili pozitivni 24,9 % bilo je pozitivno na dva patogena (BRUNET i sur., 2020.). U istraživanju s Novog Zelanda objavljeno je da je 38 % zdravih pasa bilo pozitivno na najmanje jedan respiratorni virus putem PCR testa (MORE i sur., 2021). Koinfekcije su česte u pasa s CIRDC-om i pacijenti s koinfekcijama mogu razviti teže kliničke znakove (FORD, 2012.; MABONI i sur., 2019.; BRUNET i sur., 2020.).

Patogeni povezani s CIRDC-om prenose se oronazalnim kontaktom s aerosoliziranim respiratornim sekretom, izravnim kontaktom među psima i putem kontaminiranih fomita (FORD, 2012.). Inkubacija najčešće traje 2 – 3 dana, ali može trajati i dulje, ovisno o patogenu (REAGAN i SYKES, 2020.). Patogeneza varira ovisno određenim mikroorganizmu, međutim svi organizmi povezani s CIRDC-om uzrokuju dominantno promjene na epitelu nosne sluznice, sluznice ždrijela/grkljana, dušnika i/ili bronha, te rjeđe promjene na plućima (FORD, 2012.). Većina će pasa pokazivati blage kliničke znakove paroksizmalnog, oštrog kašlja, seroznog iscjetka iz oka i/ili iz nosa te kihanje. Najčešće nema promjena u ponašanju ili apetitu psa. Psi koji pokazuju povišenu temperaturu i pokazuju znakove poput letargije, smanjenog apetita ili druge ozbiljnije kliničke znakove vjerojatno imaju sekundarne bakterijske infekcije (REAGAN i SYKES, 2020.).

Dijagnoza CIRDC-a postavlja se najčešće na temelju anamnestičkih podataka nedavnog izlaganja drugim psima (pogotovo ako i oni pokazuju slične kliničke znakove), kliničkim znakovima akutne pojave respiratornih znakova i empirijski, odgovorom na terapiju. U većini slučajeva, međutim, brz tijek bolesti, vrijeme potrebno za izolaciju organizama i vjerojatnost koinfekcije onemogućuju potvrdu specifičnih patogena (FORD, 2012.).

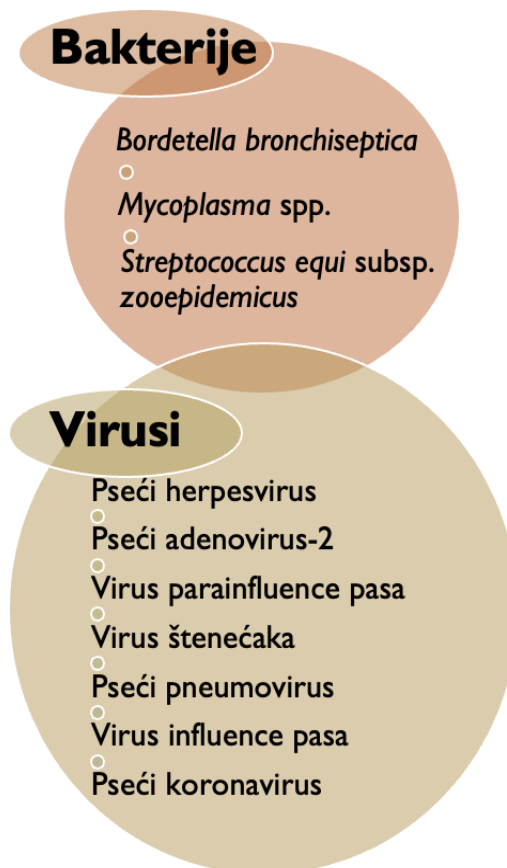
Rezultati kompletne krvne slike, biokemijskih pretraga i analize urina obično su u fiziološkim granicama ili odražavaju znakove upale: blaga do umjerena neutrofilija sa skretanjem ulijevo ili bez skretanja ulijevo i limfopenija. Rendgenogram prsne šupljine često je uredan ili pokazuje blage abnormalnosti u obliku intersticijskog do bronhointersticijskog

plućnog uzorka. Psi s težim kliničkim znakovima ili sekundarnom bakterijskom infekcijom mogu imati alveolarni plućni uzorak na rendgenogramu (REAGAN i SYKES, 2020.).

Podatci iz anamneze, nalazi kliničkog pregleda, laboratorijskih pretraga i rendgenograma mogu pobuditi sumnju na bolest uzrokovanu patogenom unutar CIRDC-a, međutim ispravna etiološka dijagnoza ne može se postaviti bez dijagnostičkih testova za otkrivanje specifičnih patogena. Za pse koji imaju teške ili brzo progresivne kliničke znakove, imaju kliničke znakove koji traju dulje od sedam do 10 dana ili borave i dalje u okruženju gdje je izbila bolest, preporučuje se pokušaj utvrđivanja etiološke dijagnoze (REAGAN i SYKES, 2020.).

Bakterijske kulturološke pretrage mogu se provesti iz obriska sluznice nosa, orofarinksa, ispirka dušnika ili bronhoalveolarnog ispirka. Tumačenje bakterijskih pretraga gornjih dišnih puteva treba tumačiti s oprezom zbog porasta fiziološke mikroflore, a mnogi CIRDC patogeni, kao što je *B. bronchiseptica*, mogu se izolirati i iz zdravih životinja. Uzimanje uzorka prilikom ispiranja dušnika ili bronhoalveolarnog ispiranja indicirano je u pasa s težim kliničkim znakovima, poput onih s upalom pluća. Rast CIRDC patogena kao što je *B. bronchiseptica* ili *M. cynos* u psa s odgovarajućim kliničkim znakovima može pružiti određenu potporu dokazivanju njihove uključenosti u razvoj bolesti, međutim i dalje treba uzeti u obzir koinfekciju drugim uzročnicima, a negativni rezultati pretraga ne isključuju prisutnost drugih uzročnika (kao što je CDV). Rast više vrsta bakterija može predstavljati oportunističku sekundarnu infekciju ili kontaminaciju. Lažno negativni rezultati mogu se pojaviti ako su primijenjeni antimikrobni lijekovi (REAGAN i SYKES, 2020.).

Respiratorni paneli razvijeni na temelju lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction – real time-PCR*) koji dokazuje nukleinsku kiselinu patogena, uključujući CPIV, CAV-2, CDV, CRCoV, CHV, CIV, *B. bronchiseptica* i *Mycoplasma* spp. (BELLAU-PUJOL i sur., 2005., JEOUNG i sur., 2013.). Brisevi nosa i orofarinksa ili uzorci prikupljeni iz donjih dišnih puteva bronhoalveolarnim ispiranjem mogu se podvrgnuti PCR analizi. Lažno negativni rezultati mogu biti posljedica degradacije uzorka tijekom transporta do laboratorija ili zbog male količine patogena. Lažno pozitivni rezultati mogu nastati zbog cijepljenja živim atenuiranim cjepivima nekoliko tjedana prije uzorkovanja (REAGAN i SYKES, 2020.).



Slika 8. Prikaz najčešćih patogena koji se povezuju sa zaraznim kašljem pasa.

### 2.2.1.2. KRONIČNI BRONHITIS

Kronični bronhitis jedna je od najučestalijih kroničnih respiratornih bolesti u pasa, a definiira se klinički kao kašalj koji se pojavljuje većinu dana i traje dulje od dva uzastopna mjeseca, u odsutnosti drugih aktivnih bolesti. Histološke promjene u dišnim putevima odražavaju dugotrajnu upalu s često ireverzibilnim promjenama poput fibroze, hiperplazije epitela i hipertrofije žlijezda.

Pretpostavlja se da je pseći kronični bronhitis posljedica dugotrajne upale, proces pokrenut infekcijom, alergijom ili udahnutim iritansima. Kontinuirana upala dovodi do oštećenja sluznice, hipersekrecije sluzi i opstrukcije dišnih puteva, što narušava normalnu funkciju mukocilijarnog pokrivača i dovodi do pojačanog i neadekvatnog odgovora na iritanse

i mikroorganizme. Kronični bronhitis pojavljuje se najčešće u srednjoj životnoj dobi ili u starijih pasa malih pasmina. Pasmine koje su najčešće zahvaćene su terijeri, pudli i koker španijeli (HAWKINS, 2020.).

Dijagnoza se postavlja ispunjavanjem triju dijagnostička kriterija: (1) kašalj  $\geq 2$  uzastopna mjeseca (2) dokaz hipersekrecije sluzi i (3) isključivanje drugih kroničnih kardiopulmonalnih bolesti (npr. zastojnog popuštanja srca, kronične bronhopneumonije, plućnih neoplazmi, eozinofilne bronhopneumopatije) kao uzroka kašlja. Druge kardiorespiratorne bolesti (npr. zastojno popuštanje srca, kolaps dišnih puteva) mogu biti istodobno prisutne i komplicirati dijagnostiku i liječenje kroničnog bronhitisa. U ljudi je funkcionalna posljedica kroničnog bronhitisa kronična opstrukcija dišnih puteva koja se naziva kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) i često za posljedicu ima nastanak emfizema. Čini se da se ovaj mehanizam rjeđe opaža u pasa, iako se dijagnoza KOPB-a oslanja na dokaz opstrukcije protoka zraka testovima plućne funkcije koji nisu široko dostupni u veterinarskoj medicini. Psi s teškim i dugotrajnom kroničnim bronhitisom mogu razviti bronhiektazije (dilataciju i razaranje stijenki bronha), bronhomalaciju (kolaps dišnih puteva tijekom izdisaja i kašalj) ili njihovu kombinaciju (ETTINGER i sur., 2024.).

Potencijalni rizični čimbenici u pasa s kroničnim bronhitisom su pretilost, parodontitis i zubni kamenac (HAWKINS i sur., 2010.). U ljudi najvažniji čimbenici rizika uključuju izloženost dimu, atmosfersko onečišćenje i infekcije (ETTINGER i sur., 2024.). U pasa, kronična/prethodna infekcija patogenima povezanim s CIRDC-om (npr. *Bordetella bronchiseptica*), prisutnost drugih bolesti, poput kolapsa dušnika ili miksomatozne bolesti mitralnih zalistaka, potencijalni su faktori koji dovode do razvoja od kroničnog bronhitisa. Izloženost duhanu iz okoliša nije potvrđena kao faktor rizika (HAWKINS i sur., 2010.).

Patogeneza kroničnog bronhitisa uključuje upalne promjene unutar bronhalne sluznice s povećanom proizvodnjom sluzi. Zadebljanje stijenke bronha i česta progresivna bronhomalacija pridonose opstrukciji protoka zraka i dodatno pogoršavaju upalu, što uzrokuje kašalj, a kašalj izaziva daljnju upalu.

Prilikom kliničkog pregleda uočavaju se abnormalnosti poput glasnog dišnog šuma nad dušnikom ili se povremeno auskultiraju kreptacije i hropci nad plućima. Pojava tzv.

terminalnog klika, koji se pojavljuje na kraju ekspirija, upućuje na kolaps dušnika ili glavnog bronha i pojavljuje se u životinja s uznapredovanom bolešću. Naglašeni ili pocijepani drugi srčani ton pojavljuje se u životinja sa sekundarnom plućnom hipertenzijom. Psi u respiratornom distresu (krajnji stadij bolesti) imaju izrazit ekspiratorni napor zbog suženja i kolapsa intratorakalnih velikih dišnih puteva. Prisutnost vrućice ili drugih sistemskih znakova upućuje na prisutnost druge bolesti, poput bakterijske upale pluća (HAWKINS, 2020.).

Dijagnostika podrazumijeva isključivanje drugih bolesti koje dovode do kroničnog kašlja poput povećanja lijevog atrija, kolapsa dušnika, alergijskog bronhitisa, plućnih neoplazmi itd. Dijagnostičke metode služe za isključivanje bolesti više nego za dokaz samog kroničnog bronhitisa. Slikovna dijagnostika (RTG, CT) može uputiti na naglašen bronhalni uzorak i korisna je za isključivanje ostalih bolesti. Bronhoskopski nalaz podrazumijeva promjene izgleda sluznice bronha (zažarena, grubog izgleda), hipersekreciju sluzi i povremeno kolaps bronha (bronhomalaciju), a bronhoalveolarno ispiranje omogućuje dobivanje uzoraka za citološku i mikrobiološku pretragu. Citološkom pretragom mogu se uočiti hiperplastične epitelne stanice i povećan udio neutrofila, makrofaga i vrčastih stanica (slike 5 i 6) (HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.)

U tijeku je potraga za potencijalnim biomarkerima u dijagnostici kroničnog bronhitisa koji bi mogli pomoći u potvrdi prisutnosti kronične upale i isključivanju drugih uzroka bolesti donjih dišnih puteva. Primjerice, serumski pseći surfaktant protein A viši je u pasa s intersticijskim plućnim bolestima nego u pasa s kroničnim bronhitisom (YAMAHA i sur., 2014.). Serumski C-reaktivni protein viši je u slučajevima bakterijskih plućnih bolesti nego u pasa s kroničnim bronhitisom (VIITANEN i sur., 2014.). Psi s kroničnim bronhitisom imaju tri puta veću količinu mRNA koja kodira MUC5AC (indikativno za ekspresiju gena mucina) u usporedbi sa zdravim psima (HAWKINS i sur., 2007.).

### **2.2.1.3. EOZINOFILNA BRONHOPNEUMOPATIJA**

Eozinofilna bronhopneumopatija pasa (EBP), koja se naziva i eozinofilna bolest pluća ili plućna infiltracija eozinofilima, jest idiopatska bolest pluća čija je značajka nakupljanje eozinofilnog upalnog infiltrata unutar sluznice bronha i pluća. Točna etiologija EBP-a je nejasna, a pretpostavlja se da je imunološki posredovana komponenta s obzirom na protutijela

razreda IgM, IgA i IgE pronađenih u bronhoalveolarnom ispirku pasa s tom bolešću. Smatra se da je priljev eozinofila u dišne puteve posredovan citokinima iz CD4+ T limfocita, što pokazuje da bi EBP mogao biti reakcija preosjetljivosti tipa I koju reguliraju pomoćnički T-limfociti tipa 2 (Th2-limfociti) (CLERCX i sur., 2002.). Uloga inhalacijskih alergena u EBP-u je nejasna, iako su gljivice, plijesni, lijekovi, bakterije i paraziti poznati su uzroci plućne preosjetljivosti u životinja. Mnogi pacijenti s EBP-om nemaju prepoznatljiv okidač. *Mycoplasma* spp., *Bordetella bronchiseptica* i *Aspergillus* spp. dokazuju se u sličnim postocima u pasa s EBP-om kao i onih s kroničnim bronhitisom ili u zdravim, kontrolnim, skupinama (CANNONE i sur., 2018.). Upala sluznice dišnih puteva dovodi do hipertrofije vrčastih stanica i povećane proizvodnje sluzi, zadebljanja sluznice, fibroze, hipertrofije glatkog mišićja dišnih puteva i prekomjernog nakupljanja sluzi. U napredovalim se stadijima mogu razviti bronhiektazije i opstrukcija malih dišnih puteva. Kao i u pacijenata koji imaju druge vrste kronične bolesti dišnih puteva, psi oboljeli od EBP-a imaju povećan rizik za razvijanje infekcija dišnih puteva (HEIKKILÄ i sur., 2013.).

Eozinofilna bronhopneumopatija jest bolest pasa svih dobnih skupina, a oboljeli se psi najčešće procjenjuju zbog progresivnih znakova u dišnom sustavu, kao što su kašalj, povećan napor i netolerancija aktivnosti. Sistemski znakovi kao što su anoreksija i gubitak tjelesne mase obično su blagi (HAWKINS, 2020.). Respiratorni distress česta je prezentacija, a oko pola zahvaćenih pasa ima i serozni do mukopurulentni iscjedak iz nosa (ETTINGER i sur., 2024.). Dišni šum nad plućima često je fiziološki normalan, iako se mogu čuti hropci i kreptacije te zvižduci pri izdisaju.

Anamneza i klinička slika upućuju na EBP. Periferna eozinofilija i bronhalni uzorak na rendgenogramu pluća dalje podupiru dijagnozu koja se postavlja nalazom eozinofila u bronhoalveolarnom ispirku. Kompjutorizirana tomografija može prikazati izraženo do umjereno zadebljanje stijenke bronha, začepljenje lumena bronha sadržajem, bronhiektazije, prisutnost plućnih nodula i limfadenopatiju. Tipičan makroskopski nalaz bronhoskopije uključuje prisutnost obilne žutozelene sluzi ili mukopurulentnog sadržaja. Sluznica može biti zažarena i imati nepravilnu ili polipoidnu površinom i, u nekim slučajevima, zatvaranje dišnog puta tijekom izdisaja. Eozinofilija krvi opisuje se u do 60 % slučajeva, a u uzorcima bronhoalveolarnih ispiraka udio eozinofila veći od 20 % snažno upućuje na EBP, iako u većine

pasa više od 50 % upalnih stanica kod ove bolesti čine eozinofili. Histopatologija bioptata pluća pokazuje eozinofilnu infiltraciju bronhalne sluznice.

Povišene razine prokolagena tipa III aminoterminalnog propeptida (PIIINP) u bronhoalveolarnim ispicima, proteina koji služi kao marker sinteze kolagena tipa III, dokazan je u pasa s EBP-om, vjerojatno zbog sekundarne fibroze. Važno je isključiti ostale moguće uzroke koji se povezuju s eozinofilnim tipom upale kao što su parazitske invazije, alergijske bolesti i neoplastične bolesti (CLERCX i PEETERS, 2007.; PEETERS, 2009.; JOHNSON i sur., 2019.; HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.)

#### **2.2.1.4. UPALA PLUĆA**

Upala pluća (lat. *pneumonia*) jest stanje koje rezultira nakupljanjem tekućine unutar alveola kao posljedica infekcije, ali i aspiracije (npr. želučanog sadržaja, hrane, kemikalija, tekućina) ili udisanja (npr. kemikalija, dima) stranog materijala ili čestica. Bronhopneumonija označava upalu pluća koja potječe iz dišnih puteva, a hematogena pneumonija nastaje krvožilnim širenjem uzročnika (BRETON 2012.; ETTINGER i sur., 2024.)

Bakterijska pneumonija obuhvaća širok spektar bolesti, od akutne do kronične, unilobarne ili multilobarne, klinički tihih do smrtonosnih infekcija. Bakterije se mogu udahnuti ili aspirirati u pluća (uključujući nozokomijalne infekcije), mogu doprijeti do pluća izravnim širenjem iz pleuralnog prostora i intratorakalnih struktura ili pak hematogenim putem. Većina bakterija koje uzrokuju upalu pluća sekundarni su patogeni i uzrokuju oportunističke infekcije (npr. nakon virusnih infekcija dišnog sustava, u imunosuprimiranih životinja, nakon aspiracije sadržaja).

Otpriblike trećina slučajeva upale pluća uzrokovana je s više vrsta bakterija, a u 20 % mogu biti i anaerobni patogeni. Bakterije koje se najčešće povezuju s pneumonijama uključuju streptokoke, crijevne patogene (npr. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.), *Pasteurella* spp., stafilokoke pozitivne na koagulazu, *Mycoplasma* spp. i *Bordetella bronchiseptica*. (PROULX i sur., 2014.; RHEINWALD i sur., 2015.; DEAR i sur., 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). Nije uobičajeno da zdravi odrasli psi razviju bakterijsku upalu pluća i, uz iznimku infekcija

uzrokovanih primarnim bakterijskim respiratornim patogenima poput *B. bronchisepticae*, većina životinja s bakterijskom upalom pluća na neki je način kompromitirana.

Dijagnoza bakterijske pneumonije trebala bi potaknuti kliničara na potragu za predisponirajućim uzrokom (ETTINGER i sur., 2024.). U jednom istraživanju od 93 psa s bakterijskom upalom pluća, 57 % pasa imalo je istodobno druge zdravstvene probleme (JAMESON i sur., 1995.). Stanja koja mogu predisponirati za bakterijsku upalu pluća uključuju istodobne virusne ili gljivične respiratorne infekcije; sistemsku imunosupresiju (zbog lijekova, infekcije, drugih bolesti); neoplazme; produljeno ležanje; traumu ili operaciju; teške metaboličke poremećaje (npr. uremija, dijabetička ketoacidoza); smanjen stupanj svijesti; nedostatak lokalne imunosti sluznice dišnog sustava (npr. primarna cilijarna diskinezija); opstrukciju dišnih puteva; anatomske poremećaje (npr. hipoplazija dušnika); regurgitaciju, povraćanje ili disfagiju; inhalirana strana tijela; prodorne rane prsnog koša; oštećenje respiratornog epitela zbog udisanja dima, kemikalija i utapanja (WÖHRER i sur., 2016.; DEAR, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.).

Za razliku od bakterijskih pneumonija, virusni uzročnici pretežito uzrokuju primarne infekcije i obično su kontagiozni. Virusni koji se povezuju s pneumonijama mogu ili primarno napadati respiratorni trakt (virus influence), dok drugi uzrokuju sistemske infekcije (virus štenećaka). Virusni i bakterijski patogeni često djeluju zajedno, prema jednom istraživanju na 20 pasa s bakterijskom upalom pluća, osam je imalo koinfekciju respiratornim virusom (VIITANEN i sur., 2015.). Najčešći virusi koji izazivaju upalu pluća u pasa jesu oni koji su dio kompleksa CIRDC: virus štenećaka, pseći adenovirus 2, pseći herpesvirus, pseći virus parainfluence, respiratorni koronavirus i virus influence pasa (ETTINGER i sur., 2024.).

Gljivične pneumonije uglavnom su enzooske i opisuju se većinom u SAD-u, Meksiku i državama Afrike, dok se u Europi najčešće opisuju respiratorne infekcije uzrokovane vrstama roda *Aspergillus* spp. te sporadično *Cryptococcus* spp. i *Histoplasma capsulatum* (DEAR, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). Molekularnim metodama otkrivena je i DNK *Pneumocystis carinii*, u tekućini bronhoalveolarnog ispiranja (BALF) 22/255 pasa (9 %) s respiratornim distresom i/ili kroničnim kašljem (DENESI i sur., 2022.). *Pneumocystis* je atipična gljivica koja obitava u plućnom parenhimu mnogih sisavaca, uključujući ljude i pse. Iako su mladi psi (mlađi od jedne godine) i čistokrvne pasmine češće bili pozitivni na *pneumocist real-time* PCR



od starijih pasa i križanaca, odrasli psi s drugim zaraznim stanjima i/ili poviješću bolesti pluća koja je rezistentna na terapiju, također mogu biti pozitivni na RT-PCR. Odsutnost patognomoničnih kliničkih ili radiografskih znakova onemogućuje jasno razlikovanje između klinički znatne infekcije i drugih procesa bolesti pluća/dišnih puteva koloniziranih *P. canis*. Moguće je da kolonizacija s *P. canis* može igrati određenu ulogu kao kopatogen u nekih pasa s bolestima donjih dišnih puteva (DENESI i sur., 2022.).

Protozoalna pneumonija neuobičajena je u pasa i mačaka. Patogeni koji se najčešće povezuju s takvim upalama pluća jesu *Neospora*, *Toxoplasma* i *Acanthamoeba* spp. (ETTINGER i sur., 2024.).

Nekoliko različitih parazita može uzrokovati upalu pluća u pasa. Pojedini crijevni paraziti, osobito *Toxocara canis*, mogu uzrokovati prolazne pneumonije u mladih životinja, obično mlađih od nekoliko mjeseci, dok ličinke migriraju kroz pluća. Invazija *Dirofilaria immitis* može rezultirati teškom pneumonijom zbog upale i tromboze. *Oslerus osleri* boravi na račvanju dušnika i glavnim bronhima pasa. Primarni plućni paraziti koji se najčešće dijagnosticiraju u pasa su *Capillaria (Eucoleus) aerophila*, *Paragonimus kellicotti* i *Crenosoma vulpis*. Invazija nastaje kao posljedica ingestije zaraznih oblika parazita, često posredstvom intermedijarnih ili parateničkih domaćina, koji povremeno migriraju u pluća pasa. Eozinofilni upalni odgovor se često pojavljuje kao posljedica invazije pluća, uzrokujući kliničke znakove kod nekih, ali ne u svih, infestiranih životinja. Konačna se dijagnoza provodi identifikacijom karakterističnih jajašca ili ličinki u uzorcima izmeta ili ispirku donjih dišnih puteva (HAWKINS, 2020.).

Aspiracijska pneumonija jest upala pluća koja nastaje zbog udisanja velikih količina krutog ili tekućeg materijala u pluća. Stanja koja predisponiraju pacijente za aspiracijsku upalu pluća uključuju sedaciju, mehaničku ventilaciju, ezofagealnu ili neuromuskularnu paralizu, bolesti jednjaka, povraćanje, bolest grkljana, neurološke poremećaje, prisilno hranjenje (npr. hranom, tekućinama, lijekovima) i prekomjernu proširenost želudca (HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). Sadržaj koji je obično povezan s aspiracijskom pneumonijom uključuje želučanu kiselinu, hranu i kontaminante orofarinksa (HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). Pasmine s povećanim rizikom za nastanak aspiracijske pneumonije uključuju brahicefalične pasmine, irskog vučjeg hrta, zlatnog retrievera, koker španijela i

engleskog springer španijela (HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). U jednom istraživanju na 41 brahicefaličnom psu s aspiracijskom pneumonijom, 66 % ih je imalo povijest gastrointestinalnih znakova, a 10 % imalo je povijest neuroloških bolesti (DARCY i sur., 2018.)

Dijagnoza upale pluća počinje prikupljanjem anamnestičkih podataka koji uključuju podatke o povraćanju, traumi ili nedavnoj općoj anesteziji te o boravku na mjestu s velikim brojem pasa (npr. hotel za pse). Od kliničkih znakova dominira anoreksija, letargija, nepodnošenje tjelesnog napora, gubitak tjelesne mase, ortopneja, dispneja, tahipneja, mukopurulentan iscjedak iz nosa i kašalj (koji može biti i produktivan). Pregledom se mogu čuti glasni dišni šumovi nad plućima, hropci i kreptacije, a u pojedinim se slučajevima mogu čuti i stišani dišni šumovi nad plućima. Ostali znakovi mogu upućivati na bolesti koje su u podlozi pneumonije (poput disfagije, bolesti larinksa, neuroloških deficita ili promjene stupnja svijesti). Laboratorijski pokazatelji dalje usmjeravaju prema dijagnozi pneumonije (neutrofilija sa skretanjem ulijevo ili bez skretanja ulijevo i povišeni C-reaktivni protein /CRP/). Dijagnoza se potvrđuje slikovnom dijagnostikom pluća, koja također može, ovisno o distribuciji lezija, uputiti i na uzrok pneumonije. Bakterijske pneumonije uzrokuju alveolarni uzorak s ventralnom distribucijom, prisutnošću lobarnog znaka i zračnih bronhograma. Kaudo-dorzalna distribucija češća je kod inhaliranih stranih tijela ili pri hematogenom širenju. Promjene mogu zahvatiti jedno ili više plućnih krila, a mogu se vidjeti i komplikacije ili druge bolesti koje su dovele do pneumonije (pneumotoraks, izljev u prsnu šupljinu, apscesi, mase po plućima, megaezofagus) (THRALL, 2013.; ETTINGER i sur., 2024.). Bronhoskopijom se mogu uočiti promjene sluznice dušnika i bronha poput hiperemije, velike količine eksudata (mukopurulentan do hemoragičan) i pojave nodula, a može se identificirati i uzrok penumonije (u slučaju stranog tijela) (HAWKINS, 2020; ETTINGER i sur., 2024.). Pulsna oksimetrija i analiza arterijskih plinova može pokazati hipoksemiju, koja je osobito česta u slučajevima aspiracijske pneumonije, gdje i do 79 % pasa može biti hipoksemično (KOGAN i sur., 2008.). Uzorci dobiveni BAL dalje mogu pomoći u dijagnostici, pa tako citološka pretraga može pomoći u identifikaciji uzroka pneumonije (u slučajevima bakterijske, parazitske ili gljivične pneumonije), a mikrobiološka pretraga može pomoći u pravilnom izboru antibiotika u slučaju primarnih ili sekundarnih infekcija (HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.).

### 2.2.2. NEOPLASTIČNE BOLESTI

Primarni tumori pluća i metastatski tumori mogu zahvatiti tkivo pluća. Većina je primarnih tumora pluća maligna, a prevladavaju karcinomi poput adenokarcinoma, bronhoalveolarnog karcinoma i karcinoma pločastog epitela. Sarkomi i benigni tumori pojavljuju se rjeđe. Karcinom malih stanica pluća, koji se često pojavljuje u ljudi, rijedak je u pasa. Pluća su učestalo mjesto metastaze malignih neoplazmi s drugih mjesta u tijelu, pa čak i iz primarnih tumora pluća. Multicentrični tumori, poput limfoma, histiocitnih neoplazmi ili mastocitoma, također mogu zahvatiti pluća. Jedna životinja može imati istodobno i nekoliko tumora podrijetlom od raznih stanica (HAWKINS, 2020.).

Primarni tumori pluća relativno su rijetki u pasa i dok je u ljudi glavni uzrok izloženost duhanskom dimu iz okoliša, u pasa je to i dalje nedokazani uzrok. U jednom su istraživanju psi s primarnim tumorima pluća imali veću količinu plućne antrakoze (crnog materijala unutar plućnih makrofaga koji upućuje na izloženost onečišćenom zraku) od pasa iz kontrolne skupine (BETTINI i sur., 2010.). Ista je radna skupina također opisala prekomjernu ekspresiju receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) u pasa s primarnim karcinomom pluća. Ekspresija EGFR-a bila je veća u pasa s antrakozom, što vjerojatno upućuje na to da je EGFR uključen u karcinogenezu povezanu s onečišćenjem zraka (SABATTINI i sur., 2014.). No istraživanje objavljeno 2018. godine nije uspjelo dokazati povezanost između izloženosti duhanskom dimu i primarnog karcinoma pluća u pasa (ZIERENBERG-RIPOLL i sur., 2018.).

Najčešći su primarni tumori u pasa bronhoalveolarni karcinom i adenokarcinom. Ostali primarni tumori uključuju karcinom pločastog epitela, anaplastični karcinom, osteosarkom, mastocitom i histiocitni sarkom. U istraživanju na 74 pasa s primarnim tumorima pluća 31 je imao adenokarcinom, a 19 bronhoalveolarni karcinom (BARRETT i sur., 2014.). Primarni tumori pluća dovode do lokalnih i/ili metastatskih učinaka. Lokalna bolest uzrokuje kompresiju normalnog plućnog parenhima, kao i invaziju alveola, krvnih žila i pleure. Može doći i do invazije drugih torakalnih struktura (npr. jednjaka, srca), pleuralnog izljeva i pneumotoraksa. Maligni primarni tumori pluća mogu metastazirati u preostale dijelove pluća, regionalne limfne čvorove i udaljena mjesta (RAUSCH, 2015.). Hipertrofična osteopatija, sindrom obilježen nastajanjem bolnih periostalnih bujanja i povezanim oteknućem mekih tkiva udova, može se pojaviti s primarnim i sekundarnim neoplazmama pluća (WITHERS i sur., 2015.).

Metastaze (sekundarne neoplazme) drugih tumora u pluća najčešći su tip plućne neoplazme koja se sreće u pasa. Metastaze se mogu pojaviti kao jedna lezija, nekoliko lezija ili kao višestruke lezije raspoređene difuzno po plućima. Pluća su posebno podložna metastazama zbog toga što primaju cjelokupan volumen krvi u tijelu, tako da se neoplazme koje se šire hematogeno često razvijaju u plućima. Kemokinski su receptori brojni u plućima i vežu se s ligandima izraženima na površini stanica tumora (SELTING, 2016.; ETTINGER i sur., 2024.). Svaki tumor može metastazirati u pluća, a oni u kojih postoji velika vjerojatnost za to uključuju hemangiosarkom, osteosarkom, oralni melanom i melanom ležišta nokta (engl. *nail bed carcinoma*), histiocitni sarkom, karcinom štitnjače i karcinom mliječne žlijezde (LAMB i sur., 2019.; ETTINGER i sur., 2024.).

Neoplazme se češće pojavljuju u starijih životinja, no mogu se pojaviti u životinja svih dobnih skupina. Tumori koji zahvaćaju pluća mogu proizvesti širok spektar kliničkih znakova koji su najčešće kronični i sporoprogresivni, ali se mogu i perakutno očitovati (npr. pneumotoraks ili krvarenja). Većina kliničkih znakova odražava zahvaćenost dišnih puteva. Infiltracija plućnog tkiva može uzrokovati smetnje u oksigenaciji, što dovodi do povećanog respiratornog napora i naprezanja te netolerancije tjelesne aktivnosti. Velike lezije mogu komprimirati dišne puteve, izazvati kašalj i ometati normalnu ventilaciju pluća. Erozijska krvnih žila može rezultirati plućnim krvarenjem. Edem pluća, neseptična upala ili bakterijska infekcija mogu se pojaviti kao sekundarna patološka stanja. U teškim slučajevima erozija dišnih puteva može rezultirati pneumotoraksom. Može doći do stvaranja pleuralnog izljeva koji je po svom sastavu najčešće modificirani transudat ili eksudat. Nespecifični sistemski znakovi uključuju gubitak tjelesne mase, sarkopeniju, anoreksiju, depresiju i vrućicu. Neke životinje s tumorima pluća nemaju kliničke znakove, a tumor se otkrije kao slučajaj nalaz (HAWKINS, 2020.).

Dijagnostika tumora pluća započinje anamnezom i kliničkom slikom (sporoprogresivni, kronični respiratorni znakovi u starije jedinke), i potvrđuje se slikovnom dijagnostikom. Rendgenografski nalaz najčešće prikazuje rijetke ili pojedinačne parenhimske mase. Primarni plućni tumori mogu uzrokovati lokalizirane lezije s efektom mase ili konsolidaciju cijelog režnja. Rubovi tumora često su jasni, ali mogu biti loše definirani zbog prisutne upale i edema. Metastatska ili multicentrična bolest rezultira stvaranjem difuznog retikularnog, nodularnog ili retikulonodularnog intersticijskog uzorka, pri čemu se nodularni

tumori najčešće identificiraju u kaudalnim režnjevima pluća. Noduli moraju biti veći od 5 mm da bi se mogli rendgenski detektirati (HAWKINS, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). Na CT-u primarni tumori pluća često su dobro ograničene, bronhocentrične mase s unutaršnjim zračnim bronhogramima, s vidljivim metastazama u trenutku snimanja u jedne četvrtine pacijenata. Dijagnoza se treba potvrditi citološkom pretragom uzoraka dobivenih biopsijom tkiva pod vodstvom CT-a ili ultrazvuka u slučaju solitarne mase ili, rjeđe, bronhoalveolarnim ispiranjem u slučaju difuzne bolesti. Osim postavljanja dijagnoze tumora, citološka pretraga može pomoći u određivanju tipa tumora i kriterija malignosti (MAYHEW i sur., 2013.). Uzorci dobiveni BAL-om pomažu dokazati ili isključiti neneoplastičnu bolest i rijetko pokazuju stanice s neoplastičnom morfologijom. Konačna se dijagnoza postavlja histopatološkom pretragom tumora dobivenog biopsijom ili uklanjanjem tumora *en masse* (DEBERRY i sur., 2002.; MARVEL i MONNET, 2013.).

### **2.2.3. NEUPALNE I NENEOPLASTIČNE BOLESTI**

#### **2.2.3.1. KOLAPS DUŠNIKA**

Kolaps dušnika (traheobronhomalacija) je učestala bolest u pasa gdje dolazi do suženja lumena dušnika zbog slabljenja trahealnih hrskavičnih prstenova. Etiopatogeneza je kompleksa i multifaktorijalna. Pojavljuje se dinamični mehanički kolaps koji može biti uzrokovan kombinacijom progresivne malacije trahealne hrskavice i opuštenosti trahealnog mišića, što prvenstveno rezultira dorzoventralnim kolapsom dušnika, a kasnije i bronha. Zaseban oblik ove bolesti pojavljuje se u statičnom obliku, gdje dorzoventralno suženje daje dušniku poprečni presjek u obliku slova W zbog malformacije trahealnih prstenova. Ovo stanje se naziva malformacija dušnika. To je statičniji oblik suženja trahealnog lumena koji se razlikuje od dinamičkog suženja uzrokovanog invaginacijom trahealnog mišića tijekom disanja ili se pojavljuje uz njega (WEISSE i sur., 2019.; ETTINGER i sur., 2024.).

Primarna abnormalnost hrskavice nastaje zbog intrinzične slabosti trahealnih prstenova, čije je omekšavanje posljedica smanjenja sadržaja glikozaminoglikana i hondroitin-sulfata, što dovodi do smanjene sposobnosti održavanja funkcionalne rigidnosti (DALLMAN i sur., 1988.). Potencijalni čimbenici koji pridonose bolesti su pretilost, kardiomegalija, udisanje

iritansa i alergena, paradontalna bolest, respiratorne infekcije i nedavna endotrahealna intubacija (DELLA MAGGIORE, 2020.). Dinamičke promjene mogu biti ograničene na vratni ili prsni dio dušnika. Iako mogu biti zahvaćena oba, često su promjene jače izražene na cervikotorakalnom prijelazu. Dorzoventralno sploštenje trahealnih hrskavičnih prstenova uzrokuje rastezanje dorzalne trahealne membrane, koja postaje upaljena i počinje visjeti. Stoga može prolabirati u lumen dušnika čim ekstraluminalni tlak premaši intraluminalni tlak, dodatno smanjujući promjer lumena dušnika (JOHNSON i POLLARD, 2010.). Unutar prsnog koša dorzalna membrana biva aspirirana, odnosno podvrgnuta negativnom intratorakalnom tlaku, tijekom inspirija i može pretjerano povećati lumen dušnika. Sindrom se pogoršava kašljem koji se pojavljuje kao klinički znak, a onda dodatno pogoršava ciklus kolapsa i upale. U pasa s kolapsom dušnika česta je istodobna bronhomalacija, koja nije povezana s upalom dišnih puteva, a često se pojavljuje i plućna hipertenzija (BOTTERO i sur., 2013.; JAFFEY i sur., 2019.)

Primarni kolaps dušnika obično se pojavljuje u minijaturnih i *toy* pasmina te malih pasmina pasa srednje do starije životne dobi. Najzastupljeniji su psi pasmina jorkširski terijer, pomeranski špic, mops, pudl, maltezer i čivava (ETTINGER i sur., 2024.).

Klinički znakovi uključuju kronični kašalj, blago do jako dahtanje, nepodnošenje tjelesne aktivnosti, različit stupanj respiratornog distresa, kao i različit stupanj cijanoze u uznapredovanim slučajevima. Kašalj se opisuje kao oštar, kao „truba / glasanje guske”, i može biti praćen terminalnim povraćanjem. Pojačava se aktivnošću, uzbuđenjem, pritiskom na dušniku ili pijenjem vode. Ovaj se specifičan kašalj može lako izazvati palpacijom dušnika (DOMINGUEZ-RUIZ i sur., 2021.; ETTINGER i sur., 2024.).

Dijagnostika kolapsa dušnika postavlja se na temelju nacionala, anamneze i kliničkog pregleda. Dodatne dijagnostičke pretrage (radiografija, fluoroskopija, ultrazvuk dušnika, ehokardiografija, bronhoskopija i BAL) mogu se primijeniti za utvrđivanje opsega i težine kolapsa dušnika te prisutnosti popratnih ili komplicirajućih bolesti kao što su bronhomalacija, plućna hipertenzija, kardiomegalija i druge bolesti donjih dišnih puteva. Radiografija u bočnoj projekciji preko torakalnog ulaza može pokazati kolabirani dušnik koji se vidi kao ovalni, oblik slova "C" ili oblik polumjeseca. Na bočnim rendgenskim snimkama redundantna dorzalna trahealna membrana koja invaginira u lumen dušnika može se vidjeti kao neprozirnost mekog

tkiva duž dorzalne strane kaudalnog cervikalnog lumena dušnika. Ovaj radiografski izgled može se vidjeti i u malih i u pasa velikih pasmina kao posljedica kašlja i treba se razlikovati od superponiranog jednjaka. Stoga su potrebne bočne radiografije tijekom maksimalne inspiratorne i maksimalne ekspiratorne faze dišnog ciklusa kako bi se prikazao dinamički kolaps. Kolaps cervikalnog trahealnog segmenta događa se u inspiriju zbog smanjenog tlaka unutar dušnika, dok torakalni dio ima tendenciju kolabiranja tijekom faze izdisaja kao posljedica povećanog intratorakalnog tlaka. Zbog povezanosti kolapsa s respiratornim ciklusom fluoroskopija može biti osjetljivija od nativne radiografije. Traheoskopija može otkriti smanjen dorzoventralni promjer zbog sploštenosti hrskavičnih prstenova s višećom dorzalnom membranom, što potencijalno dovodi do potpune opstrukcije lumena dušnika. Traheobronhoskopija se savjetuje u svim slučajevima budući da je vrlo korisna u određivanju stupnja ozbiljnosti kolapsa dušnika, a posebno bronha, kao i u procjeni popratne bolesti dišnih puteva, uključujući sekundarne infekcije (MACREADY i sur., 2007.; JOHNSON i sur., 2015.; ETTINGER i sur., 2024.).

Opisana su četiri stupnja kolapsa dušnika (JOHNSON i POLLARD, 2010.) koja se prosuđuju bronhoskopski:

- Stupanj I: trahealna membrana blago visi, hrskavica ima normalan oblik, a veličina lumena smanjena je za 25 % (slika 9).
- Stupanj II: trahealna membrana je proširena i viseća, hrskavica je djelomično sploštena, a veličina lumena smanjena za 50 % (slika 10).
- Stupanj III: trahealna membrana gotovo je u kontaktu s ventralnim dušnikom, hrskavica je gotovo ravna, a veličina lumena je smanjena za 75 %.
- Stupanj IV: trahealna membrana leži na dorzalnoj hrskavici, hrskavica je sploštena i može se okrenuti, a lumen je uglavnom zatvoren.



Slika 9. Kolaps dušnika prvog stupnja (autor: I. Šmit)



Slika 10. Kolaps dušnika trećeg stupnja i velika količina sluzi (autor: I. Šmit)

#### **2.2.3.2. BRONHIJEKTAZIJE**

Bronhiektazije su nenormalna i trajna dilatacija i distorzija bronha, koja je posljedica kronične upale dišnih puteva koja oštećuje elastične komponente bronha, što dovodi do destrukcije stijenke bronha i smanjenog uklanjanja respiratornih sekreta (BARKER, 2002.). Smatra se jedinstvenim entitetom bolesti iako nekoliko kongenitalnih ili stečenih stanja koja dovode do ciklusa kronične infekcije dišnih puteva i upale mogu rezultirati bronhiektatičnim promjenama. Žarišne (fokalne) bronhiektazije mogu biti posljedica aspiracije stranog tijela i/ili bronhijalne opstrukcije, dok se difuzne bronhiektazije često se pojavljuju nakon stečenih bolesti poput aspiracijskih ili inhalacijskih lezija, kroničnih bronhopneumonija, te se pojavljuje



u 60 % pasa sa EBP-om, a učestala su pojava i u pasa s kroničnim bronhitisom ili kod plućne fibroze (MESQUITA i sur., 2015.; ROELS i sur., 2017.). Zahvaćeni dišni putevi obično su djelomično začepljeni mukopurulentnim eksudatom zbog smanjene funkcije mukocilijarnog pokrivača, zbog čega se nakuplja sve veća količina sluzi, eksudata i mikroorganizama, a sekundarna infekcija pak stimulira daljnji upalni odgovor, stvarajući začarani krug daljnjeg oštećenja stijenke dišnih puteva i predispozicije za ponovne bronhopulmonalne infekcije (ETTINGER i sur., 2024.).

Bronhiektazije se češće pojavljuju u pasa starijih od sedam godina, s pasminskom predispozicijom (američki koker španijel, minijaturni pudl, sibirski haski i engleski špringer) (HAWKINS i sur., 2003.). Klinički znakovi odražavaju temeljnu bolest i općenito uključuju kašalj, tahipneju, dispneju i povremeno hipertermiju (ETTINGER i sur., 2024.). Bronhiektazije se mogu otkriti radiografijom, CT-om i bronhoskopijom (ETTINGER i sur., 2024.).

### **2.2.3.3. BRONHOMALACIJA**

Bronhomalacija, odnosno kolaps bronha, jest stanje koje se očituje slabošću stijenke glavnog ili manjih bronha, a dovodi do kolapsa stijenke bronha. U pasa se bronhomalacija često bilježi u starijih jedinki, a etiologija je ovog stanja nejasna (JOHNSON i POLLARD, 2010.; ETTINGER i sur., 2024.). Endoskopskom se pretragom bronhomalacija može klasificirati kao difuzna ili lokalizirana, te kao statička, dinamička ili kombinirana. Statička se bronhomalacija češće pojavljuje u brahicefaličnih pasmina pasa, a dinamička se često pojavljuje u kombinaciji s kolapsom dušnika pa se taj entitet naziva traheobronhomalacija (ADAMMA-MORAITOU i sur., 2012.). Iako se bronhomalacija nerijetko pojavljuje kao sekundarna posljedica upale bronha, upala i infekcija u mnogim se slučajevima ne mogu potvrditi (ADAMMA-MORAITOU i sur., 2012.; BOTTERO i sur., 2013.; ETTINGER i sur., 2024.).

Budući da je bronhomalacija često povezana s kolapsom dušnika, pretili, stariji psi manjih pasmina najčešće su zahvaćeni ovom bolešću, dok brahicefalične pasmine često obolijevaju od statičnog oblika bronhomalacije (ETTINGER i sur., 2024.). Klinički znakovi uključuju kronični kašalj (u velikoj većini slučajeva), često s izraženim znakovima opstrukcije dišnih puteva kao što su zviždanje, respiratorni distress i cijanoza vidljivih sluznica (ETTINGER i sur., 2024.).

Dijagnoza se najčešće postavlja bronhoskopijom, s obzirom na to da ona omogućuje prikaz dišnih puteva tijekom ciklusa disanja, stupanj kolapsa i zahvaćene segmente (ETTINGER i sur., 2024.). CT pretraga također može pomoći u dijagnostici, osobito ako podrazumijeva inspiratorno-ekspiratorne snimke, kako bi se bolje dokazala dinamička komponenta ovog stanja. Nativna radiografija manje je osjetljiva i specifična, ali se može kombinirati s floroskopijom kako bi se bolje dokumentirala bronhomalacija, osobito ako je dinamična (BOTTERO i sur., 2013.; DELLA MAGGIORE, 2020.; ETTINGER i sur., 2024.). Poseban je izazov određivanje značaja kolapsa, s obzirom na to da bronhi mogu fiziološki kolabirati u zdravih životinja, te se ističe i potreba za uvođenjem sustava za ocjenjivanje kolapsa bronha (OH i sur., 2019.; ETTINGER i sur., 2024.). Bronhoalveolarno ispiranje može pomoći isključiti infektivna/upalna stanja koja su eventualno dovela do kolapsa bronha, a zahtijevaju specifičnu terapiju. Analiza plina u krvi često potvrđuje slabiju sposobnost oksigenacije, s blagom hipoksemijom. Ehokardiografija se predlaže za dokazivanje plućne hipertenzije, koja se često detektira u pasa s bronhomalacijom, a zahtijeva specifičnu terapiju (ETTINGER i sur., 2024.).

#### **2.2.3.4. PRIMARNA CILIJARNA DISKINEZIJA**

Primarna cilijarna diskinezija (PCD), poznata i pod nazivom sindrom nepokretnih cilija, rijetka je bolest pasa koja je rezultat heterogene skupine nasljednih nedostataka koji uzrokuju poremećenu pokretljivost cilija, što klinički dovodi do čestih, rekurentnih, bakterijskih infekcija gornjih i donjih dišnih puteva. U pasa, kao i u ljudi, nekoordinirana i neučinkovita funkcija cilijarnog sustava rezultira neučinkovitim čišćenjem sluzi dišnih puteva. To rezultira kroničnim začepljenjem i upalnom dišnih puteva te na kraju i infekcijom (ETTINGER i sur., 2024.). Učestala je pojava u pasa koji boluju od PCD-a i *situs inversus* (promjena lijevo-desne simetrije tijela) i transpozicija torakalnih i/ili trbušnih organa, što se pojavljuje u 50 % slučajeva (IBANEZ-TALLON i sur., 2003.). PCD je genetska bolest zabilježena u brojnim pasmina pasa i obično se nasljeđuje autosomno-recesivno. Mutacija je za sada identificirana u staroengleskih ovčara i malamuta (MERVEILLE i sur., 2014.; ANDEREGG i sur., 2019.).

Klinički znakovi uključuju kronične respiratorne znakove kao što su rinosinitis, bronhitis, bronhopneumoniju i bronhiektazije. Iako su znakovi u dišnom sustavu najčešći, klinička slika može odražavati disfunkcionalni trepetljikasti epitel ili mikrotubule i u drugim tkivima, pa su moguća i klinička očitovanja u obliku *otitis media*, neplodnosti, astenoteratospermije u mužjaka, hidrocefalusa, fibroze bubrega ili dilatacije bubrežnih tubula (ETTINGER i sur., 2024.). Često, pojava respiratornih znakova u mladim, čistokrvnih, cijepljenih pasa budi sumnju na PCD, međutim neki psi počinju pokazivati znakove tek u dobi od nekoliko godina.

Potvrda dijagnoze PCD-a zahtijeva *in vivo* i *in vitro* funkcionalnu i ultrastrukturnu analizu cilija. No nalaz specifičnih kliničkih znakova u mladim pasa, u kombinaciji sa *situs inversus*, jako je sugestivan za PCD, a pomoć u dijagnostici pružaju i drugi testovi koji upućuju na mikrotubularne defekte, poput analize sperme (ETTINGER i sur., 2024.).

#### **2.2.3.5. IDIOPATSKA PLUĆNA FIBROZA**

Idiopatska plućna fibroza (IPF) kronična je, progresivna, plućna bolest koja se očituje fibrozom plućnog intersticija. Točna etiologija je nepoznata, a pretpostavlja se da u etiopatogenezi ulogu imaju genetski i okolišni čimbenici (PIRAS i sur., 2020.). Ova se bolest osobito često pojavljuje u pasmine zapadnoškotski bijeli terijer, a povremeno je zabilježena i u drugih terijerskih pasmina. Tipično su pogođeni stariji psi, s prosječnom dobi pri dijagnozi od devet godina, a spolna predispozicija za sada nije utvrđena (HEIKILLÄ i sur., 2011.). Može nastati sekundarno na ozljedu koja oštećuje alveolarni epitel, a koja je praćena neispravnim procesima zacjeljivanja (HEIKILLÄ i sur., 2011.). Što bolest više napreduje, dolazi do jačeg oštećenja i promjene postaju ireverzibilne. Fibroza dovodi do povećane gustoće intersticijskog plućnog tkiva te sekundarne mineralizacije plućnog parenhima. Izmjena plinova kroz alveolarne stijenke je smanjena, a može doći i do hiperplazije glatkih mišića, metaplazije epitela i hiperplazije pneumocita tipa II (HEIKILLÄ-LAURILA i sur., 2014.).

Psi s IPF-om obično razvijaju sporoprogresivne respiratorne znakove tijekom mjeseci i često bivaju dovedeni veterinaru zbog akutne egzacerbacije bolesti ili brze progresije kliničkih znakova. Uobičajene abnormalnosti uključuju dispneju, nepodnošenje tjelesnog

napora, kašalj, letargiju, dahtanje, tahipneju i gubitak apetita, a povremeno se mogu pojaviti i sinkope. Cijanoza vidljivih sluznica čest je nalaz u poodmaklim stadijima bolesti (HEIKKILÄ i sur., 2011.). Prilikom kliničkog pregleda klasičan je nalaz obostranih patoloških dišnih šumova koje zvuče poput "pucketanja čička". Može se primijetiti povećan inspiratorni ili povećan mješoviti inspiratorno-ekspiratorni napor. Prilikom pregleda mogu se uočiti i gubitak tjelesne mase, dehidracija, cijanoza sluznica, srčani šum, tahikardija ili bradikardija (HEIKKILÄ i sur., 2011.).

Neinvazivna (npr. laboratorijske pretrage krvi) i minimalnoinvazivna dijagnostika (npr. bronhoskopija s bronhoalveolarnim ispiranjem) korisne su za isključivanje drugih uzroka respiratornih bolesti, ali nisu dovoljni da potvrde IPF. Slikovna dijagnostika dalje potvrđuje sumnju, ali također ne može potvrditi plućnu fibrozu. Tipičan je nalaz bronhointersticijskog uzorka i povećanje desne strane srca. Odsutnost alveolarnog uzorka u psa s glasnim kreptacijama pri auskultaciji može upućivati na plućnu fibrozu. Karakteristični nalazi torakalnog CT-a u ljudi s ovom bolesti omogućuju dijagnosticiranje IPF bez biopsije pluća, ali u pasa nije dovoljno specifičan. U daljnjoj se dijagnostici savjetuje ehokardiografija kako bi se isključila primarna bolest srca i kako bi se procijenila prisutnost plućne hipertenzije, česte komplikacije IPF-a koja se može liječiti. Za potvrdu fibroze nužna je histopatološka pretraga plućnog tkiva (ETTINGER i sur., 2024.).

#### **2.2.3.6. PLUĆNA TROMBOEMBOLIJA**

Plućna tromboembolija (PTE) skupni je naziv za stanja kod kojih dolazi do opstrukcije plućnog arterijskog sustava lokalno formiranim trombom (primarni plućni tromb) ili trombom nastalim negdje drugdje u krvožilnom sustavu koji se translocira u plućni arterijski sustav (plućna embolija). Nakon okluzije plućne vaskulature humoralni čimbenici i alveolarna hipoksija induciraju refleksnu vazokonstrikciju koja povećava plućni vaskularni otpor, nakon čega se razvija plućna arterijska hipertenzija i opterećenje desne klijetke. S progresivnom plućnom arterijskom hipertenzijom naknadno se razvija i desnostrano zastočno zatajivanje srca (ETTINGER i sur., 2024.).

Virchowova trijada tromboze navodi da su uvjeti koji pogoduju stvaranju tromba izloženost subendotelnom kolagenu (tj. oštećenje vaskularnog endotela), hiperkoagulabilnost i abnormalni protok krvi (tj. zastoj krvi). Trombi u plućnim arterijama dovode do abnormalnosti ventilacije i perfuzije, hipoksije, tahipneje, hipokapnije, refleksne plućne arterijske vazokonstrikcije i bronhokonstrikcije. Moguća mjesta nastanka tromba uključuju desni atrij, šuplju venu, jugularne vene, femoralnu venu i mezenterijalne vene (HAWKINS, 2020.). Brojni poremećaji predisponiraju za PTE, a u većine pasa istodobno je prisutno i više od jednog poremećaja. Stanja koja se dovode u vezu s PTE-om su srčana dirofilarijaza, neoplazme (osobito adenokarcinomi), hiperadrenokorticism, egzogena primjena steroida, nefropatija s gubitkom proteina, enteropatija s gubitkom proteina, imunosno posredovana hemolitička anemija, diseminirana intravaskularna koagulopatija, sepsa, sistemski upalni sindromi (npr. pankreatitis, vaskulitis), traume, kirurški zahvati i bolesti srca (JOHNSON i sur., 1999.).

Klinički znakovi variraju ovisno o primarnoj bolesti koja je dovela do PTE-a. Znakovi povezani s PTE-om uključuju (per)akutni nastanak dispneje, tahipneje, anoreksije, letargije, cijanoze sluznica, sinkope, kolapsa, kašalja, hemoptize, jugularne distenzije i iznenadne smrti. Prilikom kliničkog pregleda mogu se auskultirati kreptacije ili oštri dišni šumovi nad plućima, dok neki pacijenti imaju prigušene srčane i plućne tonove ako je prisutan pleuralni izljev (HAWKINS, 2020., ETTINGER i sur., 2024.). JOHNSON i suradnici (1999). ukazali su da je oko 40 % pasa s PTE-om imalo i neurološke deficite. Dijagnosticiranje PTE-a u praksi vrlo je izazovno. Kombinacija perakutnih i teških kliničkih znakova i nalaza kliničkog pregleda u pasa s predisponirajućim čimbenicima može pobuditi sumnju na PTE. U veterinarskoj medicini mnogi se pacijenti terapiraju za PTE na temelju odgovarajuće anamneze i kliničkih znakova a da se ne dokaže prisutnost ugruška u plućnoj vaskulaturi (ETTINGER i sur., 2024.).

Početna dijagnostika često uključuje analizu arterijskih plinova, radiografiju prsne šupljine, ultrazvučnu dijagnostiku prsne šupljine i pluća i ehokardiografiju. Analiza arterijskih plinova općenito upućuje na hipoksemiju, hipokapniju i povećanje gradijenta A-a. Radiografske promjene koje se mogu zamijetiti uključuju žarišne ili difuzne intersticijske i/ili alveolarne infiltrate, nejednak promjer krvnih žila, pleuralni izljev i povećanje desne strane srca, ali većina pacijenata s PTE-om imaju uredan nalaz torakalne radiografije. Ultrazvukom pluća može se prikazati konsolidacija plućnog parenhima (HAWKINS, 2020.). Ehokardiografijom se rijetko može prikazati tromb, ali se mogu isključiti druge bolesti poput

kardiomiopatije, endokarditisa i tamponade srca (MORITA i sur., 2019.). Osnovni profili koagulacije imaju minimalnu dijagnostičku važnost zbog niske osjetljivosti i specifičnosti za PTE. Koncentracija antitrombina < 60 % povezana je s umjerenim rizikom od tromboze, dok je razina < 30 % povezana s visokim rizikom u jednom istraživanju na psima (KUZI i sur., 2024.). Tromboelastografija i tromboelastometrija mogu se primijeniti za ukupnu procjenu hiperkoagulabilnosti, ali je specifičnost za dijagnozu PTE-a niska. D-dimeri su markeri fibrinolize i jako visoke koncentracije D-dimera mogu upućivati na PTE, iako povišene koncentracije D-dimera nisu specifične za PTE, budući da povećane razine mogu biti povezane i s drugim bolestima kod kojih dolazi do fibrinolize (EPSTEIN i sur., 2014.). Nasuprot tome, normalni D-dimeri imaju visoku negativnu prediktivnu vrijednost, te normalna razina D-dimera načelno isključuje PTE kao moguću dijagnozu (EPSTEIN i sur., 2014.). Napredna slikovna dijagnostika u obliku CT-a s plućnom angiografijom trenutačno je dijagnostički zlatni standard za PTE (GOGGS i sur., 2014.).

### **2.3. PROTEOMIKA**

Proteomika je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem proteoma, proteinskog sastava stanice, tkiva, organa i izlučevina organizma, interakcija, funkcije, sastava i strukture proteina i njihovih aktivnosti unutar stanica (NORMAN i sur., 2018.). Proteomika omogućuje bolje razumijevanje strukture i funkcije organizma od genomike zbog toga što proučava ekspresiju proteina, koja se mijenja kroz vrijeme i ovisno o uvjetima okoliša (AL-AMRANI i sur., 2021.).

Genom se sastoji od fiksnog broja gena koji kodiraju proteine i ostaje uglavnom nepromijenjen tijekom života. Stoga proučavanje DNK sekvenci i sekvenci glasničke ribonukleinske kiseline (mRNK) ne uzima u obzir promjenjiv utjecaj okoliša. Istraživanja nukleinskih kiselina daju podatke o potencijalu za organsku i staničnu patobiologiju te o riziku nastanka bolesti (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING, 2001). Struktura i funkcija proteina konstantno se mijenjaju unutar dinamičkih fizioloških, ali i patoloških sustava, što se događa zbog posttranslacijskih modifikacija, interakcija među proteinima, promjenama njihovih položaja u stanici te kao posljedica sinteze i razgradnje tijekom bioloških procesa (NORMAN i sur., 2018.). Cilj proteomike, stoga, nije isključivo identificirati sve proteine stanice ili tkiva nego i prikazati njihovu međusobnu povezanost. Osnovna razlika između

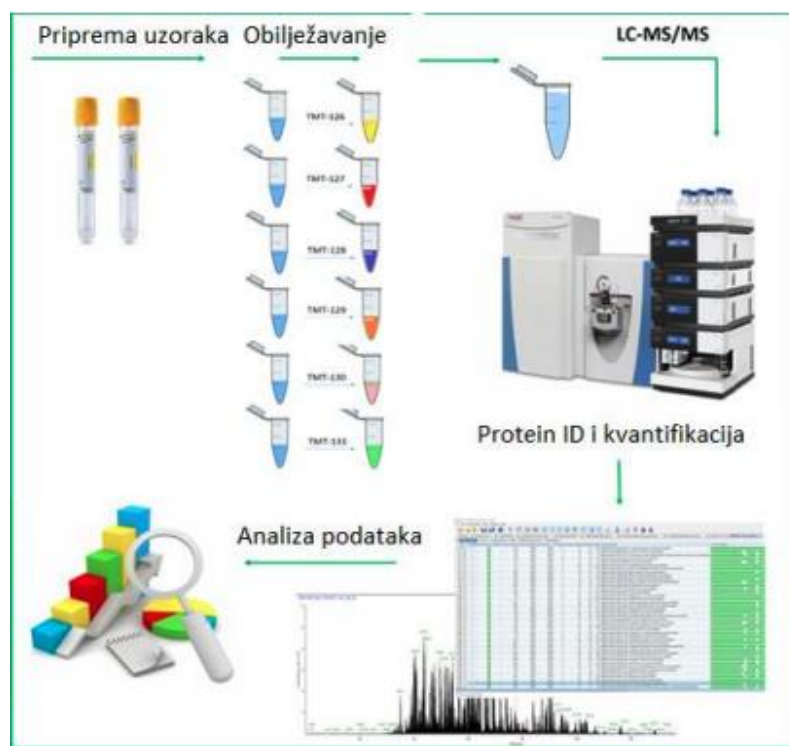
proteomike i molekularnih metoda u tome je što se proteomika temelji na globalnoj analizi svih proteina odjednom, što je nužno za adekvatno razumijevanje funkcioniranja bioloških sustava, s obzirom na broj i složenost te međudjelovanje proteina (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.). Dišni sustav, a osobito pluća, složeno su polje istraživanja proteomike, s obzirom na urođeni i stečeni imunski sustav, izvanstanični matriks/intersticij pluća, rezidentne i regrutirane leukocite te epitelni pokrov koji su stalno izloženi vanjskom okruženju (NORMAN i sur., 2018.).

Povijesno gledano, tehnologije dostupne za kvantificiranje proteina u biološkim matricama bile su ograničene i skupe, ali je nedavno postignut znatan napredak u ovom području. Ljudski proteom provizorno je mapiran primjenu integrativnog omičkog pristupa (transkriptomika i tehnike temeljene na antitijelima) i velik je korak naprijed za proteomska istraživanja (UHLEN i sur., 2015.).

Jedan od glavnih fokusa dosadašnjih proteomskih istraživanja jest identifikacija adekvatnih biomarkera bolesti i ciljeva za intervenciju. Proteomika ima najveći potencijal od cijelog polja "omike" za pružanje novih znanja o patogenezi bolesti, određivanja pouzdanih biomarkera i olakšavanje otkrivanja novih terapijskih strategija za bolesti ljudi i životinja (TAMBOR i sur., 2010.).

Tehnike koje se najčešće primjenjuju u proteomici su spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) i tehnike koje se temelje na aptamerima. Osobito je važna MS, čiji je napredak u posljednjem desetljeću poboljšao mogućnosti preciznog mjerenja tisuće proteina u biološkim uzorcima. Spektrometrija masa jest analitička metoda koja pruža informacije o masi peptida ili o njihovim fragmentima na temelju omjera mase i naboja iona (engl. *mass-to-charge ratio*,  $m/z$ ) (GRAVES i HAYSTEAD, 2002.). Postupak započinje frakcioniranjem, koje se može postići na temelju svojstava naboja, izoelektrične točke ili hidrofobnosti peptida, a obično se postiže primjenom gel elektroforeze, kromatografije ili izoelektričnog fokusiranja (MALLICK i KUSTER., 2010.). Zatim se reducirani uzorci podvrgavaju tekućinskoj kromatografiji (engl. *liquid chromatography*, LC) za daljnje odvajanje i redukciju uzorka. MS je sljedeći ključan analitički korak jer se prikupljene informacije zatim koriste za identifikaciju različitih proteina. Budući da MS mjeri  $m/z$  u plinovitoj fazi, peptidi se moraju prevesti u plinovitu fazu i potom ionizirati. Jednom ionizirani, ioni prekursora peptida dostavljaju se

spektrometru masa gdje se mjeri  $m/z$  omjer. Pojedinačni prekursorski ioni tada se odabiru i podvrgavaju tandemskom MS-u da bi se stvorili specifični fragmenti iona. Ova kombinacija omjera prekursora  $m/z$  i njegovih fragmenata iona zatim se uspoređuje s poznatim peptidnim sekvencijama iz odabranih baza podataka proteina kako bi se proteini identifikirali. Postoji više tehnologija i metoda za frakcioniranje peptida, obogaćivanje, ionizaciju i vrste spektrometara mase koji su komercijalno dostupni (MALLICK i KUSTER., 2010.; NORMAN i sur., 2018.). Osnovni metodološki prikaz proteomske analize prikazan je na slici 11.



Slika 11. Hodogram proteomskog istraživanja (autor: J. Kuleš).

Novе proteomske eksperimentalne tehnologije generiraju velike količine podataka, ali veliki izazov leži u analizi tih podataka kako bi se identificirala važnost proteina u biološkim procesima. Polja bioinformatike, računalne biologije i sistemske biologije razvila su tehnike za olakšavanje analize i interpretacije „omičkih” podataka (BENEDICT i LAUFFENBURGER, 2013.). S obzirom na to da dobiveni podatci mogu biti više ili manje iskoristivi, pogotovo u veterinarskoj medicini (obzirom na velik broj životinjskih vrsta) predlaže se konvertiranje rezultata prema vrsti koja je već korištena kao model i za koju su podatci već poznati, u slučaju da se proteomsko istraživanje radi na životinjskoj vrsti za koju nije generirana baza podataka gena i proteina (za što se obično primjenjuje program BLAST) (NORMAN i sur., 2018.; ŠIMONJI, 2023.).



### 2.3.1. PROTEOMIKA U HUMANOJ I VETERINARSKOJ MEDICINI

Proteomika je metoda koja se sve češće primjenjuje u humanoj medicini za utvrđivanje potencijalnih bioloških biljega bolesti donjih dišnih puteva poput astme, kronične opstruktivne bolesti pluća, tumora pluća idiopatske plućne fibroze i upale pluća (NORMAN i sur., 2018.; REZAEYYAN i sur., 2023.). Novi proteini identificirani proteomikom mogu biti korišteni u ranoj dijagnostici, praćenju i liječenju pacijenata. Identificiranje proteinskih biljega u bolesti donjih dišnih puteva može biti prikladno rješenje za osmišljavanje ciljane terapije i preventivnih strategija za pacijente s tim bolestima (NORMAN i sur., 2018.). Analiza proteomskih podataka daje liste gena koji se mogu povezati s molekularnim i biološkim putevima te funkcionalnim kategorijama kao što je genska ontologija. Genska ontologija (GO) ujedinjena je bioinformatička inicijativa sa svrhom ujedinjenja gena i produkta gena za sve životinjske i biljne vrste, što bi trebalo dovesti do nastanka kontroliranog rječnika, ujedinjenja velike količine podataka i omogućiti alate jednostavnog korištenja tih podataka (THE GENE CONSORTIUM, 2008.). Ontologija predstavlja koncept formalnog imenovanja, definiranja, klasifikacije i određivanja odnosa među konceptima, podacima i entitetima, pa se tako genska ontologija, koja služi za katalogizaciju određenog gena, dijeli u daljnje tri ontologije koje predstavljaju različite biološke aspekte: molekularna funkcija (engl. *molecular function*, MF), biološki proces (engl. *biological proces*, BP) i stanična komponenta (engl. *cellular component*, CC). Analiza bioloških puteva povezanih s proteomom sustavno povezuje proteine s molekularnim funkcijama te je prvi izbor za dobivanje uvida u temeljne međudnose identificiranih proteina. Baze poput Reactomea i KEGG-a služe kao arhiva opisa bioloških procesa, ali i alati za otkrivanje novih funkcionalnih odnosa u istraživanim proteomskim podacima (GILLESPIE i sur., 2021.).

Uloga proteomike u veterinarskoj medicini i zdravlju životinja polje je koje doživljava brzu evoluciju u posljednje vrijeme i nudi mogućnost relevantnih otkrića koja se mogu primijeniti na kućne ljubimce i domaće životinje (KAJIN i sur., 2024.). Većina se proteomskih istraživanja iz tog područja koristi za napredak dijagnostike bolesti, komparativne medicine, farmakologije, prehrane, reproduktivne biologije, stočarske proizvodnje i patologije (BILIĆ i sur., 2018.). No u veterinarskoj medicini za sada postoji tek nekoliko istraživanja koja opisuju primjenu proteomske analize u identifikaciji proteina koji bi se mogli koristiti kao biološki

biljezi bolesti donjih dišnih puteva. LILJA-MAULA i suradnici (2013) učinili su proteomsku analizu uzoraka bronhoalveolarnih ispiraka zapadnoškotskih terijera s idiopatskom plućnom fibrozom, pasa s kroničnim bronhitisom i zdravih pasa i uočili ekspresiju šest proteina i supresiju jednog proteina. Ekspresija  $\beta$ -aktina, C3 komponente komplementa,  $\alpha$ -1-antitripsina, apolipoproteina A-1, haptoglobina i transketolaze bila je povećana, a ekspresija lizozima C smanjena (LILJA-MAULA i sur., 2013.). U tom je istraživanju usporedbom proteoma uočeno da postoje slične promjene u pasa oboljelih od plućne fibroze i bronhitisa, ali nije utvrđen specifičan biološki biljeg za plućnu fibrozu. MAHER i suradnici (2022.) objavili su rezultate kvantitativne analize proteoma uzoraka bronhoalveolarnih ispiraka zapadnoškotskih terijera oboljelih od idiopatske plućne fibroze i zdravih pasa. Ponovno je zabilježena ekspresija brojnih proteina u pasa oboljelih od plućne fibroze, koji su posljedica upalnih i fibrotičnih procesa koji zahvaćaju pluća takvih pacijenata.

### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Bolesti donjih dišnih puteva česte su u pasa, a klinički se očituju od blagog kašlja i smanjenog podnošenja tjelesnog napora pa sve do životno ugrožavajuće dispneje. Dijagnostički algoritmi kod takvih bolesti često su dugotrajni i podrazumijevaju primjenu mnogobrojnih dijagnostičkih metoda od kojih neke zahtijevaju sedaciju ili opću anesteziju. Pretragom dostupne literature uočava se nedostatak manje invazivnih metoda dijagnostike, poput bioloških biljega koji bi se mogli dokazati u lakše dostupnim uzorcima poput sline ili seruma.

Proteomika je nova metoda koja omogućuje analizu cjelokupnog skupa proteina u biološkom uzorku i identifikaciju potencijalnih bioloških biljega. Ona nudi mogućnost novih spoznaja o biologiji i patologiji domaćih životinja, a može se koristiti i kao značajan dio translacijske medicine u istraživanjima bitnima za humanu medicinu (BILIĆ i sur., 2018, TURK i sur., 2021, REŠETAR MASLOV i sur., 2023). Primjena proteomike u proučavanju bolesti pasa te analize patofizioloških procesa i bioloških biljega posljednjih godina progresivno raste (CECILIANI i sur., 2013).

Pretragom literature nisu pronađeni potencijalni biološki biljezi koji se koriste za dijagnostiku ili praćenje neoplastičnih bolesti donjih dišnih puteva, a značajno je navesti i problematiku dijagnostike CIRDC. Iako je kliničkim pregledom nemoguće nedvojbeno utvrditi točnu etiološku dijagnozu, virusni i bakterijski uzročnici mogu rezultirati blagom samoograničavajućom bolesti ili dovesti do uginuća (DAY i sur., 2020.). Kao i u slučaju neoplastičnih bolesti, u literaturi se ne opisuju specifični biološki biljezi koji bi olakšali dijagnozu i omogućili pravovremenu etiološku terapiju.

Ciljevi predloženog istraživanja su:

1. Odrediti učestalost i kliničko očitovanje najčešćih bolesti donjih dišnih puteva u pasa zaprimljenih u Sveučilišnu veterinarsku bolnicu Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2. Odrediti pretežitost zaraznog kašalja pasa u populaciji pasa s bolestima donjih dišnih puteva

3. Provesti proteomsku analizu na uzorcima bronhoalveolarnih ispiraka, seruma i sline pasa s bolestima donjih dišnih puteva i identificirati biološke biljege koji će olakšati utvrđivanje dijagnoze i prognoze bolesti donjih dišnih puteva pasa

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Ekspresija proteina različita je u bronhoalveolarnim ispercima, serumu i slini pasa oboljelih od bolesti donjih dišnih puteva u odnosu na pse bez bolesti donjih dišnih puteva
2. Ekspresija proteina u navedenim uzorcima razlikuje se ovisno o samoj bolesti, te novi biološki biljezi omogućuju razvoj manje invazivnih dijagnostičkih protokola

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1. ODOBRENJE**

Ovo je istraživanje odobreno odlukom Fakultetsko vijeća Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na temelju članka 40. Statuta Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu, na 10. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća u akademskoj godini 2021./2022. održanoj dana 18. svibnja 2022. godine (klasa: 640-01/22- 17/51; ur. br.: 251-61-20/623-22-01). Svi provedeni postupci na životinjama bili su u skladu sa smjernicama iz Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

### **4.2. UZORCI**

U istraživanju su korišteni uzorci i prikupljeni podaci o psima u vlasništvu fizičkih osoba, zaprimljenih zbog rutinske dijagnostike bolesti dišnih puteva na Kliniku za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u periodu od 1. 6. 2022 do 1. 1. 2024. U istraživanju su korišteni uzorci pasa neovisno o pasmini, dobi i spolu.

### **4.3. PODATCI KLINIČKE OBRADJE**

Podaci o habitusu, anamnezi i kliničkom pregledu dobiveni su pretraživanjem Vef.Protokol baze podataka.

Psi su isključeni iz ovog istraživanja ako su imali:

- (1) nepotpune anamnestičke podatke
- (2) nepotpune rezultate dijagnostičkih pretraga
- (3) nepotpune podatke o započetoj terapiji
- (4) kardiogeni edem pluća

Iz anamnestičkih podataka i habitusa bilježeni su podaci o spolu i kastracijskom statusu pasa, pasmini, dobi pri pojavi kliničkih znakova donjih dišnih puteva (u godinama), trajanje bolesti (u tjednima), pojavi i tijeku kašlja, kvaliteti kašlja (suh ili produktivan), prisutnosti

dispneje, smanjenom apetitu, te podaci o eventualnom prethodnom liječenju antibioticima ili glukokortikoidima u prethodna četiri tjedna i eventualni klinički znakovi drugih organskih sustava (dermatološki, gastrointestinalni ili neurološki znakovi). Akutni kašalj definiran je kao akutan ako je trajao kraće od dva mjeseca, odnosno kroničan ako je trajao dulje od dva mjeseca (HSIEH i BEETS 2019.).

Iz podataka o kliničkom pregledu bilježili su se podaci o gojnom stanju životinje trijasu, prisutnost iscjetka iz nosa ili očiju, kvalitetama dišnog šuma auskultiranom stetoskopom nad oba plućna polja te prisutnost eventualnih patoloških zvukova nad plućima i eventualna prisutnost desnostranog patološkog šuma nad srcem.

Gojno stanje životinje bilo je izraženo kao procjena tjelesne kondicije (*body condition score*, BCS) (CHUN i sur., 2019.). Rektalna temperatura u Celzijevim stupnjevima smatrana je fiziološkom u rasponu 38 – 39,2 °C, a frekvencija bila u rasponu 60 – 180/min i disanja 20 – 30 udisaja/min. Kvaliteta dišnog šuma opisivana je kao fiziološki, pooštren jednostrano, pooštren obostrano, stišan, a patološki zvukovi kao hropci, krepitacije i zvižduci. Patološki šum nad srcem je opisan prema prethodno utvrđenim kriterijima (ENGLAR, 2017.; ENGLAR, 2019a i b.; ETTINGER i sur., 2024.).

#### **4.4. PODACI O NALAZIMA LABORATORIJSKIH PRETRAGA**

Bilježeni su podaci iz nalaza laboratorijskih pretraga korištenih u svrhu rutinske obrade pacijenata s bolestima donjih dišnih puteva. Svim psima u ovome istraživanju vađena je krv venepunkcijom *venae cephalicae antebrachi* ili *venae saphenae lateralis*. Krv za kompletnu krvnu sliku uzeta je u epruvetu s etilen-diamino-tetraoctenom kiselinom (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) kao antikoagulansom i u serumsku epruvetu s gelom bez aditiva za biokemijske pretrage. Kompletna krvna slika rađena je na hematološkom brojaču Animal Blood Counter (Horiba ABX Diagnostis, Montpellier, Francuska) uz diferencijalnu krvnu sliku (krvni razmaz bojen May-Grunwald-Giemsa bojenjem). Diferencijalna krvna slika dobivena je brojenjem udjela segmentiranih i nesegmentiranih granulocita, limfocita i monocita na ukupno 100 leukocita te izražena kao postotak i u apsolutnim brojevima. Bilježeni su rezultati CRP) izraženom u mg/L (Abbott Architect c4000, Green Oaks, Sjedinjene Američke Države).

Bilježili su se rezultati slikovne dijagnostike (RTG i/ili CT) prsne šupljine provedene na Zavodu za rendgenologiju, ultrazvučnu dijagnostiku i fizikalnu terapiju, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Bilježili su se rezultati koprološke pretrage i prisutnost razvojnih stadija oblića povezivanih s respiratornim invazijama u pasa: *Angiostrongylus vasorum* i *Crenosoma vulpis*.

#### **4.5. DIJAGNOSTIKA KARDIOPULMONALNE DIROFILARIJAZE I ANGIOSTRONGILOZE**

Bilježeni su rezultati IDEXX Snap<sup>®</sup> 4Dx Plus (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Sjedinjene Američke Države) testa i modificiranog Knottova testa.

IDEXX Snap<sup>®</sup> 4Dx Plus test je brzi (engl. *point-of-care*) test koji služi za dokazivanje protutijela na *Anaplasma phagocytophilum*/*Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*/*Ehrlichia ewingii* te antigena *Dirofilaria immitis* u uzorcima plazme, seruma ili nekoagulirane pune krvi. Pretraga se provodila prema uputama proizvođača.

Modificirani Knottov test proveden je na Zavodu za veterinarsku parazitologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu iz uzoraka pune krvi. Jedan mililitar venske krvi pomiješan je s devet mililitara 2 %-tnog formalina i centrifugiran pri 1500 g. Supernatant je kasnije odliven, a sedimentu je dodano metilensko modrilo u omjeru 1:1000, te je sediment pregledavan pod mikroskopom. Vrsta *Dirofilaria* sp. utvrđena je na temelju duljine tijela pronađenih mikrofilarija.

Za dijagnostiku pseće angiostrongiloze korišten je IDEXX Angio Detect Test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Sjedinjene Američke Države) brzi test, prema uputama proizvođača. Test služi za otkrivanje antigena *Angiostrongylus vasorum* iz uzoraka psećeg seruma.

#### 4.6. BRONHOSKOPIJA I BRONHOALVEOLARNO ISPIRANJE

Bronhoskopija i bronhoalveolarno ispiranje bili su provedeni u sklopu uobičajene obrade pacijenata s bolestima donjih dišnih puteva, pomoću odgovarajućih endoskopa. Za traheobronhoskopiju koristi se fleksibilni videobronhoskop koji se sastoji od insercijske cijevi i upravljačke jedinice, kojom se ručno upravlja i koja je spojena na izvor svjetla. Pomoću upravljačke jedinice savija se distalni dio cijevi što omogućuje rotacijske pokrete tog dijela endoskopa i bolju mogućnost prikaza. Insercijska cijev može biti dugačka 40 – 85 cm s vanjskim promjerom od 3 do 6 mm. Za velike ili divovske pasmine pasa može se koristiti i gastroskop (promjera 7 – 9 mm i duljine 120 cm). Manji bronhoskopi promjera koriste se u mačaka i malih pasa, ali mali promjer bronhoskopa ograničava veličinu radnog kanala. Radni kanal pruža mogućnost korištenja instrumenta.

Korišteni su video endoskopski sustavi, ovisno o dimenzijama pacijenata i odluci ordinarijusa:

- 1) Olympus CLV-180 Evis Exera II izvora svjetla (Olympus Medical Systems corp. Tokyo, Japan), Olympus High definition LCD monitor (Olympus Medical Systems corp. Tokyo, Japan) sa Olympus CHF type CB30S fiberoptičkim endoskopom (Olympus Medical Systems corp. Tokyo, Japan) insercijske tube promjera 2,8 mm, radnog kanala 1,2 mm, duljine 700 mm
- 2) Vathin Digital Video Monitor DVM A1 (Hunan Vathin Medical Instrument Co., Hunan, China) i fleksibilni endoskop H-steriScope ISingle-Use Bronchoscope Slim (Hunan Vathin Medical Instrument Co., Hunan, China) insercijska tuba 3,2 mm, s radnim kanalom 1,2 mm, duljine 600 mm.

Bronhoskopija i BAL provedeni su na psima u općoj inhalacijskoj anesteziji. Tijekom zahvata bronhoskopije i BAL pacijenti su postavljeni u sternalni ili bočni položaj te su u ustima imali postavljeni otvarač za usta kako bi se spriječilo oštećivanje endoskopa. Prije početka zahvata provedena je kratkotrajna aplikacija kisika u cilju preoksigenacije.

Korišteni su podaci o izgledu i promjenama dušnika i bronha zabilježenim prilikom bronhoskopije. Potpunim nalazom bronhoskopije smatrao se svaki u kojemu je jasno opisana



boja i tekstura sluznice, prohodnost, prisutnost dišnih puteva, količina i priroda sekreta te prisutnost i mjesto stranih tijela ili masa. Uredan nalaz bronhoskopije smatran je ako je prisutna vlažna, blijedoružičasta sluznica s malo sekreta, a submukozne žile su jasno vidljive (slika 2) uz jasno naznačeno grananje te okrugli presjek bronha.

U istraživanju su korišteni i rezultati pretrage BAL provedene u sklopu dijagnostike. Bronhoalveolarno ispiranje provedeno je nakon bronhoskopije. Uzorci dobiveni BAL dobiveni su s mjesta prethodno odabranog iz radiografskih ili nalaza kompjutorizirane tomografije, mjesta očite patologije uočene na bronhoskopiji, s mjesta odabranog u odsutnosti očite makroskopske patologije, kao i „slijepom“ (nebronhoskopskom) metodom. Za ispiranje su korištene sterilne sonde, koje se (ovisno o promjeru i duljini) prilagođavaju veličini životinje. Duljina sonde ili katetera iznosila je od početka usne šupljine do zadnjeg rebra (HAWKINS, 2020). Sonda ili kateter proveo se kroz endotrahealni tubus dok se nježno ne zaglavi, odnosno dok se dalje nije mogao gurnuti. Izvlačenje katetera nekoliko milimetara, lagano rotiranje i ponovno nježno guranje dok se ne zaustavi, korišteni su da se kateter s većom sigurnošću umetne unutar dišnog puta, kako se ne bi zaglavio na račvanju dišnog puta. Jednom kada je kateter u poziciji, kroz njega se aplicirala zagrijana sterilna fiziološka otopina i odmah se aspirirala (ETTINGER i sur., 2024.). Korištene su najmanje dvije aplikacije sterilne fiziološke otopine koja je aplicirana na predviđeno mjesto u dozi od 1 do 2 ml/kg tjelesne mase pacijenta, nakon čega je odmah aspirirana u sterilnu brizgalicu te alikvotirana za predviđene pretrage. Uzorci za bakteriološku i mikološku pretragu pohranjeni su u sterilnoj brizgastici te dostavljeni u bakteriološki laboratorij odmah nakon završene pretrage. Uzorci za citološku pretragu pohranjeni su u epruvete s EDTA-om te bez odgode dostavljeni u laboratorij.

Uzorci dobiveni BAL-om slani su na citološku (Zavod za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) i mikrobiološke pretrage (Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) u sklopu standardne obrade pacijenta s bolestima donjih dišnih puteva, te su bilježeni rezultati tih pretraga.

Ostatni uzorci bronhoalveolarnih ispiraka (centrifugirani i necentrifugirani) pohranjeni su na temperaturi od -80 °C.

#### 4.7. CITOLOŠKA PRETRAGA BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA

Citološka pretraga proveda se na razmazima centrifugiranih ispiraka napravljenima unutar 30 minuta od uzorkovanja ili centrifugiranim uzorcima pohranjenima u EDTA epruvete. Preparati su bojeni May-Grünwald-Giemsinom metodom. Na stakalca s osušenim materijalom nakapana je May-Grünwaldova otopina te je nakon dvije minute isprana destiliranom vodom. Zatim je nanosena razrijeđena i filtrirana Giemsina otopina (razrijeđena 1:10 s destiliranom vodom) koja je ostavljena na stakalcu 20 minuta, nakon čega se isprala s destiliranom vodom i stakalce se ostavilo u destiliranoj vodi jednu minutu i 20 sekundi. Prilikom citološke analize preparata subjektivno je procijenjena i djelomično kvantificirana (malo, srednje, jako) količina sluzi, staničnost te udio i izgled rezidencijalnih i nerezidencijalnih stanica donjih dišnih puteva: trepetljikavih i netrepetljikavih epitelnih stanica, alveolarnih makrofaga, neutrofila, eozinofila, limfocita, mastocita, eritrocita te displastičnih i neoplastičnih stanica. Na temelju navedenih kriterija postavila se konačna citološka dijagnoza kako je prethodno opisano (VALENCIANO i COWELL, 2014.)

Konačne citološke dijagnoze kategorizirane su kao:

- uredan nalaz
- neinterpretabilan nalaz (bez staničnih elemenata, ili premalo stanica)
- orofaringealna kontaminacija (nalaz površinskog pločastog epitela i/ili nalaz *Conchiformibius* spp. bakterija)
- eozinofilna upala (> 10 % eozinofilnih granulocita)
- neutrofilna (gnojna) upala (> 10 % neutrofilnih granulocita)
- makrofagna (histiocitna ili granulomatozna upala) (dominantnu staničnu populaciju čine makrofazi)
- piogranulomatozna upala (povišen udio makrofaga i neutrofilnih granulocita)
- neoplazma (prisutnost jezgrenih kriterija malignosti i/ili atipičnih stanica)
- krvarenje (dominantan nalaz eritrocita sa znakovima eritrofagocitoze, hemosiderofaga ili pigmenta hema)

#### 4.8. MIKROBIOLOŠKA PRETRAGA BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA

Mikrobiološka pretraga podrazumijeva bakteriološku, virološku i mikološku pretragu bronhoalveolarnih ispiraka. Učinjena je opća bakteriološka kulturelna pretraga s antibiogramom. Uzorci bronhoalveolarnih ispiraka naciepljeni su kalibriranom ezom od 10 mikrolitara, postupkom rijeđenja, na hranjivi agar (Oxoid Columbia Blood Agar Base, Oxoid, Dublin, Irska) s dodatkom 5 %-tne ovčje krvi. Naciepljene su ploče potom inkubirane tijekom 24 – 48 sati pri 37 °C. Ako su životinje za vrijeme uzimanja uzorka liječene antimikrobnim tvarima, ploče su prije izdavanja negativnog nalaza inkubirane tijekom najmanje 96 sati. Ploče su svaki dan pregledavane na porast bakterijskih kolonija, koje su potom identificirane na temelju kulturelnih, morfoloških i biokemijskih svojstava. Postupak identifikacije bakterija počinjao je uočavanjem oblika, boje i veličine kolonija, izgleda rubova i uraštenosti u podlogu. Potom su bakterije obojene po Gramu kako bi se odredili veličina i oblik bakterijskih stanica te je li bakterija gram-pozitivna ili gram-negativna. Ovisno o tome, bakterijama su ispitana sljedeća biokemijska svojstva: tvorba enzima katalaze, oksidaze i koagulaze, sposobnost fermentacije glukoze s prisutnošću ili bez prisutnosti kisika, sposobnost razgradnje laktoze, ureje, citrata i lizina, sposobnost tvorbe plina, acetoina, sumporovodika, pokretljivost i sposobnost rasta u prisutnosti žučnih soli. Većina bakterija identificirana je do razine roda, a u pojedinim slučajevima izolati su do razine vrste identificirani komercijalnim biokemijskim sustavom (API, bioMerieux, Marcy-l'Étoile, Francuska), spektrometrijom masa laserske desorpcije/ionizacije potpomognute matricom (MALDI-TOF MS) ili molekularnim metodama. Klinička važnost poraslih bakterija procijenjena je na temelju gustoće porasta, čistoće bakterijske kulture i izdvojene vrste bakterija.

Porast mješovitih kultura ili porast manji od  $1,7 \times 10^3$  CFU/mL smatrao se kontaminacijom uzorka.

Osjetljivost bakterija na antimikrobne tvari ispitana je disk-difuzijskim postupkom po Kirby-Baueru. Postupak se provodi nanošenjem suspenzije bakterijske kulture određene gustoće na Mueller-Hintonov agar (Bio-Rad, France) s dodatkom krvi ili bez dodatka krvi. Nakon toga su na agar stavljeni papirnati diskovi impregnirani određenom koncentracijom antimikrobne tvari (Bio-Rad, Francuska). Ploče su potom inkubirane tijekom 24 sata pri 37 °C, nakon čega je izmjerena promjer zona inhibicije rasta bakterija oko diskova. Interpretacija zona

inhibicije rasta definirana je u tri kategorije: osjetljiv (S), osjetljiv uz povećanu izloženost (I) i rezistentan (R). Cijeli postupak ispitivanja antimikrobne osjetljivosti je proveden i rezultati interpretirani prema smjernicama Instituta za standarde klinika i laboratorija (CLSI, 2015.) i Europskog odbora za testiranje osjetljivosti (EUCAST, 2022.).

Uzorci bronhoalevolarnih ispiraka nacjepljivani su u duplikatu na Sabouraudovu hranjivu podlogu te inkubirani tijekom 14 dana na 37 °C (BOSSHARD, 2011., ZHU i sur., 2021). Uzorci zaprimljeni od životinja koje su liječene antifungalnim lijekovima inkubirani su u trajanju prosječno od četiri do šest tjedana. Identifikacija poraslih gljivica provodila se rutinskim laboratorijskim metoda do razine roda, a neke do razine vrste koristeći pritom njihova kulturelna, morfološka i mikroskopska obilježja te biokemijska svojstva. U određenim slučajevima za identifikaciju vrste korištene su molekularne metode – lančana reakcija polimerazom koja je uključivala upotrebu univerzalnih pan-fungal početnica i sekvenciranje dobivenih produkata.

#### **4.9. MOLEKULARNA METODA DOKAZA UZROČNIKA POVEZANIH SA ZARAZNIM KAŠLJEM PASA**

Metodom PCR iz uzoraka dobivenih bronhoalveolarnim ispiranjem određivala se prisutnost uzročnika povezanih s CIRDC-om: *Bordetella bronchiseptica* (Bb), *Mycoplasma* spp. i zasebno *Mycoplasma cynos*, pseći adenovirus tipa 1 i 2 (CAV-1 i 2), virus štenecaka (*canine distemper virus*, CDV), pseći herpesvirus 1 (CaHV-1), pseći parainfluenza virus (CPiV), virus influence pasa (CIV) te pseći respiratorni koronavirus (CRCoV) (DAY i sur., 2020.).

##### **4.9.1. PCR PROTOKOL**

Korištene su nukleinske kiseline izolirane iz bronhoalveolarnih ispiraka pasa skladištenih na -80 °C. U ependrof epruvete s uzorcima dodavala se puferirana solna otopina u količini od 700 µL, a postupak se provodio u biozaštitnoj komori, te se epruveta s uzorkom i puferiranom solnom otopinom kratko promiješala na tresilici, a zatim centrifugirala 15 sekundi na 6000 okretaja. Izdvajanje ukupne nukleinske kiseline provodilo se upotrebom komercijalnih

kompleta QIAamp Cador Pathogen Mini kit 250 (QUIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Komplet QIAamp DNA Mini Kit sadržava:

QIAamp kolona za centrifugiranje	50 komada
plastične epruvete zapremine 2 ml	150 komada
puferska otopina AL	12 ml
puferska otopina ATL	10 ml
puferska otopina AW1 (koncentrirana)	19 ml
puferska otopina AW2 (koncentrirana)	13 ml
puferska otopina AE	22 ml
proteinaza K	1,25 ml

PCR metoda provedena je uz upotrebu sljedećih reagensa:

- voda slobodna od RNK-za i DNK-za (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- reakcijski pufer 10x koncentriran
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 25 mM dNTP
- uzvodna početnica 10 μM (Hfor)
- nizvodna početnica 10 μM (555rev)
- Taq Platinum 5u/μl (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
- početnice (tablica 3)

Tablica 3. Početnice za umnažanje odsječaka genoma uzročnika povezanih s CIRDC-om u izvođenju PCR metode

UZROČNIK	OZNAKA POČETNICE	NUKLEOTIDNI SLIJED 5'-----> 3'
<i>B. bronchyseptica</i>	Fla1	CCCCCGCACATTTCCGAACTTC

	Fla2	AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT
	Fla3	CACCTGCCCCATCTCC
	Fla4	TGGCGCCTGCCCTATC
<i>Mycoplasma</i> spp.	GPO3F	TGGGGAGCAACAGGATTAGATACC
	MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC
<i>Mycoplasma</i> <i>cynos</i>	MYC1	CACCGCCCGTCACACCA
	MCYN	GATACATAAACACAACATTATAATATTG
<b>CDV</b>	CDV-forward	ACTGCTCCTGATACTGC
	CDV-reverse	TTCAACACCAAC(T/C)CCC
<b>CAV-1</b> <b>CAV-2</b>	HA1	CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC
	HA2	CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT
<b>CAHV-1</b>	DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC
	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA

	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT
	TGV	TGTA ACTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNG T
	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT
<b>CIV</b>	CIV_M_F151	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC
	CIV_M_R276	AGGGCATT TGGACAAAKCGTCTA
<b>CPIV</b>	CPIV_N_F428	GCCGTGGAGAGATCAATGCCTAT
	CPIV_N_R614	GCGCAGTCATGCACTTGCAAGT
<b>CRCoV</b>	CoV_16053_F	GGTTGGGAYTAYCCTAARTGTGA
	CoV_16594_R	TAYTATCARAAYAATGTC TTTATGTC
	CoV_Pan_16510_R	TGATGATGGNGTTGTBTGYTATAA

Reagensi korišteni prilikom pripravljanja reakcijske smjese za izvođenje PCR metode pomiješali su se u Eppendorf epruveti. Količina reagensa varirala je ovisno o vrsti uzročnika i broju uzoraka. Eppendorf epruveta zatim se kratko promiješala na tresilici i kratko centrifugirala. Nakon toga je reakcijska smjesa podijeljena u PCR Eppendorf epruvetice. Pripremljene PCR Eppendorf epruvetice posložile su se u PCR uređaj, temperaturni režimi za dokazivanje DNK uzročnika prikazani su u tablici 4, a za dokazivanje RNK u tablici 5.

Tablica 4. Temperaturni režimi za dokaz DNK uzročnika zaraznog kašlja molekularnom metodom PCR. PCR – lančana reakcija polimerazom, CaHV – pseći herpesvirus, CAV – pseći adenovirus.

Korak PCR-a	<i>B. bronchiseptica</i>		CaHV-1	
	PCR I	PCR II	PCR I	PCR II
Aktivacija polimeraze	95 °C – 5 min	95 °C – 5 min	95 °C – 5 min	95 °C – 5 min
Denaturacija	94 °C – 1 min	94 °C – 1 min	95 °C – 30 s	95 °C – 30 s
Vezivanje početnica	53 °C – 15 s	57 °C – 30 s	46 °C – 1 min	46 °C – 30 s
Produživanje lanca	72 °C – 20 s	72 °C – 40 s	72 °C – 1 min	72 °C – 1 min
Završno produživanje	72 °C – 10 min	72 °C – 10 min	72 °C – 10 min	72 °C – 10 min
Hlađenje	10 °C – neograničeno	10 °C – neograničeno	10 °C – neograničeno	10 °C – neograničeno

Korak PCR-a	CAV – 1/2	<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>M. cynos</i>
Aktivacija polimeraze	95 °C – 5 min	94 °C – 3 min	95 °C – 5 min
Denaturacija	96 °C – 30 s	94 °C – 45 s	95 °C – 45 s
Vezivanje početnica	58 °C – 1 min	53 °C – 15 sec	55 °C – 30 s
Produživanje lanca	72 °C – 1 min	72 °C – 30 s	72 °C – 20 s
Završno produživanje	72 °C – 10 min	72 °C – 7 min	72 °C – 5 min
Hlađenje	10 °C – neograničeno	4 °C - neograničeno	4 °C - neograničeno

Tablica 5. Temperaturni režimi za dokaz RNK uzročnika zaraznog kašlja molekularnom metodom PCR. PCR – lančana reakcija polimerazom, CIV – virus influence pasa, CPIV – pseći virus parainfluence, CDV – virus štenecaka, CrCoV – respiratorni koronavirus pasa.

Korak PCR-a	CIV/ CPIV/ CRCoV	CDV
Reverzna transkripcija	50 °C – 30 min	50 °C – 30 min



Aktivacija polimeraze	95 °C – 15 min		95 °C – 15 min	
Denaturacija	94 °C – 1 min	40x	94 °C – 45 s	35x
Vezivanje početnica	58 °C – 1 min		48 °C – 45 s	
Produživanje lanca	72 °C – 1 min		72 °C – 90 s	
Završno produživanje	72 °C – 10 min		72 °C – 10 min	
Hlađenje	10 °C – neograničeno		10 °C – neograničeno	

Prikaz produkata dobivenih PCR metodom proveden je elektroforezom u 1,2 %-tnom agaroznom gelu. Gel se spojio na istosmjernu struju napona 100 V, jačine 700 mA i snage 150 W te je postupak trajao 30 – 60 minuta. Prisutnost umnoženog fragmenta odgovarajuće veličine označavala je uspješan dokaz uzročnika PCR metodom. Određivanje nukleotidnog slijeda učinjeno je u tvrtki Macrogen, Amsterdam, Nizozemska pomoću ABI PRISM BigDye terminator kita (Applied Biosystem, Carlsbad, California, SAD) na uređaju 3730 x 1 DNA analizer istog proizvođača.

#### 4.10. UZORCI SLINE

Ostatni uzorci sline koji su bili dostupni za pojedine pse, pohranjeni na temperaturi od -80 °C, upotrijebljeni su za proteomsku analizu u ovom istraživanju. Uzorci sline prikupljeni su kao što je prethodno opisano (LUCENA i sur., 2019). Spužva veličine oko 2 x 2 cm stavljena je u usta svakog psa, ostavljena u kontaktu s obrazom sluznice 1 – 2 minute, a zatim je stavljen u Salivette → epruvetu (Salivette, Nümbrecht, Njemačka). Nakon centrifugiranja (3000 g, 10 min, 4 °C), uzorak sline prebačen je u polietilenske epruvete od 1,5 mL i pohranjen pri -80 °C do proteomske analize.

#### 4.11. FORMIRANJE SKUPINA

Na temelju rezultata anameze, kliničke slike i rezultata dijagnostičkih pretraga, psi su svrstani, ovisno o postignutoj konačnoj dijagnozi, u četiri skupine:

- 1) psi s upalnim bolestima donjih dišnih puteva (U)
- 2) psi s neoplastičnim bolestima donjih dišnih puteva (N)
- 3) psi s neupalnim/neneoplastičnim bolestima pluća (NN)
- 4) kontrolna skupinu (K).

Psi s nepotpunim anamnestičkim i kliničkim podacima, i oni kod kojih nije postignuta konačna dijagnoza, isključeni su iz istraživanja. Popis mogućih diferencijalnih dijagnoza za pojedine skupine nalazi se u tablici 6.

Za utvrđivanje potrebnog broja uzoraka koristila se formula za izračun veličine uzorka prema ZHANG i sur., 2017., a pomoću besplatnog računalnog programa G\*power (FAUL i sur., 2009.). Prema podacima iz sličnog istraživanja (ROELS i sur., 2015.), a uzimajući u obzir željenu statističku snagu od 80 %, i vrijednost 0,05 kao vjerojatnost statističke pogreške tipa I, procijenjena veličina uzorka iznosila je 24 pasa, odnosno minimalno šest po skupini.

Tablica 6. Popis diferencijalnih dijagnoza bolesti donjih dišnih puteva pasa

Upalne	Zarazni traheobronhitis pasa
	Kronični bronhitis
	Pneumonija (bakterijska, virusna, gljivična, protozoalna, parazitska, aspiracijska)
	Eozinofilna bronhopneumopatija
Neupalne i neneoplastične	Kolaps dušnika
	Intersticijska fibroza pluća
	Primarna cilijarna diskinezija
	Plućna tromboembolija
	Bronhiektazije
	Bronhomalacija
	Primarne novotvorine donjih dišnih puteva

#### 4.11.1. UPALNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA

U ovu skupinu svrstani su psi u kojih su postignute sljedeće konačne dijagnoze: zarazni kašalj pasa (CIRDC), kronični bronhitis, infektivni bronhitis i pneumonije, eozinofilna bronhopneumopatija. Dijagnoze su postavljene kombinacijom podataka dobivenih iz anamneze, kliničkog nalaza, laboratorijskih metoda dijagnostike, slikovne dijagnostike, traheobronhoskopije i/ili citološke/mikrobiološke pretrage bronhoalvolarnih ispiraka kako je prethodno opisano (tablica 7) (VALENCIANO i COWELL, 2014.; HAWKINS, 2020., ETTINGER i sur., 2024.).

Tablica 7. Prikaz kriterija za postizanje konačne dijagnoze bolesti iz skupine upala. (CIRDC – kompleks zaraznih dišnih bolesti pasa, kašalj štenare, zarazni kašalj pasa (engl. *canine infectious respiratory disease complex*))

Bolest	Kriteriji
<b>Zarazni kašalj pasa (CIRDC)</b>	Nagla pojava kašlja +/- ostalih znakova dišnog sustava. Tipična epizotološka anamneza (izloženost velikom broju drugih pasa, pogotovo onima sa sličnim kliničkim znakovima). Dokaz specifičnih uzročnika serološkim ili molekularnim metodama.
<b>Kronični bronhitis</b>	Kronični kašalj (dulje od dva mjeseca) bez sistemskih znakova.

	<p>Bronhoskopski nalaz hipersekrecije sluzi +/- hiperemija sluznice i bronhiektazije.</p> <p>Citološka pretraga bronhoalveolarnog ispirka: uredan nalaz ili blaga neutrofilna do eozinofilna upala.</p> <p>Negativan nalaz mikrobiološke pretrage bronhoalveolarnih ispiraka.</p> <p>Isključivanje drugih bolesti slikovnom dijagnostikom.</p>
<p><b>Pneumonija (bakterijska, virusna, gljivična, protozoalna, parazitska, aspiracijska)</b></p>	<p>Progresivni respiratorni klinički znakovi sa sistemskim znakovima.</p> <p>Nalaz bronhointersticijskog ili bronhoalveolarnog uzorka slikovne dijagnostike pluća kompatibilan s pneumonijom u pasa bilo koje dobi s kompatibilnim kliničkim znakovima.</p> <p>Citološka pretraga bronhoalveolarnog ispirka: upala s eventualnim prikazom uzročnika.</p> <p>Dokaz uzročnika mikrobiološkom pretragom ili molekularnim metodama u uzorcima bronhoalveolarnog ispirka.</p>
<p><b>Eozinofilna bronhopneumopatija</b></p>	<p>Progresivni respiratorni klinički znakovi sa sistemskim znakovima.</p> <p>+/- periferna eozinofilija.</p> <p>Difuzni intersticijski uzorak na slikovnoj dijagnostici pluća.</p> <p>Citološka pretraga bronhoalveolarnog ispirka: jaka eozinofilna upala bez detekcije uzročnika.</p> <p>Negativne parazitološke pretrage.</p>

#### 4.11.2. NEOPLASTIČNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA

U ovu skupinu svrstani su psi u kojih je postignuta dijagnoza primarne ili metastatske neoplastične bolesti koja zahvaća dušnik, bronhe i/ili pluća. Dijagnoze su postavljene kombinacijom podataka dobivenih iz anamneze, kliničkog nalaza, laboratorijskih metoda dijagnostike, slikovne dijagnostike, traheobronhoskopije i/ili citološke/mikrobiološke pretrage bronhoalvolarnih ispiraka kako je prethodno opisano (tablica 8) (VALENCIANO i COWELL, 2014.; HAWKINS, 2020., ETTINGER i sur., 2024.).

Tablica 8. Prikaz kriterija za postizanje konačne dijagnoze bolesti iz skupine novotvorina.

<b>Bolest</b>	<b>Kriteriji</b>
<b>Primarne novotvorine</b>	<p>Kronični sporoprogresivni respiratorni znakovi u starijeg psa (rijeđe akutne prezentacije ili mlađi pas).</p> <p>+/- nespecifični sistemski znakovi.</p> <p>Slikovna dijagnostika: lokalizirana, solitarna masa unutar parenhima pluća +/- nalaz masa u ostalim organima.</p> <p>Citološka pretraga bronhoalveolarnog ispirka i/ili bioptata mase kompatibilna sa neoplastično promijenjenim stanicama.</p> <p>Histopatološka pretraga bioptata mase.</p>
<b>Sekundarne (metastatske) novotvorine</b>	<p>Kronični sporoprogresivni respiratorni znakovi u starijeg psa (rijeđe akutne prezentacije ili mlađi pas).</p> <p>+/- nespecifični sistemski znakovi.</p>

	<p>Slikovna dijagnostika: difuzni retikularni, nodularni ili retikulonodularni intersticijski uzorak pluća +/- nalaz masa u ostalim organima.</p> <p>Citološka pretraga bronhoalveolarnog ispirka i/ili bioptata mase kompatibilna sa neoplastično promijenjenim stanicama.</p> <p>Histopatološka pretraga bioptata mase.</p>
--	---

#### **4.11.3. NEUPALNE I NENEOPLASTIČNE BOLESTI DONJIH DIŠNIH PUTEVA**

U ovu skupinu svrstani su psi u kojih su postignute sljedeće konačne dijagnoze: kolaps dušnika i/ili bronha i bronhijektazije (bez znakova aktivne upale u trenutku dijagnostike), idiopatska plućna fibroza, plućna tromboembolija, primarna cilijarna diskinezija. Dijagnoze su postavljene kombinacijom podataka dobivenih iz anamneze, kliničkog nalaza, laboratorijskih metoda dijagnostike, slikovne dijagnostike, traheobronhoskopije i/ili citološke/mikrobiološke pretrage bronhoalvolarnih ispiraka kako je prethodno opisano (tablica 9) (VALENCIANO i COWELL, 2014.; HAWKINS, 2020., ETTINGER i sur., 2024.).

Tablica 9. Prikaz kriterija za postizanje konačne dijagnoze bolesti iz skupine neupalnih/neneoplastičnih bolesti.

<b>Bolest</b>	<b>Kriteriji</b>
<b>Kolaps dušnika</b>	<p>Tipična klinička slika: kašalj koji zvuči poput glasanja guske (engl. <i>goose honk</i>) i koji se pojačava za vrijeme uzbuđenja i aktivnosti u srednje starog psa male ili minijaturne pasmine (iako se može pojaviti u pasa svih dobi i pasmina) bez prisutnosti sistemskih znakova.</p>

	<p>Slikovna dijagnostika: nalaz kolapsa lumena intratorakalnog ili ekstratorakalnog dušnika.</p> <p>Brohoskopija: nalaz i stupnjevanje kolapsa lumena dušnika</p> <p>Isključivanje drugih bolesti dišnih puteva.</p>
<p><b>Intersticijska fibroza pluća</b></p>	<p>Sporoprogresivni respiratorni znakovi donjih dišnih puteva, pogotovo u kompatibilnih pasmina starijih pasa.</p> <p>Nalaz tipičnih <i>velcro</i>-krepitacija pri auskultaciji pluća stetoskopom.</p> <p>Slikovna dijagnostika: difuzni intersticijski uzorak pluća.</p> <p>Isključivanje drugih bolesti pluća.</p> <p>Histopatološka pretraga pluća.</p>
<p><b>Primarna cilijarna diskinezija</b></p>	<p>Rekurentni respiratorni znakovi, bronhiektazije i bakterijske infekcije dišnih puteva u mladih pasa.</p> <p>+/- nalaz <i>situs inversus</i>.</p> <p>Smanjena motilnost spermija (u nekastriranih mužjaka).</p> <p>Pretraga cilijarnog epitela ili spermatozoa elektronskim mikroskopom.</p> <p>Scintigrafija: smanjeni ili odsutan trahealni mukocilijarni klirens.</p> <p>DNK pretraga u pasmine staroengleski ovčarski pas (bobtail).</p>
<p><b>Plućna tromboembolija</b></p>	<p>Perakutna pojava respiratornog distresa.</p> <p>Anamneza i klinički nalaz te ancilarne dijagnostičke pretrage kompatibilne s bolestima koje se povezuju s plućnom tromboembolijom.</p>

	Napredna slikovna dijagnostika: CT angiografija za dokaz tromba u glavnim, lobarnim ili segmentalnim plućnim arterijama.
<b>Bronhiektazije</b>	<p>Kronični respiratorni znakovi bez prisustva sistemskih znakova.</p> <p>Slikovna dijagnostika: nalaz proširenja lumena bronha.</p> <p>Brohoskopija: nalaz i stupnjevanje proširenja lumena bronha.</p> <p>Isključivanje drugih bolesti dišnih puteva.</p>
<b>Bronhomalacija</b>	<p>Kronični respiratorni znakovi bez prisustva sistemskih znakova.</p> <p>Slikovna dijagnostika: nalaz kolapsa bronha.</p> <p>Brohoskopija: nalaz i stupnjevanje kolapsa lumena bronha.</p> <p>Isključivanje drugih bolesti dišnih puteva.</p>

#### 4.11.4. KONTROLNA SKUPINA

Kontrolnu skupinu činili su psi kojima primijenjenim dijagnostičkim postupcima nije utvrđena bolest donjih dišnih puteva. U ovu su skupinu uključeni psi u kojih je provedena dijagnostika zbog respiratornih znakova, ali je konačnom dijagnozom isključena bolest donjih dišnih puteva u trenutku dijagnostike.

#### 4.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA



Provela se statistička obrada prikupljenih podataka o psima, nalazima kliničkog pregleda i dijagnostičkih metoda, te nalazom molekularne pretrage na uzročnike povezane s CIRDC-om.

Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. S obzirom na to da je kod broja uzoraka manjeg od 30 po skupini teško procijeniti distribuciju podataka kao normalnu ili nenormalnu, korišteni su neparametrijski testovi i kod normalne distribucije podataka (DODGE, 2007.). Za svaku je varijablu napravljena opisna statistička obrada. Kategorijske i nominalne vrijednosti prikazane su kroz odgovarajuće frekvencije i udjele te 95 %-tne intervale pozdnanosti. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone, a razlike između njih analizirane su Kruskal-Wallisovim testom. Razlike u kategorijskim varijablama analizirane Fisher-Freeman-Haltonovim testom. P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima. U analizi se koristila licencirana programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 27.0.1 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).

#### **4.13. PROTEOMIKA I ANALIZA PODATAKA**

Proteomska analiza bronhoalveolarnih ispiraka provela se u Laboratoriju za proteomiku Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu semikvantitativnim proteomskim pristupom pomoću izobarnih privjesaka koji omogućuju multipleksiranje (istodobnu analizu šest uzoraka) (KULEŠ i sur., 2021.).

##### **4.13.1. PRIPREMA UZORAKA**

Za određivanje koncentracije ukupnog broja proteina u uzorcima bronhoalveolarnih ispiraka, seruma i sline primijenjen je test bicinoninske kiseline (engl. *BCA assay*) (Thermo Scientific, Rockford, SAD). Iz svakog uzorka volumen koji odgovara 35 µg proteina dopunjen je do 50 µl s 0,1 M trietilamonijevim bikarbonatom (TEAB, Thermo Scientific, Rockford, SAD). Uzorci su zatim bili reducirani (200 mM ditiotreitol, 2,5 µL, 60 min, 55 °C) (DTT,

Sigma Aldrich, St. Louis, SAD), alkilirani (375 mM jodoacetamid, 2,5  $\mu$ L, 30 min, na sobnoj temperature u mraku) (IAA, Sigma Aldrich, St. Lois, SAD), te taloženi s acetonom (300  $\mu$ l, 4 °C, preko noći). Nakon centrifugiranja (9000 x g, 4 °C), proteini u talogu otopili su se u 50  $\mu$ l TEAB-a, te razgradili dodatkom 1  $\mu$ l (1 mg/mL) tripsina (Promega, Madison, SAD) pri 37 °C tijekom noći. Reagensi s izobarnim privjescima, Tandem Mass Tag 6plex, (TMT) (Thermo Scientific, Rockford, SAD) koji omogućuju multipleksiranje – istodobnu analizu šest uzoraka, pripremljeni su prema uputama proizvođača. U svaki uzorak dodano je 19  $\mu$ l specifičnog privjeska (inkubacija 60 min pri sobnoj temperaturi). Reakcija obilježavanja zaustavljena je dodatkom 8  $\mu$ l 5% hidroksilamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Pet nasumično odabranih obilježenih uzoraka spojeno je s unutarnjim standardom (*pool* svih uzoraka koji služi za normalizaciju) u jedan uzorak, osušeno vakuumskom centrifugom te analizirano uz pomoć vezanih tehnika tekućinske kromatografije i tandemске spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS).

Za analizu TMT-om obilježenih uzoraka korišten je tekućinski kromatograf Ultimate 3000 RSLCnano system (Dionex, Germering, Njemačka) spregnutog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka) postupkom podatkovno ovisne akvizicije (engl. *Data Dependent Acquisition*, DDA), kao što je prethodno opisano u dostupnoj literaturi (HORVATIĆ i sur., 2019.). Pokretna faza A sastojala se od 0,1 %-tne mravlje kiseline u vodi, a pokretna faza B bila je 0,1 %-tna mravlja kiselina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u 80 %-tnom acetonitrilu (Honeywell, Charlotte, SAD). Peptidi su otopljeni u puferu (2 %-tni acetonitril, 0,1 %-tna mravlja kiselina) i naneseni na predkolonu (C18 PepMap100, 5  $\mu$ m, 100A, 300  $\mu$ m  $\times$  5 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD), prije odjeljivanja na analitičkoj koloni (PepMap™ RSLC C18, 50 cm  $\times$  75  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD). Protok pokretne faze bio je 0,3  $\mu$ L/min, a ukupno vrijeme analize 155 minuta.

Ionizacija elektroraspršenjem postignuta je nanoraspršenjem Flex izvora iona (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka), koji sadržava emiter SilicaTip (New Objective) unutarnjeg promjera 10  $\mu$ m. Spektrometrija masa provedena je u pozitivnom načinu rada spektrometra masa koristeći metodu podatkovno ovisne akvizicije DDA Top8. Napon ionskog izvora za MS bio je + 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  $1 \times 10^6$ , 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  $2 \times 10^5$ . Ioni prekursori neodređenog naboja, kao i oni s nabojem +1 i više od +7, bili su isključeni iz daljnjeg odabira fragmentacije.

#### **4.13.2. OBRADA PODATAKA SPEKTROMETRIJE MASA, STATISTIČKA I BIOINFORMATIČKA OBRADA**

Obrada podataka, identifikacija proteina i relativna kvantifikacija provedeni su u softveru Proteome Discoverer (v.2.3., Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD) s implementiranim algoritmom SEQUEST i pretraživanjem baze podataka prema *Canis lupus familiaris*. Za pretraživanje baze podataka referentna datoteka proteoma FASTA (68 378 sekvenci) preuzeta je iz baze podataka Uniprot/SwissProt 24.11.2023. Sljedeći parametri prilagođeni su u softveru Proteome Discoverer: dopuštena su dva mjesta cijepanja koja su promašena tripsinom; tolerancije mase prekursora i fragmenata postavljene su na 10 ppm odnosno 0,02 Da; i karbamidometil (C) je odabran kao fiksna peptidna modifikacija, dok su oksidacija (M) i TMT 6-plex (K, peptidni N-kraj) odabrani kao dinamičke modifikacije. Postotak krivih očitavanja (engl. *false discovery rate*, FDR) za identifikaciju peptida izračunat je algoritmom Percolator u Proteome Discoverer. Najmanje dva jedinstvena peptida i 1 % FDR-a bili su potrebni za ekstrakciju pouzdano identificiranih proteina. Za izvođenje relativne kvantifikacije proteina napravljena je korelacija između relativnih intenziteta reporterskih iona ekstrahiranih iz MS/MS spektara i peptida odabranih za MS/MS fragmentaciju. Vrijednosti internog standarda korištene su za normalizaciju relativnih rezultata kvantifikacije između 6-pleksa, a ukupna količina peptida korištena je za normalizaciju unutar jednog 6-pleksa.

Relativni rezultati kvantifikacije izvezeni iz Proteome Discoverera dodatno su statistički analizirani kako bi se identificirale razlike u relativnoj zastupljenosti kvantificiranih proteina među skupinama 1) psi s upalnim bolestima 2) psi s neoplastičnim bolestima i 3) psi s neupalnim/neneoplastičnim bolestima i 4) kontrolna skupina (psi bez bolesti donjih dišnih puteva). ANOVA i Kruskal-Wallisov test korišteni su za statističku obradu kvantificiranih

glavnih proteina u MedCalc Software Ltd (v. 12.5) (Acaciaaan, Belgija) i Statistica (StatSoft, TIBCO Software, Hamburg, Njemačka). Za bioinformatičku analizu jedinstvena oznaka proteina prvo je pretvorena u službeni simbol gena pomoću alata za mapiranje UniProtKB ID (THE UNIPROT CONSORTIUM 2020). Proteini za koje nije bila dostupna oznaka gena za *Canis lupus* ili su bili navedeni kao *nekarakterizirani protein* zamijenjeni su, gdje je bilo primjenjivo, pomoću alata UniProt BLAST s najbližim podudarnim ortologom iz baze *Canis lupus* (najmanje 70 % podudarnosti) (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020. (v.2.9.0)).

Glavni proteini sa statistički značajno različitim količinama ( $p < 0,05$ ) uključeni su u analizu glavnih komponenti (PCA), stvaranje reprezentativne „toplinske karte“, funkcionalnu analizu proteina te Reactome i STRING analizu. PCA je izveden u DataLab v. 3.530 (J. Lohninger, DataLab, Epina Software Labs, Pressbaum, Austrija, 2011., <http://www.lohninger.com/datalab/>, pristupljeno 14. ožujka 2022.), a toplinska karta izrađen je u MS Officeu (Excel Professional Plus 2016). Klasifikacijski alat PANTHER (v.17.0) i STRING (v.11.5) primijenjeni su u funkcionalnoj analizi proteina i stvaranju funkcionalnih mreža asocijacija proteina. Stoga su imena gena proteina umetnuta u PANTHER/STRING, a *Canis lupus familiaris* odabran je kao organizam za upit. Analiza prekomjerne zastupljenosti puta provedena je u alatu REACTOME (Reactome baza podataka izdanje 83, preglednik Pathway v. 3.7, <https://reactome.org/>, pristupljeno 17. ožujka 2022.) korištenjem odabrane baze podataka puteva i reakcija u Homo sapiensa. U izračunima vjerojatnosti za svaki biološki put primijenjen je statistički (hipergeometrijska distribucija) test, a p-vrijednosti su korigirane za FDR izračunat Benjamini-Hochbergovim postupkom. Put se smatra značajnim kada je korigirana p-vrijednost bila  $< 0,05$ .

Provedena je analiza genske ontologije kako bi se odredila značajna zastupljenost bioloških procesa i pripadajućih značajno promijenjenih gena/proteina u uzorcima. Također je provedena analiza bioloških puteva kako bi se identificirali značajno promijenjeni putevi između kontrolne skupine (psi bez bolesti donjih dišnih puteva) i skupina pasa s bolestima donjih dišnih puteva.



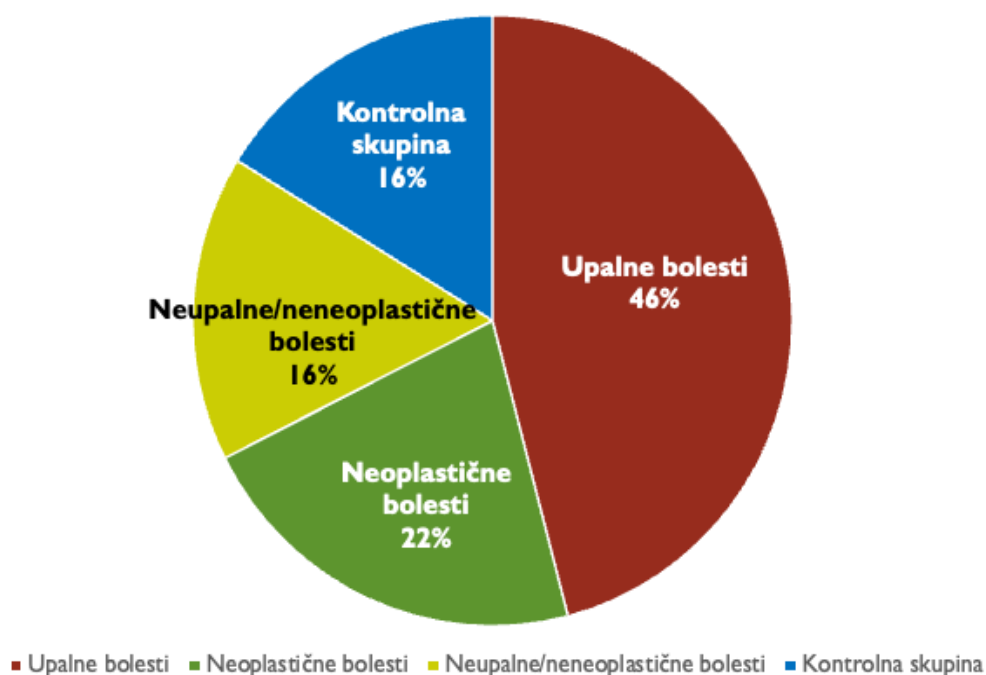
## 5. REZULTATI

### 5.1. PODATCI O PSIMA UKLJUČENIMA U ISTRAŽIVANJE

U istraživanje su inicijalno uključena ukupno 42 psa, nakon čega je, primjenom kriterija za isključivanje, pet pasa bilo isključeno iz daljnje obrade. Preostalo je 37 pasa, čiji su ostatni uzorci seruma (N = 36), bronhoalveolarnih ispiraka (N = 37) i sline (N = 22) prikupljeni za potrebe daljnje proteomske analize, te 37 uzoraka bronhoalveolarnog ispirka za potrebe molekularne pretrage.

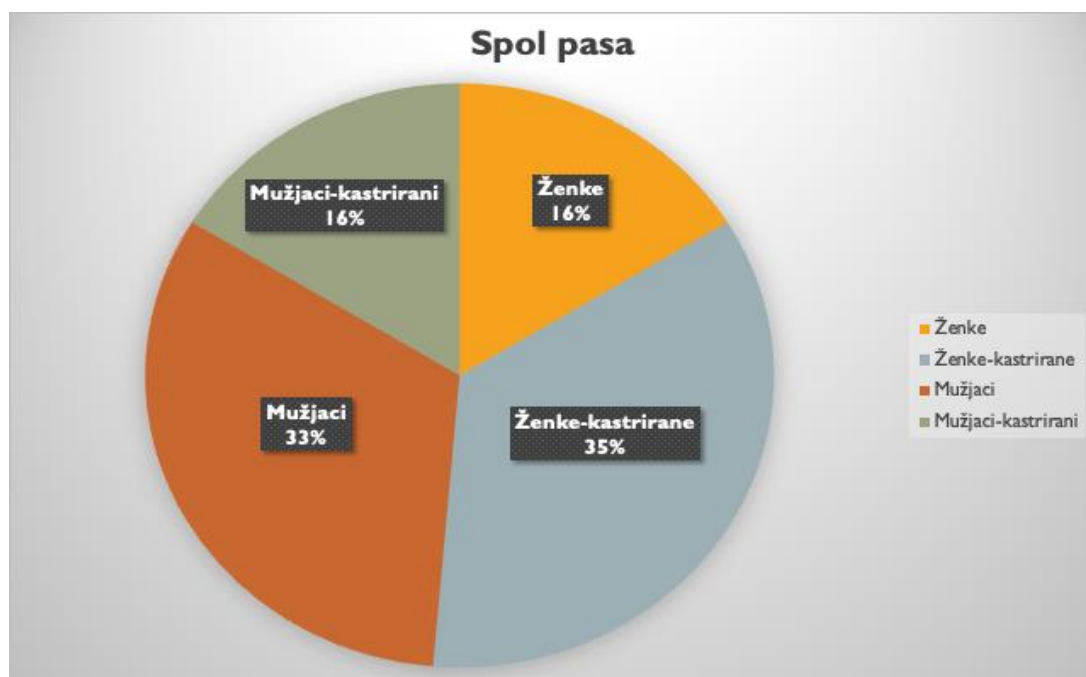
S obzirom na konačnu dijagnozu, 17 pasa svrstano je u skupinu upalnih bolesti donjih dišnih puteva, 8 pasa u skupinu neoplastičnih bolesti, 6 pasa u skupinu neupalnih/neneoplastičnih bolesti, a 6 pasa činilo je kontrolnu skupinu (slika 12).

**Distribucija pasa po skupinama bolesti**



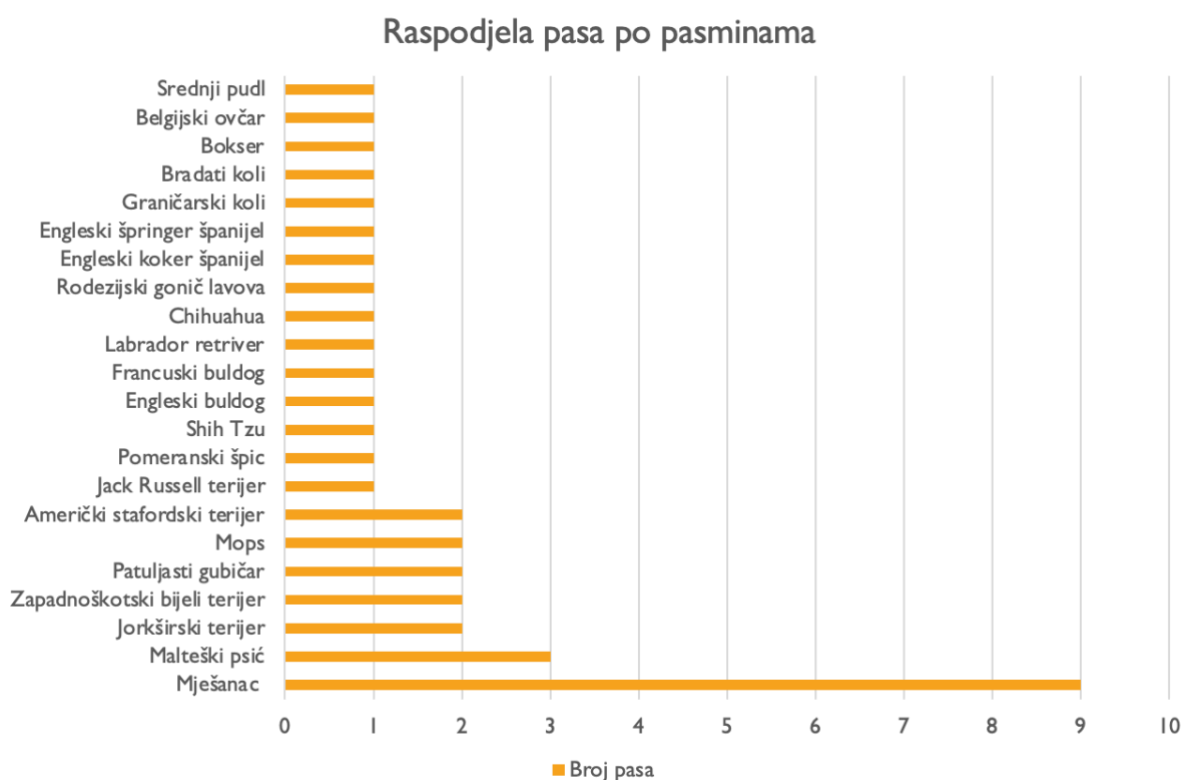
Slika 12. Kružni grafikon s prikazom distribucije pasa s obzirom na skupinu bolesti

S obzirom na spol životinja, u istraživanje je bilo uključeno 19 ženki (od kojih su 13 bile kastrirane) i 18 mužjaka (od kojih šest kastriranih) (slika 13).



Slika 13. Kružni grafikon sa prikazom raspodjele pasa prema spolu

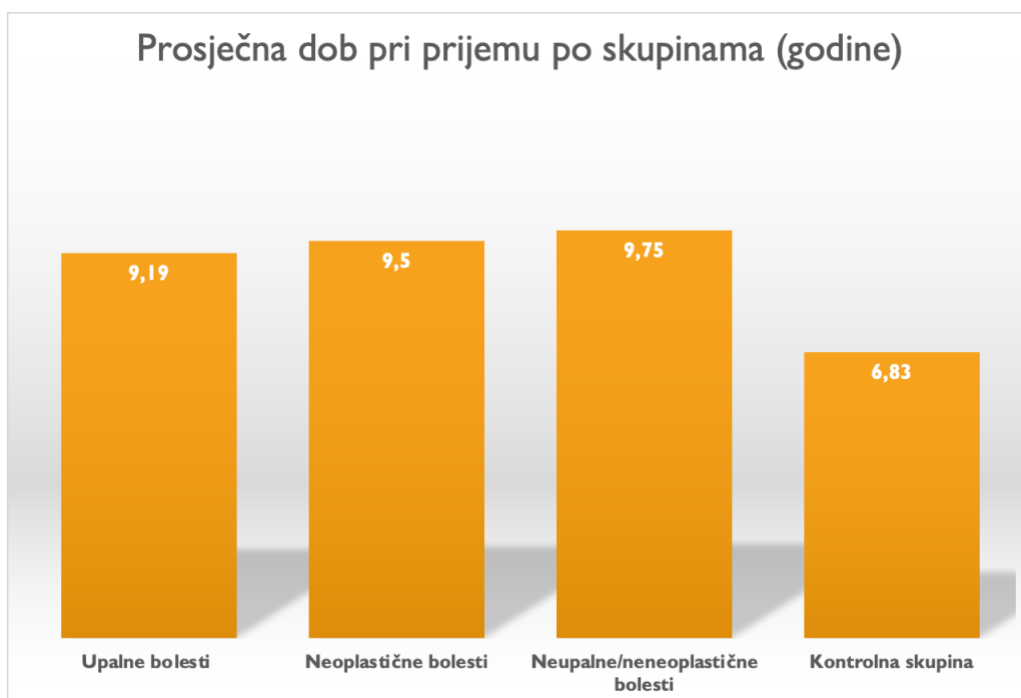
S obzirom na pasminu, najviše pasa u ovom istraživanju pripadalo je u mješance ( $N = 9$ ), zatim malteški psić ( $N = 3$ ), po dva psa pasmina zapadnoškotski bijeli terijer, jorkširski terijer, patuljasti gubičar, mops, američki stafordski terijer ( $N = 2$ ), te po jedan pas sljedećih pasmina: *jack russell* terijer, pomeranski špic, *Shih-Tzu*, engleski buldog, francuski buldog, labrador retriver, čivava, rodezijski gonič lavova, engleski koker španijel, engleski špringer španijel, graničarski koli, bradati koli, bokser, belgijski ovčar i srednji pudl (slika 14).



Slika 14. Grafički prikaz raspodjele pasa uključenih u ovo istraživanje na temelju pasmine

Starost pasa pri prijemu zabilježena je u 36/37 pasa i prosječna je starost pri pacijenata iznosila 9,19 godina (raspon: 2 – 16 godina, IQR: 5 godina). Ovisno o skupinama, prosječna dob pasa sa upalnim bolestima iznosila je 9,5 godina (raspon 3 – 13 godina, IQR: 5 godina), pasa s neoplastičnim bolestima 9,75 godina (raspon 2 – 13 godina, IQR: 3 godine), pasa s neupalnim/neneoplastičnim bolestima 10 godina (raspon: 5 – 13 godina, IQR: 2 godine), a kontrolne skupine 6,83 godine (raspon: 2 – 11 godina, IQR: 5 godina) (slika 15.).





Slika 15. Grafički prikaz prosječne dobi pri prijemu pasa u pojedinim skupinama

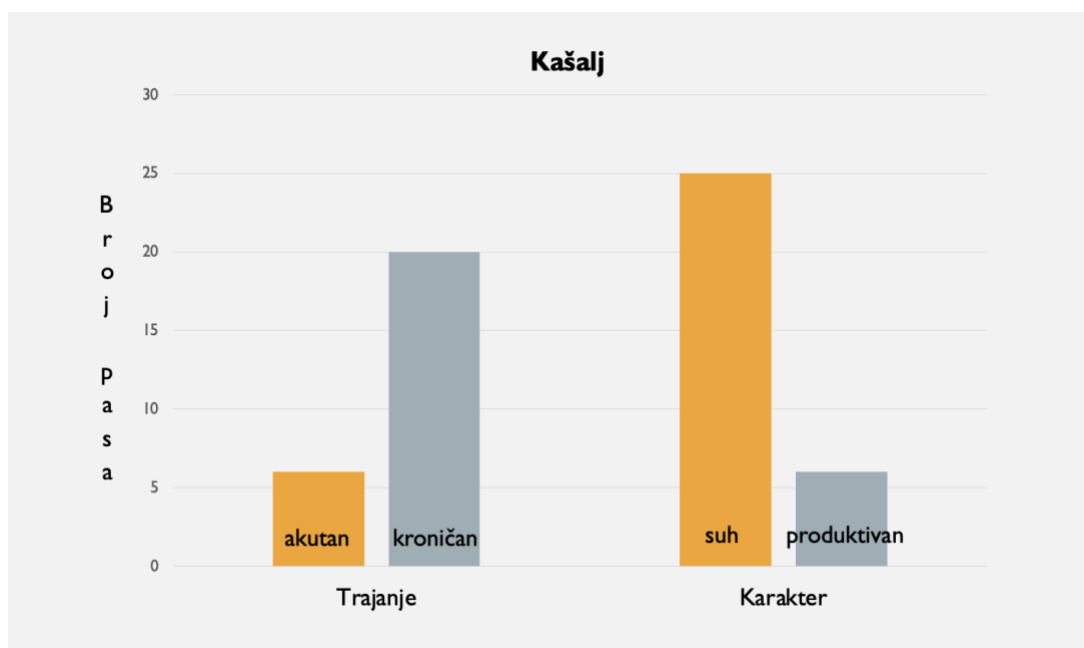
Gojno stanje, izraženo kao BCS, zabilježeno je u 35/37 pasa, s medijanom 5 (raspon: 1 – 7, IQR: 2). Starost pri prijemu zabilježena je u 36 pasa, sa srednjom vrijednošću 9,19 godina (raspon: 2 – 16 godina, IQR: 5,5 godina). Trajanje bolesti zabilježeno je u 36 pasa s medijanom od tri tjedna (raspon: 0 – 80 tjedana, IQR: 26 tjedana). Šesnaest pasa je u trenutku pregleda bilo liječeno antibioticima, a njih 10 glukokortikoidima. Od vrijednosti trijasa, rektalna temperatura pri zaprimanju mjerena je u 29 pasa, sa srednjom vrijednošću 38,7 °C (raspon: 35,8 – 40,4 °C, IQR: 0,6 °C). Frekvencija bila mjerena je u 26 pasa i u prosjeku je iznosila 115 otkucaja u minuti (raspon: 88 – 188, IQR: 21), dok je frekvencija disanja mjerena u 21 psa, s prosječnom vrijednošću od 39 udisaja u minuti (raspon: 20 – 80, IQR: 20). Tablica 10 prikazuje deskriptivnu statistiku vrijednosti anamneze, habitusa i trijasa.

Tablica 10. Deskriptivna statistika kvantitativnih podataka habitusa, anamneze i kliničkog pregleda. Min – minimum, Maks – maksimum, SD – standardna devijacija, BCS – *body condition score*.

	N	Srednja vrijednos	SD	Min	Maks	Percentili		
						25.	50. (Median)	75.

<b>BCS</b>	Upalne bolesti	17	4,53	1,18	2	7	4,00	5,00	5,00
	Neoplazme	8	4,75	1,91	1	7	4,00	5,00	6,00
	Neupalne/neoplastične bolesti	5	5,20	1,10	4	7	4,50	5,00	6,00
	Kontrola	5	5,40	1,52	4	7	4,00	5,00	7,00
<b>Starost pri prijemu</b>	Upalne bolesti	16	9,50	3,78	3	16	6,50	9,50	12,00
	Neoplazme	8	9,75	3,45	2	13	9,00	10,50	12,00
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	10,00	2,76	5	13	8,00	11,00	11,50
	Kontrola	6	6,83	3,43	2	11	4,25	6,50	10,25
<b>Trajanje bolesti (tjedni)</b>	Upalne bolesti	16	18,94	24,10	0	75	1,25	3,50	38,00
	Neoplazme	8	22,00	27,04	2	80	2,25	11,00	36,75
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	13,83	14,88	0	30	0,00	13,00	27,75
	Kontrola	6	5,00	10,35	0	26	0,00	0,50	8,75
<b>Temperatura</b>	Upalne bolesti	14	38,66	1,01	35,8	40,4	38,40	38,80	39,15
	Neoplazme	6	38,83	0,62	37,8	39,6	38,40	38,85	39,38
	Neupalne/neoplastične bolesti	4	38,65	0,41	38,2	39,2	38,30	38,60	39,05
	Kontrola	5	38,42	0,45	37,8	38,9	38,00	38,40	38,85
<b>Bilo</b>	Upalne bolesti	12	115,17	12,34	96	140	102,50	120,00	120,00
	Neoplazme	5	128,00	39,19	88	188	94,00	124,00	164,00
	Neupalne/neoplastične bolesti	4	110,00	16,17	88	124	93,00	114,00	123,00
	Kontrola	5	107,20	13,08	88	120	94,00	112,00	118,00
<b>Disanje</b>	Upalne bolesti	10	31,00	10,17	20	56	24,00	30,00	34,50
	Neoplazme	5	50,40	22,38	28	80	32,00	40,00	74,00
	Neupalne/neoplastične bolesti	1	40,00		40	40			
	Kontrola	5	42,40	14,03	24	60	30,00	40,00	56,00

Od kliničkih znakova, najčešće je bilježen kašalj, prisutan u 26/37 pasa u ovom istraživanju. Akutni kašalj (slika 16) zabilježen je u 6/37 pasa, a kronični kašalj (slika 16) u 20/37 pasa. Suhi kašalj bio je zabilježen u 25 pasa (slika 16), a produktivni u njih šest (slika 16.). Jedan je pas imao iscjedak iz očiju, a njih četiri iscjedak iz nosa. Uredan dišni šum prilikom auskultacije pluća zabilježen je u pet pasa, dok je njih 20 imalo pooštren dišni šum obostrano, a jedan pooštren dišni šum jednostrano. Hropci su zabilježeni u dva psa, kreptacije u jednoga, zvižduci dva psa, a stišan dišni šum u njih četiri. Šum nad desnom stranom srca zabilježen je u dva psa (tablica 11).



Slika 16. Grafički prikaz trajanja i karaktera kašlja

Tablica 11. Prikaz prevalencije kliničkih znakova i nalaza kliničkog pregleda (95% CI (*confidence interval*) – 95% interval pouzdanosti).

		N	%	95% CI	
Dispneja	Ne	26	70,3 %	54,4 %	83,1 %
	Da	11	29,7 %	16,9 %	45,6 %
Inapetencija	Ne	26	70,3 %	54,4 %	83,1 %
	Da	11	29,7 %	16,9 %	45,6 %
Glukokortikoidi	Ne	27	73,0 %	57,3 %	85,2 %
	Da	10	27,0 %	14,8 %	42,7 %
Antibiotici	Ne	21	56,8 %	40,8 %	71,7 %
	Da	16	43,2 %	28,3 %	59,2 %
Drugi klinički znakovi	Ne	17	45,9 %	30,7 %	61,8 %
	Da	20	54,1 %	38,2 %	69,3 %

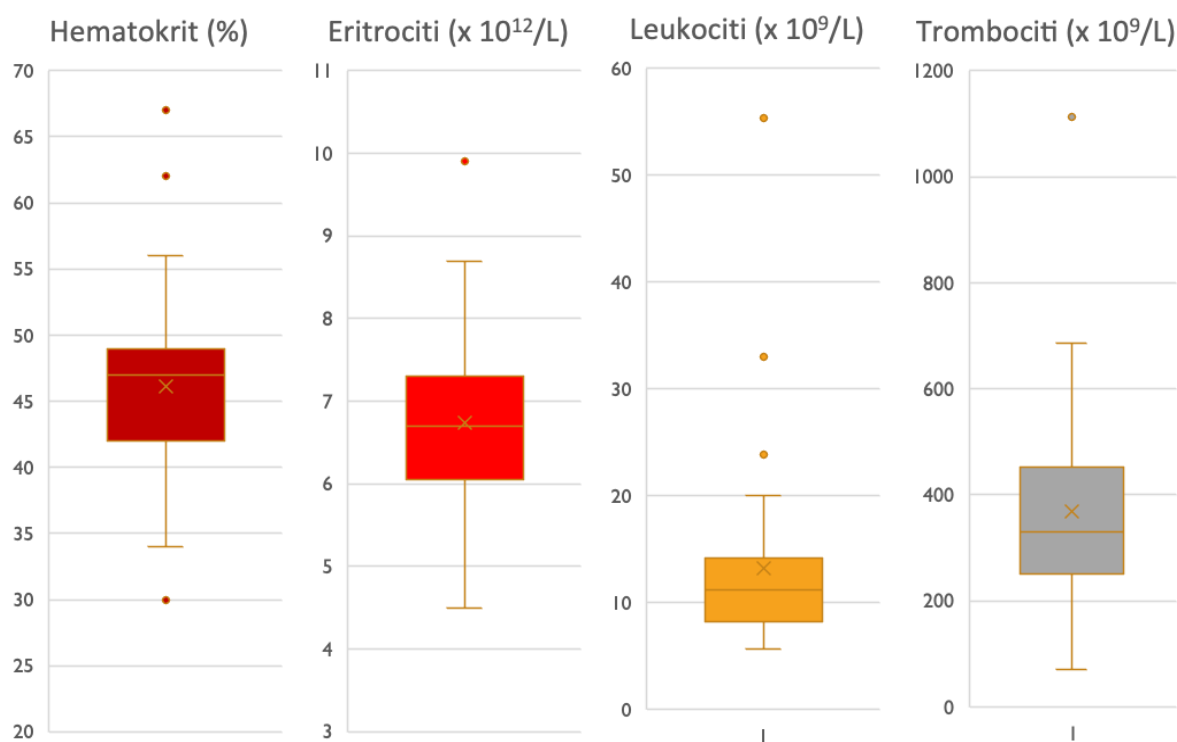
Iscjedak oči	Ne	36	97,3 %	88,1 %	99,7 %
	Da	1	2,7 %	0,3 %	11,9 %
Iscjedak nos	Ne	33	89,2 %	76,3 %	96,2 %
	Da	4	10,8 %	3,8 %	23,7 %
Uredan dišni šum	Ne	32	86,5 %	72,9 %	94,7 %
	Da	5	13,5 %	5,3 %	27,1 %
Pooštren dišni šum jednostrano	Ne	36	97,3 %	88,1 %	99,7 %
	Da	1	2,7 %	0,3 %	11,9 %
Pooštren dišni šum obostrano	Ne	20	54,1 %	38,2 %	69,3 %
	Da	17	45,9 %	30,7 %	61,8 %
Hropci	Ne	35	94,6 %	83,8 %	98,9 %
	Da	2	5,4 %	1,1 %	16,2 %
Krepitecije	Ne	36	97,3 %	88,1 %	99,7 %
	Da	1	2,7 %	0,3 %	11,9 %
Stišan dišni šum	Ne	33	89,2 %	76,3 %	96,2 %
	Da	4	10,8 %	3,8 %	23,7 %
Zvižduci	Ne	35	94,6 %	83,8 %	98,9 %
	Da	2	5,4 %	1,1 %	16,2 %
Šum, desna strana srca	Ne	35	94,6 %	83,8 %	98,9 %
	Da	2	5,4 %	1,1 %	16,2 %

## 5.2. REZULTATI LABORATORIJSKIH PRETRAGA

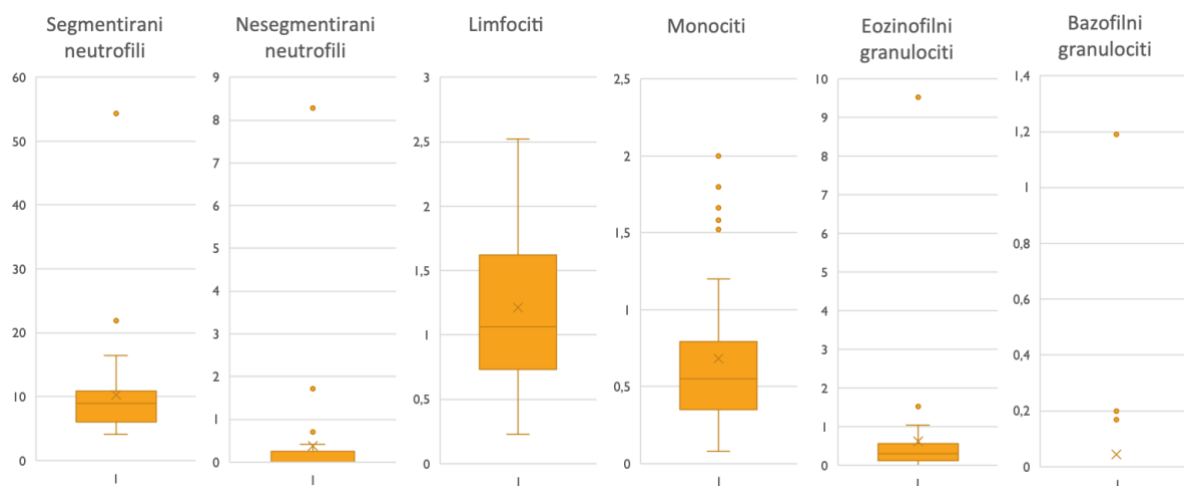
Kompletna krvna slika (hemogram) određena je u svih 37 pasa uključenih u istraživanje, dok je serumska koncentracija CRP-a određena u 30/37 pasa.

Prosječna vrijednost hematokrita iznosila je 46,1% (medijan: 47 %, raspon: 30 – 67 %, IQR: 7 %). Prosječan broj eritrocita iznosio je  $6,8 \times 10^{12}/L$  (raspon: 4 – 9,9, IQR: 1,2). Prosječan broj leukocita bio je  $13,2 \times 10^9/L$  (raspon: 5,6 – 55,4, IQR: 6) (slika 17). Po udjelima

leukocita, najbrojniji su bili segmentirani neutrofilni granulociti, s prosječnim brojem  $10,3 \times 10^9/L$  (medijan: 8,9; raspon: 4,1 – 54,3; IQR: 4,8), zatim limfociti s prosječnim brojem  $2,3 \times 10^9/L$  (medijan: 1,02; raspon: 0,23 – 44; IQR: 0,87), monociti s prosječnim brojem  $0,68 \times 10^9/L$  (medijan: 0,55; raspon: 0,08 – 2; IQR: 0,45) i eozinofilni granulociti s prosječnim brojem  $0,61 \times 10^9/L$  (medijan: 0,29; raspon: 0 – 9,52; IQR: 0,45), dok su se rjeđe nalazili nesegmentirani neutrofili sa srednjom vrijednošću  $1 \times 10^9/L$  (medijan: 0, raspon: 0 – 24; IQR: 0,27) i bazofilni granulociti s prosječnim brojem  $0,04 \times 10^9/L$  (medijan: 0; raspon: 0 – 1,19; IQR: 0-0) (slika 18). Prosječan broj trombocita iznosio je  $369 \times 10^9/L$  (medijan: 330, raspon: 71 – 1112, IQR: 200) (slika 17).

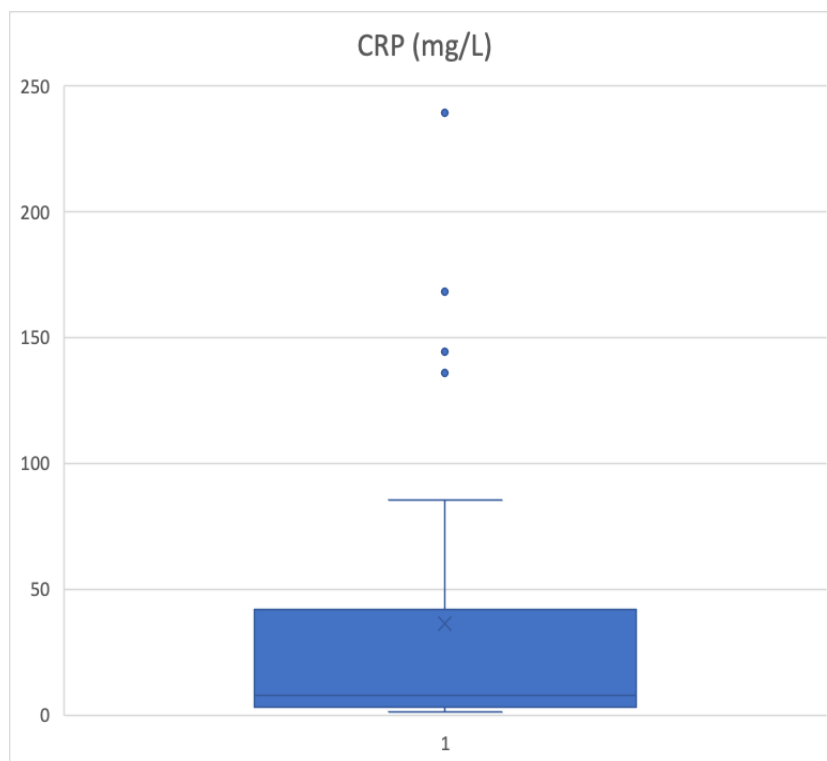


Slika 17. Grafikon s okvirima i brkovima koji pokazuje vrijednosti hematokrita, eritrocita, leukocita i trombocita istraživane populacije pasa. Pravokutnik označava 25 – 75 % kvartil, crta kroz pravokutnik medijan, horizontalne linije minimalnu i maksimalnu vrijednost (isključujući *outlier*), x označava aritmetičku sredinu, a kružići *outliere*.



Slika 18. Grafikon s okvirima i brkovima koji pokazuje broj pojedinih tipova leukocita (izraženo u  $\times 10^9/L$ ). Pravokutnik označava 25 – 75 % kvartil, crta kroz pravokutnik medijan, horizontalne linije minimalnu i maksimalnu vrijednost (isključujući *outlier*), x označava aritmetičku sredinu, a kružići *outliere*.

Srednja vrijednost CRP iznosila je 36,1 mg/L (medijan: 7,8; raspon: 1 – 239,2; IQR: 38,6) (slika 19).



Slika 19. Grafikon s okvirima i brkovima koji prikazuje vrijednosti CRP-a pretraživane populacije pasa. Pravokutnik označava 25 – 75 % kvartil, crta kroz pravokutnik medijan, horizontalne linije minimalnu i maksimalnu vrijednost (isključujući *outlier*), x označava aritmetičku sredinu, a kružići *outliere*.

### 5.3. REZULTATI PARAZITOLŠKIH PRETRAGA

Koprološka pretraga rađena je u 18/37 pasa i nalaz je bio negativan u 16/18 slučajeva. Stolica dva psa pokazala je prisutnost parazita *Giardia duodenalis*, dok prisutnost razvojnih stadija oblića povezivanih s respiratornim invazijama u pasa (*Angiostrongylus vasorum* i *Crenosoma vulpis*) nije zabilježena u pasa u ovom istraživanju.

IDEXX Snap<sup>®</sup> 4Dx Plus test proveden je u 30/37 pasa, a prisutnost antigena srčanog crva (*D. immitis*) nije zabilježena ni u jednom uzorku. U pet od 30 uzoraka pronađena su protutijela na parazite roda *Anaplasma*.

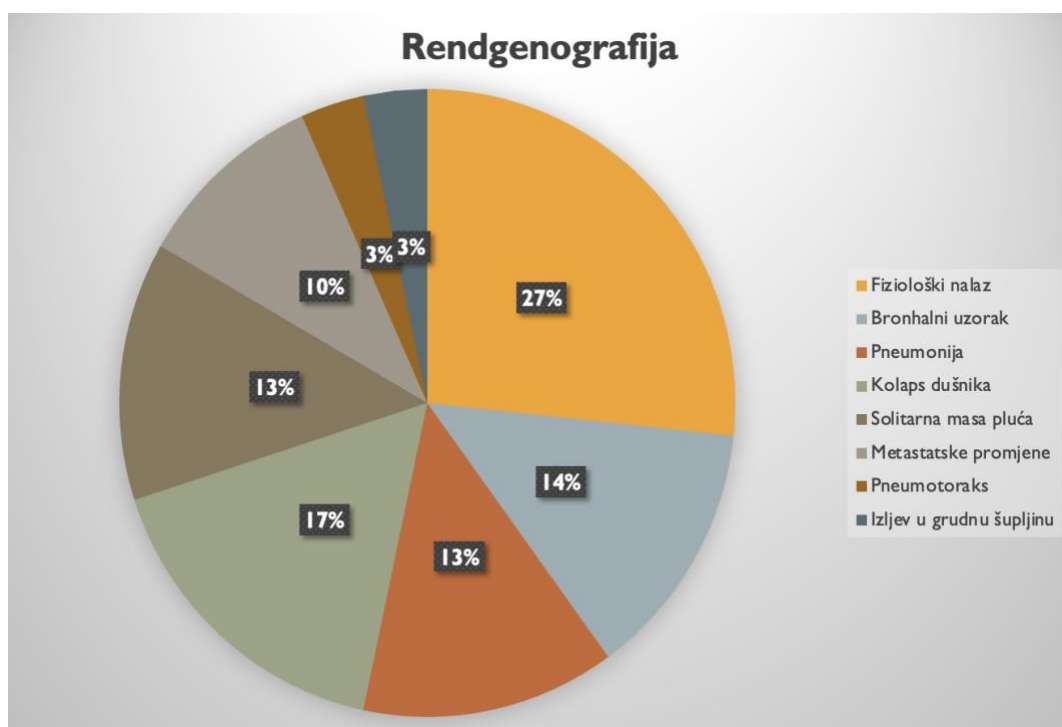
IDEXX Angio Detect test proveden je s ciljem dokazivanja antigena *A. vasorum* u 31/36 pasa i nalaz je bio negativan u svim slučajevima (tablica 12.).

Tablica 12. Prikaz rezultata parazitoloških dijagnostičkih metoda. 95% CI (*confidence interval*) – 95% interval pouzdanosti

Dijagnostički test	Pozitivan	N	%	95% CI	
Snap 4Dx plus - Anaplasma	Ne	25	83,3 %	67,3 %	93,3 %
	Da	5	16,7 %	6,7 %	32,7 %
Angio snap test	Ne	31	100,0 %		
	Da	0	0,0 %		
Koprološka pretraga - Giardia	Ne	16	88,9 %	68,9 %	97,6 %
	Da	2	11,1 %	2,4 %	31,1 %

#### 5.4. REZULTATI SLIKOVNE DIJAGNOSTIKE I ENDOSKOPSKE PRETRAGE DUŠNIKA I BRONHA

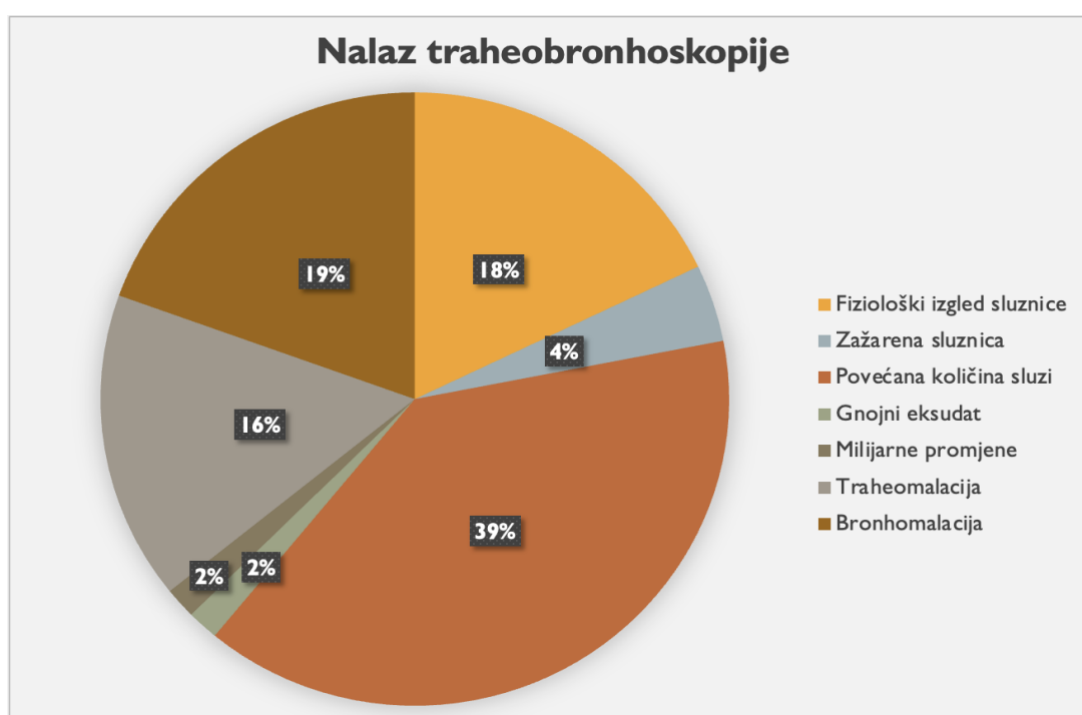
Slikovna dijagnostika provedena je u 36/37 pasa u ovom istraživanju. U svih 36 proveden je RTG prsne šupljine (slika 20), a u njih sedam još i CT prsne i trbušne šupljine. U 8/36 pasa nalaz RTG-a bio je bez osobitosti. Nalaz kompatibilan s bronhitisom zabilježen je u 4/36 pasa, nalaz kompatibilan s pneumonijom u 4/36, s kolapsom dušnika u 5/36 pasa. U jednog je psa pneumonija dijagnosticirana CT pretragom, a prethodno nije detektirana RTG pretragom. Megaezofagus je zabilježen RTG pretragom u dva psa. Povećanje desne strane srca zabilježeno je RTG pretragom u dva psa, od kojih je jedan imao i nalaz kompatibilan s bronhitisom. Solitarna masa u plućima kompatibilna s nalazom primarne plućne novotvorine evidentirana je u četiri psa, dok je solitarna metastatska masa s nalazom litičnih promjena prve sternebre nađena u jednog psa. Multifokalne promjene kompatibilne s metastatskim promjenama zabilježene su u 3/36 pasa. Pneumotoraks je zabilježen RTG-om u jednog psa. U jednog su psa RTG i CT zabilježili blagi obostrani izljev u prsnu šupljinu. CT kao metoda napredne slikovne dijagnostike pomogla je u identifikaciji metastatskih promjena u četiri psa sa sumnjom na primarni ili sekundarni neoplastični proces na plućima. CT je pomogao u identifikaciji kolapsa lijevog glavnog bronha u jednog psa s urednim nalazom RTG-a.





Slika 20. Grafički prikaz nalaza rendgenološke pretrage dišnog sustava

Traheobronhoskopija je provedena u 34/37 pasa u ovom istraživanju. Izgled sluznice procijenjen je kao fiziološki u 11/34 pasa, dok je sluznica bila zažarena u 19 pasa. Od eksudata, najčešće je zabilježena povećana količina sluzi, detektirana u 24/34 pasa, dok je nalaz gnojnog eksudata zabilježen u jednog psa. Nalaz neravne površine sluznice s vidljivim milijarnim promjenama zabilježen je u jednog psa. Traheomalacija, odnosno kolaps dušnika zabilježen je u 10/24 psa, dok je bronhomalacija, odnosno kolaps bronha, zabilježen u njih 12 (slika 21).

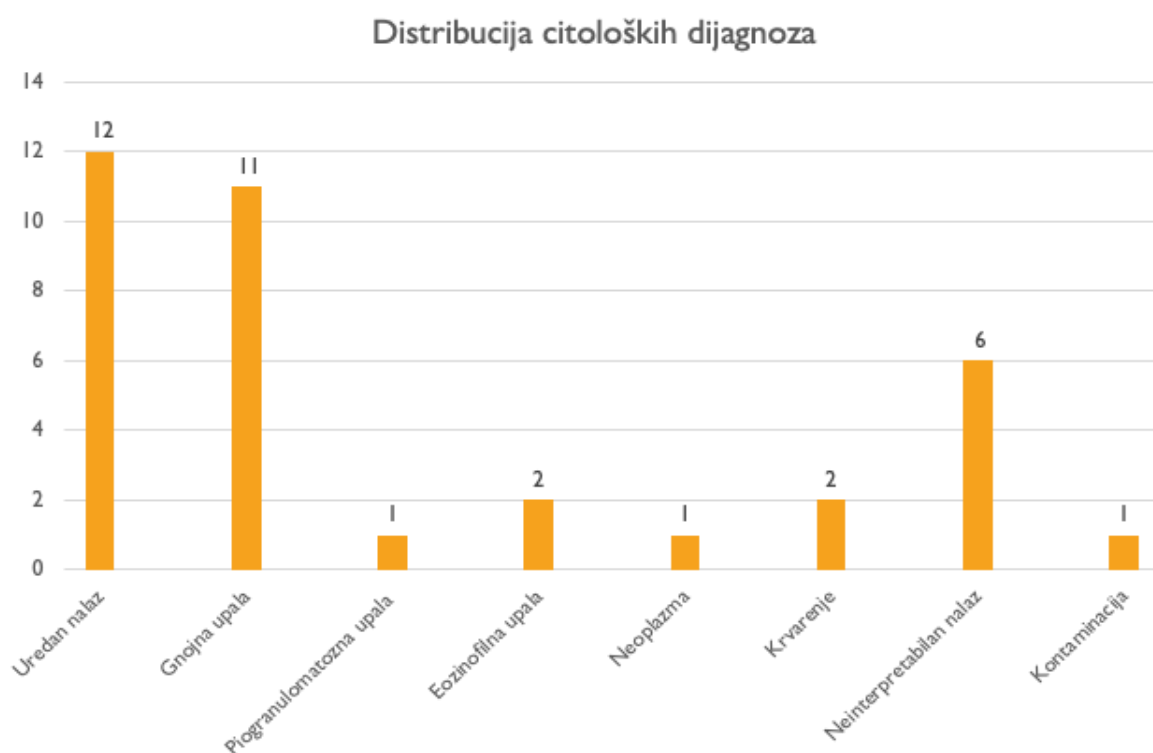


Slika 21. Grafički prikaz nalaza bronhoskopske pretrage

## 5.5. REZULTATI CITOLOŠKE, BAKTERIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE PRETRAGE UZORAKA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA

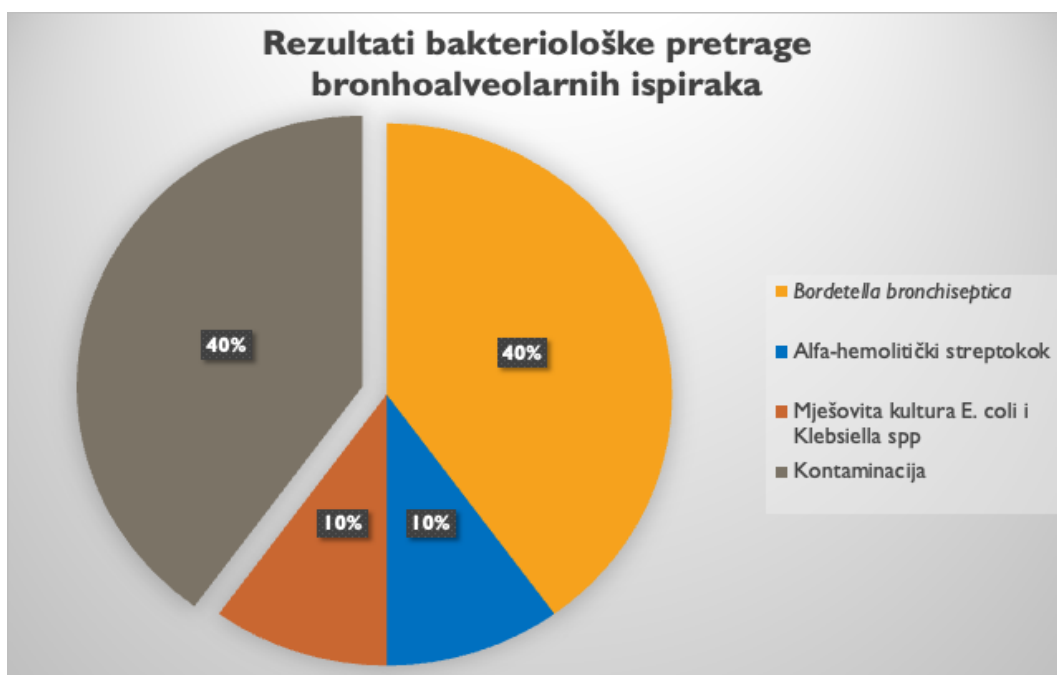
Citološka pretraga preparata dobivenih bronhoalveolarnim ispiranjem bila je provedena u 36/37 pasa u ovom istraživanju. Nalaz nije bio interpretabilan u 6/36 uzoraka zbog izrazito niske staničnosti. Uredan nalaz zabilježen je u 12/36 uzoraka. Najčešći patološki nalaz bio je u obliku gnojne (neutrofilne) upale u 11/36 uzoraka. U jednom od uzoraka s prisutnom neutrofilnom upalom prikazane su i kokoidne bakterije. Piogranulomatozna upala zabilježena je u jednog psa. Eozinofilna upala zabilježena je u dva psa. Krvarenje je zabilježeno u dva psa.

Neoplazma, s detekcijom atipičnih stanica i kriterija malignosti evidentirana je u jednog psa, s populacijom okruglih stanica koje svojom morfologijom odgovaraju neoplastično promijenjenim histiocitima. Orofaringealna je kontaminacija zabilježena u jednom slučaju (slika 22).



Slika 22. Grafički prikaz distribucije ovisno o postignutoj citološkoj dijagnozi

Rezultati bakteriološke pretrage uzoraka bronhoalveolarnog ispirka bili su dostupni za 36/37 pasa u ovom istraživanju. Rezultat pretrage bio je negativan u 26/36 uzoraka. Najčešći uzročnik koji je identificiran jest bakterija *Bordetella bronchiseptica* u četiri uzorka. Alfa-hemolitički streptokok izoliran je iz jednog uzorka. U četiri uzoraka nalaz je odgovarao kontaminaciji (porast mješovitih kultura), dok je iz jednog uzorka izdvojena mješovita kultura *E. coli* i *Klebsiella* spp. (slika 23).



Slika 23. Grafički prikaz bakterija izdvojenih mikrobiološkom pretragom bronhoalveolarnih ispiraka pretražene populacije pasa.

Rezultati mikološke pretrage bronhoalveolarnog ispirka bili su dostupni za 36/37 pasa. Rezultat je bio negativan u 35/36 uzoraka, a u jednom je uzorku zabilježen porast gljivica roda *Aspergillus*.

## 5.6. REZULTATI MOLEKULARNE PRETRAGE UZORAKA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA

Metodom PCR pretraženo je 37 uzoraka bronhoalveolarnog ispirka pasa u uključenih u ovo istraživanje.

Nisu dokazane nukleinske kiseline sljedećih virusa povezanih s CIRDC-om u pasa: pseći adenovirus tipa 2 (CAV-2), virus štenećaka (engl. *canine distemper virus*, CDV), pseći herpesvirus 1 (CaHV-1), te pseći virus parainfluence (CPiV).

Dokazana je prisutnost nukleinske kiseline bakterije *B. bronchiseptica* u uzorku bronhoalveolarnog ispirka jednog psa, koji je imao i dokaz te bakterije bakteriološkom pretragom.

U 11 uzoraka dokazana je prisutnost nukleinskih kiselina roda *Mycoplasma* spp., dok ni u jednom uzorku nije dokazana prisutnost nukleinske kiseline vrste *Mycoplasma cynos*. Pregled rezultata bakteriološke i molekularne pretrage bronhoalveolarnih ispiraka nalazi se u tablici 13.

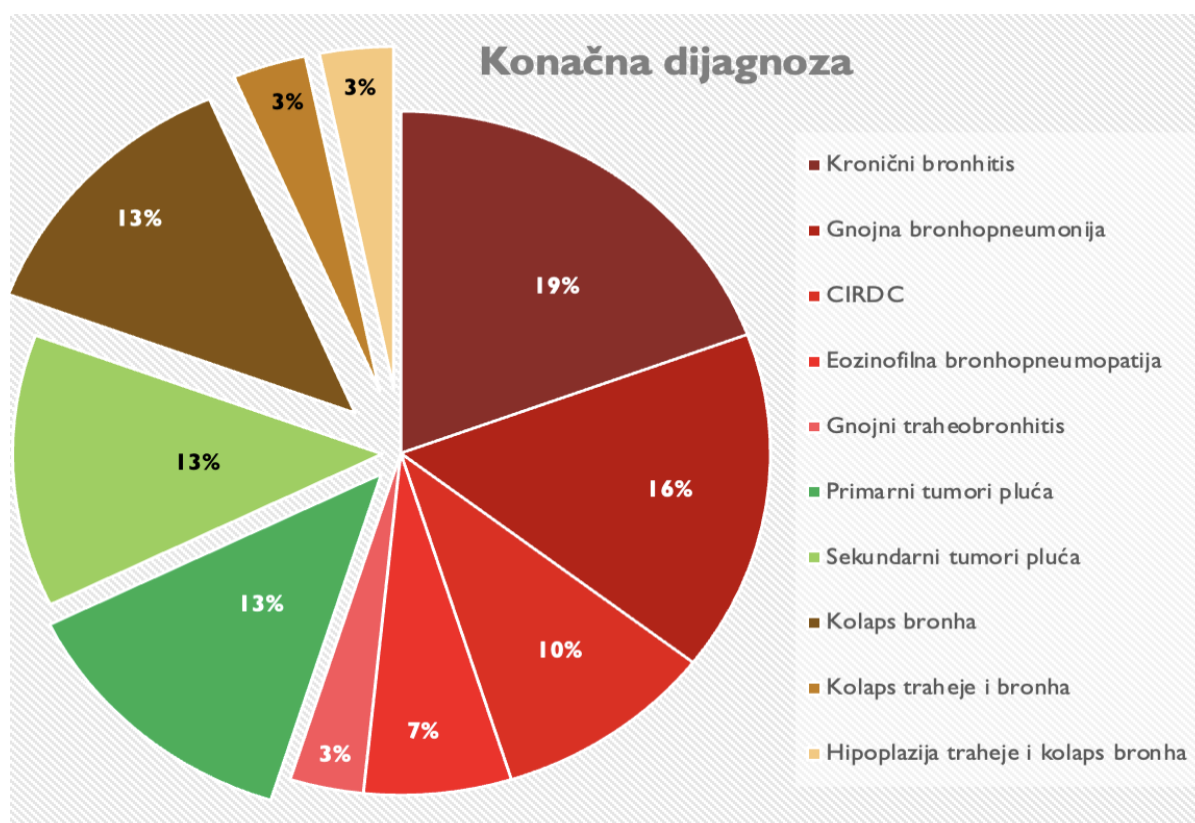
Tablica 13. Prikaz rezultata PCR pretrage na uzročnike povezane s CIRDC-om i rezultat bakteriološke pretrage na uzročnika *B. bronchyseptica*. Žuto su označeni pozitivni rezultati. (PCR – lančana reakcija polimerazom, CaHV – pseći herpesvirus, CPiV – pseći virus parainfluence, CDV – virus štenecćaka, CAV – pseći adenovirus, bakt. – bakteriološka pretraga)

Broj pacijenta	PCR <i>Mycopl asma</i> spp.	PCR <i>M. cynos</i>	PCR CaHV-1	PCR CPiV	PCR CAV	PCR CDV	PCR <i>B. bronchyseptica</i>	Bakt. <i>B. bronchyseptica</i>
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	+
4	+	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-

16	+	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	/
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	-	-	-	-	-	-	+
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-

## 5.7. KONAČNA DIJAGNOZA

U ovom istraživanju najčešće su dijagnosticirane bolesti iz skupine upalnih bolesti donjih dišnih puteva. U ovoj skupini najučestalije je dijagnosticiran kronični bronhitis (N = 6), zatim gnojna bronhopneumonija (N = 5), CIRDC (N = 3), eozinofilna bronhopneumopatija (N = 2) te jedan slučaj gnojnog traheobronhitisa. Iz skupine neoplastičnih bolesti podjednako su dijagnosticirane primarne neoplazme pluća (N = 4) i sekundarne (metastatske) neoplazme pluća (N = 4). Iz skupine neupalnih i neneoplastičnih bolesti najčešće je dijagnosticiran kolaps bronha (N = 6), od kojih je jedan pas također imao i hipoplaziju dušnika, a drugi još i kolaps dušnika uz kolaps bronha (slika 24). U kontrolnoj skupini nalazili su se psi sa sljedećim konačnim dijagnozama: gnojni rinitis, bilateralna paraliza larinksa, brahicefalični sindrom opstrukcije dišnih puteva, bilateralni pneumotoraks s istodobnim izljevom u prsnu šupljinu nepoznate etiologije, izljev u prsnu šupljinu nepoznate etiologije i primarni megaezofagus.



Slika 24. Grafički prikaz postignutih konačnih dijagnoza u pasa s bolestima donjih dišnih puteva. Nijansama crvene boje označene su bolesti iz upalne skupine, zelene iz neoplastične skupine, a nijansama smeđe boje one iz neupalne/neneoplastične skupine.

(CIRDC – kompleks zaraznih dišnih bolesti pasa, kašalj štenare, zarazni traheobronhitis pasa)

## 5.8. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA

Od neparametrijskih podataka, statistički su po glavnim skupinama (U, N, NN i K) uspoređene sljedeće varijable: spol, kastracijski status, kašalj (akutni i kronični, suh i produktivan), dispneja, inapetencija, davanje glukokortikoida i antibiotika prije dijagnostike, iscjedak iz očiju i nosa, nalazi prilikom kliničkog pregleda (dišni šum, hropci, krepitacije, zvižduci, šum nad desnom stranom srca), te nalazi dijagnostičkih pretraga (4Dx test pozitivan na protutijela za rod *Anaplasma*, patološke promjene detektirane slikovnom dijagnostikom, pozitivan nalaz koprološke pretrage na parazite roda *Giardia*, pozitivan nalaz bakteriološke i mikološke pretrage te patološki nalaz citološke pretrage bronhoalveolarnog ispirka, patološke promjene sluznice zabilježene endoskopijom dišnog sustava, traheomalacija i bronhomalacija zabilježene endoskopijom, rezultati PCR pretraga na uzročnike povezane s CIRDC-om) (tablica 14).

Fischer-Freeman-Haltonovim egzaktnim testom dobiveni su sljedeći rezultati. Suhu kašalj bio je statistički značajno češće prisutan u pasa s upalnim bolestima (15/17; 88,2 %), a najrjeđe u kontrolnoj skupini (1/5; 16,7 %) ( $p = 0,004$ ) (tablica 14). Patološki nalaz citološke pretrage bronhoalveolarnog ispirka bio je statistički značajno češće prisutan u skupini s upalnim bolestima (12/15; 80,0 %), kao i onoj s neoplastičnima u odnosu na kontrolnu skupinu (5/7; 71,4 %), u kojoj nije bio prisutan ( $p = 0,008$ ) (tablica 15). Nije zabilježena statistički značajna razlika među molekularnom detekcijom uzročnika povezanih s CIRDC-om i pojedinih skupina (tablica 16).

Tablica 14. Rezultati statističke obrade podataka zastupljenosti kliničkih znakova i nalaza kliničkog pregleda te dijagnostičkih pretraga, Fischer-Freeman-Haltonov egzaktni test. Podebljane i označene jednom zvjezdicom statistički su značajne varijable gdje je  $p < 0,05$ , a s dvjema zvjezdicama gdje je  $p < 0,01$ . (♂ - mužjaci, ♀ - ženke)

## Dijagnoza

		Upalne bolesti N = 17		Neoplazme N = 8		Neupalne/ neneoplastične bolesti N = 6		Kontrola N = 6		P
		N	%	N	%	N	%	N	%	
		Spol	♂	7	41,2%	4	50,0%	3	50,0%	
	♀	10	58,8%	4	50,0%	3	50,0%	2	33,3%	
Kastrirani	Ne	8	47,1%	2	25,0%	4	66,7%	4	66,7%	0,384
	Da	9	52,9%	6	75,0%	2	33,3%	2	33,3%	
Akutni kašalj	Ne	14	82,4%	8	100,0%	4	66,7%	5	83,3%	0,440
	Da	3	17,6%	0	0,0%	2	33,3%	1	16,7%	
Kronični kašalj	Ne	5	29,4%	3	37,5%	4	66,7%	5	83,3%	0,110
	Da	12	70,6%	5	62,5%	2	33,3%	1	16,7%	
Suhi kašalj	Ne	2	11,8%	4	50,0%	1	16,7%	5	83,3%	<b>0,004*</b>
	Da	15	88,2%	4	50,0%	5	83,3%	1	16,7%	
Produktivni kašalj	Ne	15	88,2%	7	87,5%	5	83,3%	4	66,7%	0,660
	Da	2	11,8%	1	12,5%	1	16,7%	2	33,3%	
Dispneja	Ne	14	82,4%	5	62,5%	4	66,7%	3	50,0%	0,414
	Da	3	17,6%	3	37,5%	2	33,3%	3	50,0%	
Inapetenca	Ne	12	70,6%	5	62,5%	6	100,0%	3	50,0%	0,305
	Da	5	29,4%	3	37,5%	0	0,0%	3	50,0%	
Glukokortikoidi	Ne	11	64,7%	5	62,5%	5	83,3%	6	100,0%	0,330
	Da	6	35,3%	3	37,5%	1	16,7%	0	0,0%	
Antibiotici	Ne	8	47,1%	4	50,0%	4	66,7%	5	83,3%	0,472
	Da	9	52,9%	4	50,0%	2	33,3%	1	16,7%	
Iscjedak, oči	Ne	16	94,1%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	1,000
	Da	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	



Iscjedak, nos	Ne	14	82,4%	8	100,0%	6	100,0%	5	83,3%	0,572
	Da	3	17,6%	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	
Uredan dišni šum	Ne	14	82,4%	7	87,5%	5	83,3%	6	100,0%	0,910
	Da	3	17,6%	1	12,5%	1	16,7%	0	0,0%	
Pooštren dišni šum, jednostrano	Ne	17	100,0%	8	100,0%	6	100,0%	5	83,3%	0,324
	Da	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	
Pooštren dišni šum, obostrano	Ne	8	47,1%	5	62,5%	3	50,0%	4	66,7%	0,867
	Da	9	52,9%	3	37,5%	3	50,0%	2	33,3%	
Hropci	Ne	16	94,1%	8	100,0%	6	100,0%	5	83,3%	0,592
	Da	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	
Krepitecije	Ne	16	94,1%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	1,000
	Da	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Stišan dišni šum	Ne	16	94,1%	7	87,5%	6	100,0%	4	66,7%	0,268
	Da	1	5,9%	1	12,5%	0	0,0%	2	33,3%	
Zvižduci	Ne	16	94,1%	8	100,0%	6	100,0%	5	83,3%	0,592
	Da	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	
Šum, desno srce	Ne	16	94,1%	8	100,0%	6	100,0%	5	83,3%	0,592
	Da	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	1	16,7%	

Tablica 15. Rezultati statističke obrade podataka dijagnostičkih pretraga, Fischer-Freeman-Haltonov egzaktni test. Podebljane su i označene jednom zvjezdicom statistički značajne varijable gdje je  $p < 0,05$ , a s dvjema zvjezdicama gdje je  $p < 0,01$ . (BAL – bronhoalveolarna lavaža)

## Dijagnoza

		Upalne bolesti N = 17		Neoplazme N = 8		Neupalne/ neneoplastične bolesti N = 6		Kontrola N = 6		P
		N	%	N	%	N	%	N	%	
4dx Anaplasma protutijela	Ne	14	93,3%	3	60,0%	4	80,0%	4	80,0%	0,208
	Da	1	6,7%	2	40,0%	1	20,0%	1	20,0%	
Slikovna dijagnostika - patološke promjene	Ne	5	31,3%	0	0,0%	2	33,3%	1	16,7%	0,301
	Da	11	68,8%	8	100,0%	4	66,7%	5	83,3%	
Koprološka pretraga - Giardia	Ne	9	100,0%	2	100,0%	3	75,0%	2	66,7%	0,235
	Da	0	0,0%	0	0,0%	1	25,0%	1	33,3%	
Pozitivan bakteriološki nalaz BAL	Ne	10	62,5%	7	100,0%	5	100,0%	4	80,0%	0,149
	Da	6	37,5%	0	0,0%	0	0,0%	1	20,0%	
Pozitivan mikološki nalaz BAL	Ne	16	94,1%	8	100,0%	6	100,0%	5	100,0%	1,000
	Da	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
Patološki citološki nalaz BAL	Ne	3	20,0%	2	28,6%	3	75,0%	4	100,0%	<b>0,008**</b>
	Da	12	80,0%	5	71,4%	1	25,0%	0	0,0%	
Endoskopija - patološki nalaz sluznice	Ne	3	18,8%	2	33,3%	3	50,0%	3	50,0%	0,413
	Da	13	81,3%	4	66,7%	3	50,0%	3	50,0%	
Endoskopija - Sluz	Ne	2	12,5%	2	33,3%	3	50,0%	3	50,0%	0,124
	Da	14	87,5%	4	66,7%	3	50,0%	3	50,0%	
Endoskopija - Traheomalacija	Ne	10	62,5%	5	83,3%	4	66,7%	5	83,3%	0,818
	Da	6	37,5%	1	16,7%	2	33,3%	1	16,7%	
Endoskopija - Bronhomalacija	Ne	11	68,8%	5	83,3%	1	16,7%	5	83,3%	0,058
	Da	5	31,3%	1	16,7%	5	83,3%	1	16,7%	

Tablica 16. Rezultati statističke obrade podataka molekularne pretrage na uzročnike povezane s CIRDC-om, Fischer-Freeman-Haltonov egzaktni test. Podebljane su i označene jednom zvjezdicom statistički značajne varijable gdje je  $p < 0,05$ , a dvjema zvjezdicama gdje je  $p <$

0,01. (CIRDC – kompleks zaraznih dišnih bolesti pasa, kašalj štenare, zarazni traheobronhitis pasa, PCR – lančana reakcija polimerazom, CaHV – pseći herpesvirus, CPiV – pseći virus parainfluence, CDV – virus štenećaka, CAV – pseći adenovirus)

<b>Dijagnoza</b>										
		Upalne bolesti N = 17		Neoplazme N = 8		Neupalne/ neneoplastične bolesti N = 6		Kontrola N = 6		P
		N	%	N	%	N	%	N	%	
PCR <i>Mycoplasma</i> spp.	Ne	11	64,7%	7	87,5%	3	50,0%	5	83,3%	0,442
	Da	6	35,3%	1	12,5%	3	50,0%	1	16,7%	
PCR <i>Mycoplasma</i> <i>cynos</i>	Ne	17	100,0%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	/
	Da	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
PCR <i>B.</i> <i>bronchiseptica</i>	Ne	16	94,1%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	1,000
	Da	1	5,9%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
PCR CaHV-1	Ne	17	100,0%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	/
	Da	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
PCR CPiV	Ne	17	100,0%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	/
	Da	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
PCR CDV	Ne	17	100,0%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	/
	Da	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
PCR CAV	Ne	17	100,0%	8	100,0%	6	100,0%	6	100,0%	/

Razlike u laboratorijskim vrijednostima hemograma (hematokrit, broj eritrocita, leukocita i neutrofila) u ispitivanih pasa obzirom na osnovne skupine dijagnoza pretražene su Kruskal-Wallisovim testom i prikazane u tablici 17. Značajne su razlike zabilježene u vrijednostima hematokrita gdje su psi u skupini neoplastičnih bolesti imali značajno niže

vrijednosti u odnosu na ostale skupine ( $p = 0,049$ ), te u vrijednostima CRP gdje su psi te skupine imali značajno veće vrijednosti u odnosu na ostale skupine ( $p = 0,026$ ).

Tablica 17. Razlike u laboratorijskim vrijednostima hemograma i CRP-a u ispitivanih pasa s obzirom na osnovne dijagnoze: Kruskal-Wallisov test. (Min – minimum, Maks – maksimum, SD – standardna devijacija, CRP – C reaktivni protein)

	N	Srednja vrijednos	SD	Min	Maks	Percentili			
						25.	50. (Median)	75.	
<b>Hematokrit</b>	Upalne bolesti	17	46,35	5,40	36	56	44,00	47,00	49,50
	Neoplazme	8	40,63	6,23	30	49	35,50	41,50	45,75
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	52,67	9,85	41	67	45,50	49,50	63,25
	Kontrola	6	46,17	2,56	43	49	43,75	46,00	49,00
<b>Eritrociti</b>	Upalne bolesti	17	6,79	0,81	4,9	8,2	6,40	6,80	7,30
	Neoplazme	8	6,00	0,89	4,5	7,3	5,40	6,00	6,80
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	7,72	1,41	5,9	9,9	6,65	7,45	9,00
	Kontrola	6	6,65	0,59	6,1	7,5	6,10	6,50	7,28
<b>Leukociti</b>	Upalne bolesti	17	15,78	12,47	5,6	55,4	8,30	11,80	19,50
	Neoplazme	8	11,85	3,87	6,3	18,0	7,85	12,40	14,18
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	12,28	2,80	9,4	17,2	10,45	11,25	14,65
	Kontrola	6	8,43	1,86	6,5	11,8	7,18	7,90	9,78
<b>Segmentirani neutrofili</b>	Upalne bolesti	17	12,28	11,80	4,09	54,29	6,48	9,32	13,94
	Neoplazme	8	9,45	3,77	4,16	16,20	6,00	9,72	11,07
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	10,00	2,26	7,61	13,76	8,14	9,63	11,72
	Kontrola	6	6,12	2,22	4,48	10,38	4,73	5,22	7,58
<b>Nesegmentirani neutrofili</b>	Upalne bolesti	16	0,70	2,07	0,00	8,28	0,00	0,00	0,21
	Neoplazme	8	0,15	0,13	0,00	0,29	0,00	0,19	0,27
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	0,24	0,16	0,00	0,41	0,07	0,29	0,36
	Kontrola	6	0,01	0,03	0,00	0,08	0,00	0,00	0,02
<b>Limfociti</b>	Upalne bolesti	17	1,33	0,65	0,47	2,52	0,76	1,31	1,82
	Neoplazme	8	0,95	0,51	0,34	1,71	0,51	0,84	1,43
	Neupalne/neoplastične bolesti	6	1,02	0,54	0,23	1,72	0,64	0,93	1,56
	Kontrola	6	1,39	0,65	0,71	2,28	0,79	1,27	2,06
<b>Monociti</b>	Upalne bolesti	17	0,61	0,53	0,12	2,00	0,22	0,48	0,74

	Neoplazme	8	0,99	0,48	0,44	1,80	0,60	0,86	1,46
	Neupalne/neoplastične bolesi	6	0,70	0,45	0,34	1,52	0,34	0,62	0,97
	Kontrola	6	0,46	0,29	0,08	0,81	0,17	0,49	0,74
	Upalne bolesi	17	0,85	2,27	0,00	9,52	0,00	0,22	0,53
<b>Eozinofili</b>	Neoplazme	8	0,42	0,33	0,00	0,99	0,15	0,38	0,66
	Neupalne/neoplastične bolesi	6	0,37	0,37	0,00	1,03	0,14	0,23	0,68
	Kontrola	6	0,45	0,33	0,00	0,91	0,11	0,53	0,66
	Upalne bolesi	17	0,09	0,29	0,00	1,19	0,00	0,00	0,00
<b>Bazofili</b>	Neoplazme	7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Neupalne/neoplastične bolesi	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Kontrola	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Upalne bolesi	17	418,00	226,95	191	1112	263,00	338,00	472,00
<b>Trombociti</b>	Neoplazme	8	224,63	138,38	71	476	97,75	226,00	316,75
	Neupalne/neoplastične bolesi	6	386,83	167,66	225	686	244,50	363,50	495,50
	Kontrola	6	407,50	105,92	264	515	283,50	440,00	500,75
	Upalne bolesi	13	37,10	51,00	1,0	144,3	6,05	9,90	62,45
<b>CRP</b>	Neoplazme	7	74,37	92,40	2,4	239,2	6,90	42,00	168,40
	Neupalne/neoplastične bolesi	6	12,08	15,41	1,0	42,4	2,80	6,25	20,50
	Kontrola	4	1,95	0,84	1,0	2,8	1,13	2,00	2,73

## 5.9. REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE

### 5.9.1. REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE SERUMA

Proteomskom analizom analizirano je 36 uzoraka seruma istraživanih pasa. Analizom podataka prikupljenih i obrađenih u Proteome Discovereru identificirano je i kvantificirano 321 proteina od kojih je 164 s najmanje dva jedinstvena peptida. Od njih, 143 proteina kvantificirana su u više od 50 % uzoraka po grupi (u 36 uzoraka). *Post-hoc* analiza identificirala je 9 proteina, čija se zastupljenost statistički značajno razlikovala među grupama ( $P < 0,05$ ) (SLIXA XX toplinska karta), te jednog proteina (protein prekursor alfa-1-mikroglobulina/bikunina; engl. *protein alpha-1-microglobulin/bikunin precursor*, protein

AMBP/) kod kojeg je P-vrijednost iznosila točno 0,05, koji je također prikazan zbog svoje marginalne značajnosti. U tablicama 18 – 23 prikazani su različito eksprimirani proteini između skupina pasa s neoplastičnim, upalnim, neuplanim/neneoplastičnim skupinama i kontrolne skupine, s identifikacijskim brojem proteina te jedinstvenom oznakom proteina (engl. *accession ID*) iz baze UniProt, atoplinska mapa s razlikama u njihovoj zastupljenosti među skupinama prikazana je na slici 25. (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.).

*Post-hoc* analiza pokazala je statistički značajne razlike u zastupljenosti pet proteina seruma između skupine pasa s neoplastičnim bolestima i kontrolne skupine: član 1 obitelji serpin G, C-tip lektina domena obitelj 3 član B, protein koji sadržava domenu nalik na Ig, protrombin i apolipoprotein A-II. Zastupljenost člana 1 obitelji serpina G i proteina koji sadržava domenu nalik na Ig bila je statistički viša u pasa s neoplastičnim bolestima nego u kontrolnoj skupini. Osim toga, tri proteina bila su zastupljena u manjoj količini u pasa s neoplastičnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu; C-tip lektina domena obitelj 3 član B, protrombin i apolipoprotein A-II (tablica 18).

Tablica 18. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina s neoplastičnim bolestima i kontrolne skupine; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, P-vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.). SERPING1 - član 1 obitelji serpina G (engl: *Serpin family G member 1*). CLEC3B – C-tip lektina domene obitelji 3 član B (engl. *C-type lectin domain family 3 member B*). F2 – protrombin. APOA2 – apolipoprotein A-II

<b>NEOPLAZME : KONTROLNA SKUPINA</b>			
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>
A0A8C0M9C3	SERPING	Član 1 obitelji serpina G	0,006
A0A8C0N269	CLEC3B	C-tip lektin domena obitelj 3 član B	0,046
A0A8I3P2N6	nema	Protein koji sadržava domenu nalik Ig	0,020

A0A8I3PUT1	F2	Protrombin	0,013
E2RAK7	APOA2	Apolipoprotein A-II	0,020

U usporedbi skupine pasa s upalnim bolestima i kontrolne skupine šest proteina statistički se značajno razlikovalo u zastupljenosti. Dva proteina koja sadržavaju domenu nalik na Ig (UniProt pristupni brojevi A0A8C0S1F8 i A0A8I3P2N6) imala su statistički veću zastupljenost u skupini pasa s upalnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina (engl. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*, ITIH3), protrombin, protein prekursor alfa-1-mikroglobulina/bikunina (engl. *protein alpha-1-microglobulin/bikunin precursor*, protein AMBP) i apolipoprotein A-II imali statistički značajno manju zastupljenost u serumu pasa oboljelih od upalnih bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 19).

Tablica 19. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina s upalnim bolestima i kontrolne skupine; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, P-vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.). ITIH3 – teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina (engl: *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*). F2 – faktor 2. AMBP – protein AMBP. APOA2 – apolipoprotein A-II.

<b>UPALNE BOLESTI: KONTROLNA SKUPINA</b>			
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>
A0A8C0S1F8	nema	Protein koji sadržava domenu nalik na Ig	0,037
A0A8C0MKB	ITIH3	Inhibitor inter-alfa-tripsin teškog lanca 3	0,003
A0A8I3P2N6	nema	Protein koji sadržava domenu nalik na Ig	0,020
A0A8I3RV60	AMBP	Protein AMBP	0,050

A0A8I3PUT1	F2	Protrombin	0,013
E2RAK7	APOA2	Apolipoprotein A-II	0,020

Tri su proteina imala značajno različitu zastupljenost između skupina s neupalnim/neneoplastičnim bolestima i kontrolne skupine, i to član obitelji serpin G 1 čija je količina bila veća te teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina i član 1 obitelji lektina 3 tip C čija je zastupljenost bila manja nego u kontrolnoj skupini (tablica 20).

Tablica 20. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina s neupalnim/neneoplastičnim bolestima i kontrolne skupine; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, P-vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.). APOH – beta-2-glikoprotein 1 (engl. *beta-2-glycoprotein 1*). SERPING1 – član 1 obitelji serpin G (engl. *serpin family G member 1*). ITIH3 – inter-alfa-tripsin inhibitor teškog lanca (engl. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*). CLEC3B – C-tip lektina domene obitelji 3 član B (engl. *C-type lectin domain family 3 member B*)

<b>NEUPALNE/ NENEOPLASTIČNE BOLESTI: KONTROLNA SKUPINA</b>			
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>
A0A8C0M9C3	SERPING1	Član 1 obitelji serpin G	0,006
A0A8C0MKB	ITIH3	Teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina	0,003
A0A8C0N269	CLEC3B	Član 1 obitelji lektina 3 tip C	0,046



Između skupina pasa s tumorskim i onih s upalnim bolestima u zastupljenosti su se razlikovala kod tri proteina. Količina člana 1 obitelji serpin G, zatim inter-alfa-tripsin inhibitor teškog lanca 3 i proteina AMBP bila je veća u pasa s neoplastičnim bolestima nego u onih s upalnim (tablica 21.).

Tablica 21. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina s neoplastičnim i onima s upalnim bolestima donjih dišnih puteva; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, P-vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.). SERPING1 – član 1 obitelji serpina G (engl. *serpin family G member 1*). ITIH3 – inter-alfa-tripsin inhibitor teškog lanca (engl. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*). AMBP – protein AMBP

<b>NEOPLASTIČNE BOLESTI:UPALNE BOLESTI</b>			
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>
A0A8C0M9C3	SERPING1	Član 1 obitelji serpin G	0,006
A0A8C0MKB	ITIH3	Teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina	0,003
A0A8I3RV60	AMBP	Protein AMBP	0,050

Usporedba skupine s upalnim bolestima i skupine s neupalnim/neneoplastičnim bolestima otkrila je pet proteina sa statistički značajnom razlikom u zastupljenosti. Beta-2-glikoprotein 1 i AMBP nalazili su se u manjoj količini u pasa s upalnim bolestima, dok su tri proteina koji sadržavaju domenu nalik na Ig (Uniprot pristupni brojevi A0A8C0MPA6, A0A8C0S1F8 i A0A8I3P2N6) viši kod upalnih (tablica 22).

Tablica 22. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina s neupalnim/neneoplastičnim i onih s upalnim bolestima donjih dišnih puteva; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, P-vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.). APOH – beta-2-glikoprotein 1 (engl. *beta-2-glycoprotein 1*). AMBP – protein AMBP

<b>NENEOPLASTIČNE/NENEOPLASTIČNE BOLESTI:UPALNE BOLESTI</b>			
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>
A0A8C0LW15	APOH	Beta-2-glikoprotein 1	0,048
A0A8I3RV60	AMBP	Protein AMBP	0,050
A0A8I3P2N6	nema	Protein koji sadržava domenu nalik na Ig	0,020
A0A8C0S1F8	nema	Protein koji sadržava domenu nalik na Ig	0,037
A0A8C0MPA6	nema	Protein koji sadržava domenu nalik Ig	0,046

Četiri proteina značajno su se razlikovala između skupina pasa s neoplastičnim i onih s neupalnim/neneoplastičnim bolestima. Teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina imao je veću zastupljenost u skupini s neoplastičnim bolestima, dok je zastupljenost beta-2-glikoproteina 1, protrombina i apolipoproteina A-II bila značajno niža u skupini s neoplastičnim bolestima u odnosu na skupinu s neupalnim/neneoplastičnim bolestima (tablica 23).

Tablica 23. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u serumu pasa između skupina s neupalnim/neneoplastičnim i onih s neoplastičnim bolestima donjih dišnih puteva; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina, p vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.). (APOH – beta-2-glikoprotein 1 (engl. *beta-2-glycoprotein 1*). ITIH3 – inter-alfa-tripsin inhibitor teškog lanca (engl. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*). F2 – protrombin. APOA2 – apolipoprotein A-II)

**NEOPLASTIČNE/NENEOPLASTIČNE BOLESTI:NEOPLASTIČNE BOLESTI**

Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena	Naziv proteina	p vrijednost
A0A8C0LW15	APOH	Beta-2-glikoprotein 1	0,048
A0A8C0MKB	ITIH3	Teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina	0,003
A0A8I3PUT1	F2	Protrombin	0,013
E2RAK7	APOA2	Apolipoprotein A-II	0,020

Jedinstvena oznaka proteina (Uniprot)	Oznaka gena	N vs K	NN vs K	U vs K	N vs NN	N vs U	NN vs U	Legenda
A0A8C0LW15	APOH	-0,03572	0,164443	-0,06617	-0,20016	0,030454	0,230613	0,8
A0A8C0M9C3	SERPING1	0,322924	0,185155	0,180768	0,137769	0,142156	0,004387	0,6
A0A8C0MKB0	ITIH3	-0,14619	-0,68773	-0,60326	0,541537	0,457067	-0,08447	0,4
A0A8C0MPA6	nema	-0,09676	-0,43242	0,164475	0,335658	-0,26124	-0,59689	0,2
A0A8C0N269	CLEC3B	-0,31852	-0,17946	-0,10408	-0,13905	-0,21443	-0,07538	0
A0A8C0S1F8	nema	0,223982	0,171731	0,376205	0,05225	-0,15222	-0,20447	-0,2
A0A8I3P2N6	nema	0,307551	0,019378	0,39068	0,288173	-0,08313	-0,3713	-0,4
A0A8I3PUT1	F2	-0,3487	-0,1221	-0,21742	-0,2266	-0,13128	0,095323	-0,6
A0A8I3RV60	AMBP	-0,20565	-0,11997	-0,43559	-0,08568	0,229945	0,31562	-0,7
E2RAK7	APOA2	-0,51977	-0,21153	-0,3663	-0,30824	-0,15347	0,154767	-0,8

Viša zastupljenost

↑

Nije značajno

Niža zastupljenost

↓

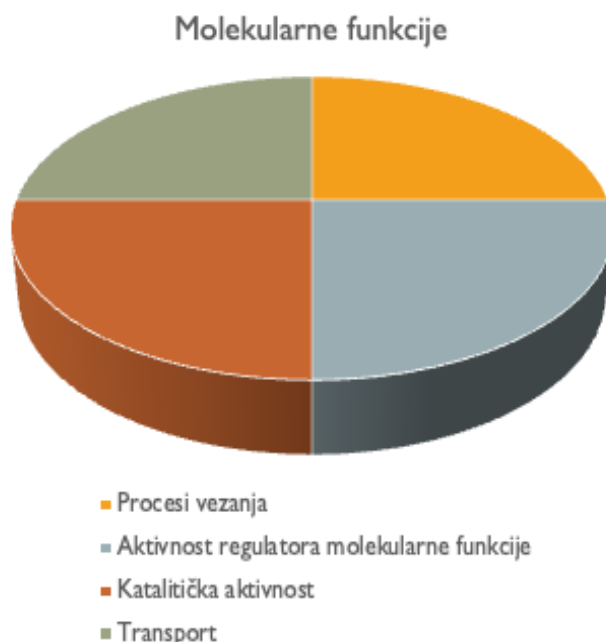
Slika 25. Toplinska karta 10 identificiranih i kvantificiranih proteina iz uzoraka seruma sa statistički značajno različitom zastupljenošću među pojedinim skupinama pasa s bolestima donjih dišnih puteva (N = 36). Toplinska mapa kreirana je koristeći se promjenom ekspresije između dviju skupina – log<sub>2</sub>FC vrijednosti (FC = *fold change*) izračunate za glavne proteine nakon *post-hoc* analize. Genetska ontološka analiza provedena je alatom PANTHER za *Canis lupus*. Toplinska karta proizvedena je uz primjenu Microsoft Excel. U – skupina pasa s upalnim bolestima donjih dišnih puteva, N – skupina pasa s neoplastičnim bolestima donjih

dišnih puteva, NN – skupina pasa s neupalnim/neneoplastičnim bolestima pluća, K – kontrolna skupina. APOH – beta-2-glikoprotein 1 (engl. *Beta-2-glycoprotein 1*). SERPING1 – član 1 obitelji serpina G (engl. *serpin family G member 1*). ITIH3 – inter-alfa-tripsin inhibitor teškog lanca (engl. *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3*). CLEC3B – C-tip lektina domene obitelji 3 član B (engl. *C-type lectin domain family 3 member B*). F2 – protrombin. AMBP – protein AMBP. APOA2 – apolipoprotein A-II.

### 5.9.1.1. FUNKCIONALNA ANALIZA PROTEINA SERUMA

Identifikacijski brojevi proteina seruma upareni su s oznakom gena te je napravljena analiza genske ontologije pomoću bioinformatičkog alata PANTHER GO (THOMAS i sur., 2022.).

Rezultati genske ontologije za molekularne funkcije pokazuju da su geni podjednako vezani uz procese vezanja, katalitičku aktivnost, transport i aktivnost regulatora molekularne funkcije (slika 26).



Slika 26. Grafički prikaz ontologije za molekularne funkcije u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina u serumu napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022.).

Genska ontologija za biološki proces pokazala je da je najviše gena ( $N = 2$ ) bilo vezano uz biološku regulaciju, dok je po jedan gen sudjelovao u procesima odgovora na podražaj, staničnim procesima, procesima višestaničnog organizma, homeostatskim procesima i lokalizaciji (slika 27).



Slika 27. Grafički prikaz ontologije za biološke procese u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina u serumu napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022.).

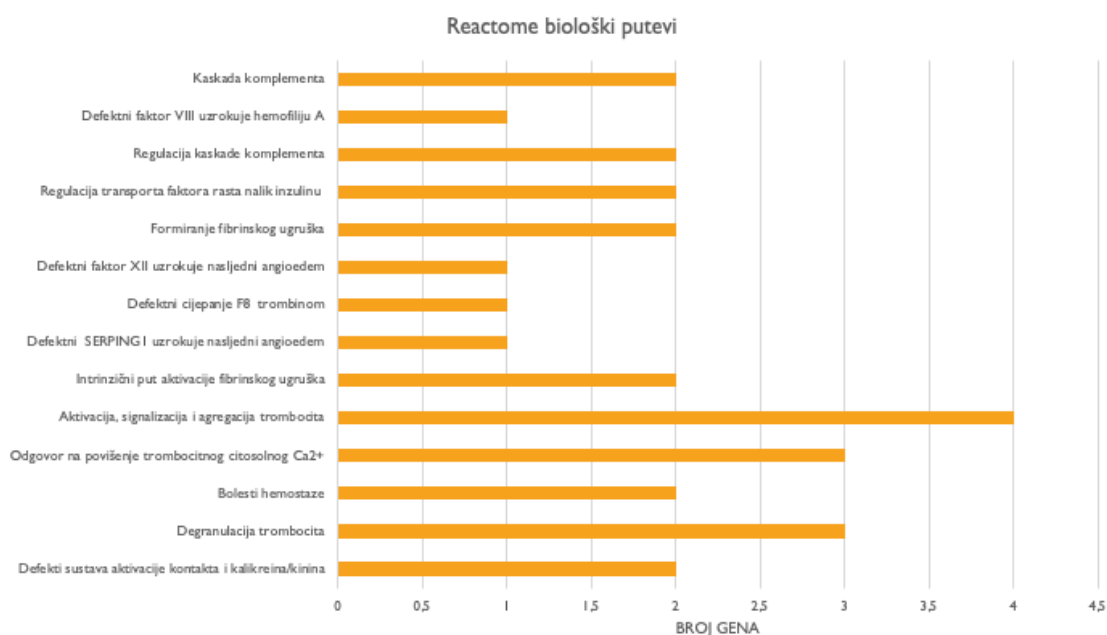
Rezultati genske ontologije za staničnu organizaciju pokazao je da su tri gena bila vezana uz stanični anatomske entitet, a jedan gen uz kompleks koji sadržava proteine (slika 28).



Slika 28. Grafički prikaz ontologije za staničnu lokalizaciju u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina u serumu napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022.).

#### 5.9.1.2. ANALIZA BIOLOŠKIH PUTEVA PROTEINA SERUMA

Analiza bioloških puteva proteina seruma provedena je pomoću bioinformatičkog alata Reactome te je identificirano 14 bioloških puteva sa statističkom značajnošću ( $FDR < 0,05$ ) (Slika xx). Većina proteina identificiranih i kvantificiranih u proteomu seruma uključena je uz primarnu i sekundarnu hemostazu.



Slika 29. Prikaz statistički značajnih bioloških puteva povezanih s proteomom seruma pasa oboljelih od bolesti donjih dišnih puteva, napravljen pomoću alata Reactome.

### 5.9.2. REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA

Proteomskom analizom 37 uzoraka bronhoalveolarnih ispiraka identificirana su i kvantificirana 1216 proteina od kojih je 731 s najmanje dva jedinstvena peptida. Od njih, 534 proteina kvantificirana su u više od 50 % uzoraka po grupi (u 37 uzoraka). *Post-hoc* analiza identificirala je 17 proteina, čija se zastupljenosti statistički značajno razlikovala među grupama ( $P < 0,05$ ).

Proteini sa statistički značajno različitom zastupljenošću u *post-hoc* analizi bili su: beta nalik na rezistin (engl. *resistin-like beta*), lukoza-6-fosfat-1-dehidrogenaza, fruktoza-bisfosfat aldolaza, čimbenik maturacije glije, protein koji sadržava domenu K-homologija, antitrombin-III, serotransferin, alfa-2-HS-glikoprotein, fosfoglicerat-kinaza, piruvat-kinaza, protrombin, endoplazmin, protein toplinskog šoka HSP 90-beta, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze,

homolog proteina kontrole dijeljenja stanice 42, prednji gradijentni protein 2 član obitelji proteina disulfid-izomeraza i heterogeni nuklearni ribonukleoprotein (slika 30)

Statistički značajno različito zastupljen protein između skupine pasa s neoplastičnim bolestima i kontrolne skupine bio je beta nalik na rezistin, zastupljen u statistički značajno manje u bronhoalveolarnom ispirku pasa s neoplastičnim bolestima donjih dišnih puteva (tablica 24).

Tablica 24. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u bronhoalveolarnom ispirku pasa između skupina s neoplastičnim bolestima donjih dišnih puteva i kontrolne skupine; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina i P-vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.)

<b>NEOPLASTIČNE BOLESTI:KONTROLNA SKUPINA</b>			
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>p vrijednost</b>
A0A8C0TDR5	RETNLB	Beta nalik na rezistin	0,026

Sedam proteina sa statistički različitom zastupljenošću između skupina s upalnim bolestima i kontrolne skupine bili su: glukoza-6-fosfat-1-dehidrogenaza, fruktoza-bisfosfat aldolaza, faktor maturacije glije i poli(rC) vezujući protein 1 zastupljeniji u pasa s upalnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je zastupljenost antitrombina-III, serotransferina, alfa-2-HS-glikoproteina bila manja u pasa s upalnim bolestima nego u kontrolne skupine (tablica 25.).

Tablica 25. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u bronhoalveolarnom ispirku pasa između skupina s upalnim bolestima donjih dišnih puteva i kontrolne skupine; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina i P-vrijednost (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.)



UPALNE BOLESTI:KONTROLNA SKUPINA			
Jedinstvena oznaka proteina	Oznaka gena	Naziv proteina	p vrijednost
A0A8I3Q0V2	G6PD	Glukoza-6-fosfat-1-dehidrogenaza	0,013
A0A8C0R9Z8	ALDOA	Fruktoza-bisfosfat-aldolaza	0,026
A0A8C0SLP7	GMFG	Faktor maturacije glije	0,006
A0A8C0PIE8	PCBP1	Poli(rc) vezujući protein 1	0,009
A0A8P0SIZ4	SERPINC1	Antitrombin-III	0,022
A0A8I3Q3K3	LOC47707	Serotransferin	0,036
A0A8I3PIK8	AHSG	Alfa-2-HS-glikoprotein	0,033

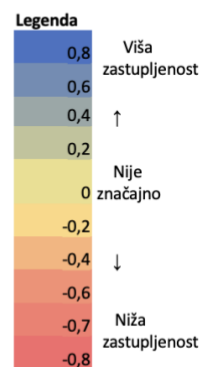
Devet proteina sa statistički različitom zastupljenošću između skupina s neoplastičnim i upalnim bolestima bili su: fosfoglicerat-kinaza, piruvat-kinaza, protrombin, protein toplinskog šoka 90-alfa razred B član 1, protein toplinskog šoka 90-beta član 1, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze, protein kontrole dijeljenja stanice 42 homolog, prednji gradijentni protein 2 član obitelji disulfid-izomeraza, heterogeni nuklearni ribonukleoprotein čija je zastupljenost bila statistički značajno veća u skupini pasa s upalnim bolestima u odnosu na one s neoplastičnim bolestima donjih dišnih puteva (tablica 26.).

Tablica 26. Popis proteina sa značajno promijenjenom ekspresijom u bronhoalveolarnom ispirku pasa između skupina s neoplastičnim i onih s upalnim bolestima donjih dišnih puteva i kontrolne skupine; prikazana je jedinstvena oznaka proteina (iz baze UniProt), oznaka gena za *Canis lupus*, naziv proteina i P-vrijednost. (UniProt, THE UNIPROT CONSORTIUM, 2020.)

<b>UPALNE BOLESTI: NEOPLASTIČNE BOLESTI</b>			
<b>Jedinstvena oznaka proteina</b>	<b>Oznaka gena</b>	<b>Naziv proteina</b>	<b>P vrijednost</b>
A0A8C0SZN8	PGK1	Fosfoglicerat-kinaza	0,012
A0A8C0YZD	PKM	Piruvat-kinaza	0,016
A0A8C0SEK6	F2	Protrombin	0,024
A0A8C0S8X9	HSP90AB	Protein toplinskog šoka 90-alfa klasa B član 1	0,025
A0A8P0SCP9	HSP90B1	Protein toplinskog šoka HSP 90-beta član 1	0,009
A0A8C0T2N5	GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza	0,009
P60952	CDC42	Protein kontrole dijeljenja stanice 42 homolog	0,027
A0A8C0NZV	AGR2	Prednji gradijntni protein 2 član obitelji disulfid-izomeraza	0,018
A0A8I3MX70	HNRNPU	Heterogeni nulkerani ribonukleoprotein	0,005

Između skupina s neupalnim/neneoplastičnim bolestima i skupine s upalnim bolestima, s neupalnim/neneoplastičnim bolestima i kontrolne skupine te s neupalnim/neneoplastičnim bolestima i skupine s neoplastičnim bolestima nije bilo statistički značajne razlike u zastupljenosti proteina.

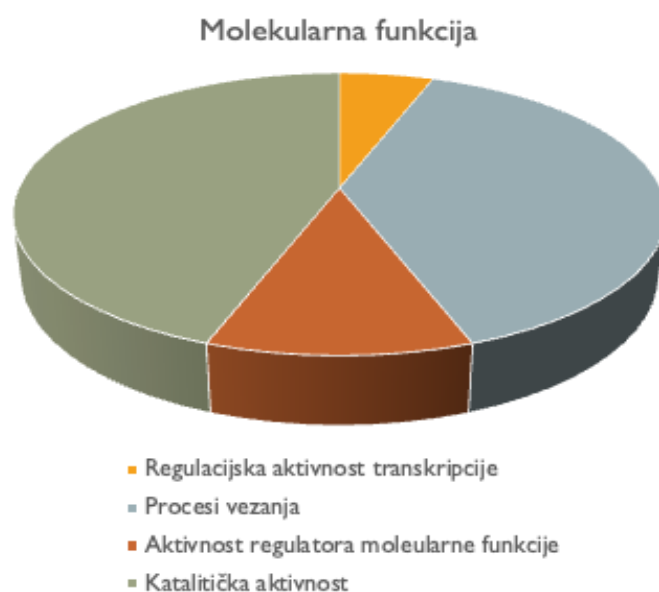
Jedinstvena oznaka proteina (UniProt)	Oznaka gena	N vs K	NN vs A	U vs K	N vs NN	N vs U	NN vs U
A0A8I3Q0V2	G6PD	0,257117	0,47016	0,679969	-0,21304	-0,42285	-0,20981
A0A8C0SZN8	PGK1	0,19542	0,381784	0,580635	-0,18636	-0,38521	-0,19885
A0A8P0SIZ4	SERPINC1	-0,22878	-0,21257	-0,33518	-0,01621	0,106393	0,122603
A0A8C0YZD9	PKM	0,00471	0,078789	0,350728	-0,07408	-0,34602	-0,27194
A0A8I3Q3K3	LOC477072	-0,23788	-0,32078	-0,54198	0,0829	0,304098	0,221198
A0A8C0R9Z8	ALDOA	0,10427	0,170663	0,570025	-0,06639	-0,46575	-0,39936
A0A8C0SEK6	F2	-0,35168	-0,13994	0,072612	-0,21174	-0,42429	-0,21255
A0A8P0SCP9	HSP90B1	-0,31961	-0,1415	0,055266	-0,17811	-0,37488	-0,19677
A0A8I3PIK8	AHSG	-0,38145	-0,39944	-0,58472	0,017986	0,203263	0,185277
A0A8C0S8X9	HSP90AB1	-0,04081	0,078316	0,188354	-0,11913	-0,22917	-0,11004
A0A8C0T2N5	GAPDH	-0,19905	0,007043	0,362919	-0,20609	-0,56197	-0,35588
P60952	CDC42	-0,09338	0,307938	0,286448	-0,40131	-0,37982	0,021489
A0A8C0NZV3	AGR2	-0,20928	-0,22506	0,330366	0,015777	-0,53965	-0,55542
A0A8I3MX70	HNRNPU	-0,27746	0,220044	0,255234	-0,4975	-0,53269	-0,03519
A0A8C0SLP7	GMFG	0,277781	0,186663	0,544885	0,091118	-0,2671	-0,35822
A0A8C0TDR5	RETNLB	-0,69393	-0,46768	-0,541	-0,22625	-0,15293	0,073317
A0A8C0P1E8	PCBP1	0,196127	0,537078	0,412712	-0,34095	-0,21658	0,124367



Slika 30. Toplinska karta 10 identificiranih i kvantificiranih proteina iz uzoraka bronhoalveolarnog ispirka sa statistički značajno različitom zastupljenošću među pojedinim skupinama pasa sa bolestima donjih dišnih puteva (N = 36). Toplinska je mapa kreirana koristeći se promjenom ekspresije između dviju skupina –  $\log_2FC$  vrijednosti (FC = *fold change*) izračunate za glavne proteine nakon *post-hoc* analize. Toplinska karta proizvedena je primjenom Microsoft Excel. (U – skupina pasa s upalnim bolestima donjih dišnih puteva, N – skupina pasa s neoplastičnim bolestima donjih dišnih puteva, NN – skupina pasa s neupalnim/neneoplastičnim bolestima pluća, K – kontrolna skupina)

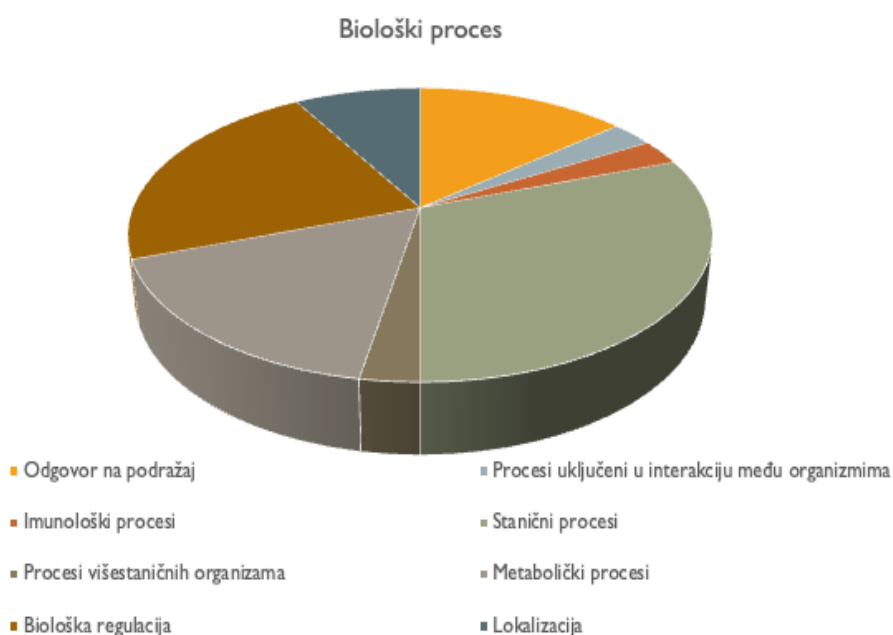
### 5.9.2.1. FUNKCIONALNA ANALIZA PROTEINA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA

Identifikacijski brojevi proteina bronhoalveolarnih ispiraka upareni su s oznakom gena, te je napravljena analiza genske ontologije pomoću bioinformatičkog alata PANTHER GO (THOMAS i sur., 2022.). Genska ontologija za molekularni proces upućuje na to da je najveći broj gena uključen u katalitičku aktivnost (N = 8), zatim u procese vezanja (N = 7), dok su ostali geni vezani uz reguliranje molekularne funkcije (N = 2) i transkripcije (N = 1) (slika 31).



Slika 31. Grafički prikaz ontologije za molekularnu funkciju u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina u bronhoalveolarnom ispirku napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022.).

Genska ontologija za biološki proces pokazala je da najveći broj gena sudjeluje u staničnim procesima (N = 11), zatim u biološkoj regulaciji (N = 8), metaboličkim procesima (N = 6) i odgovoru na podražaj (N = 5) (slika 32)



Slika 32. Prikaz genske ontologije za biološki procese u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina u bronhoalveolarnom ispirku napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022.)

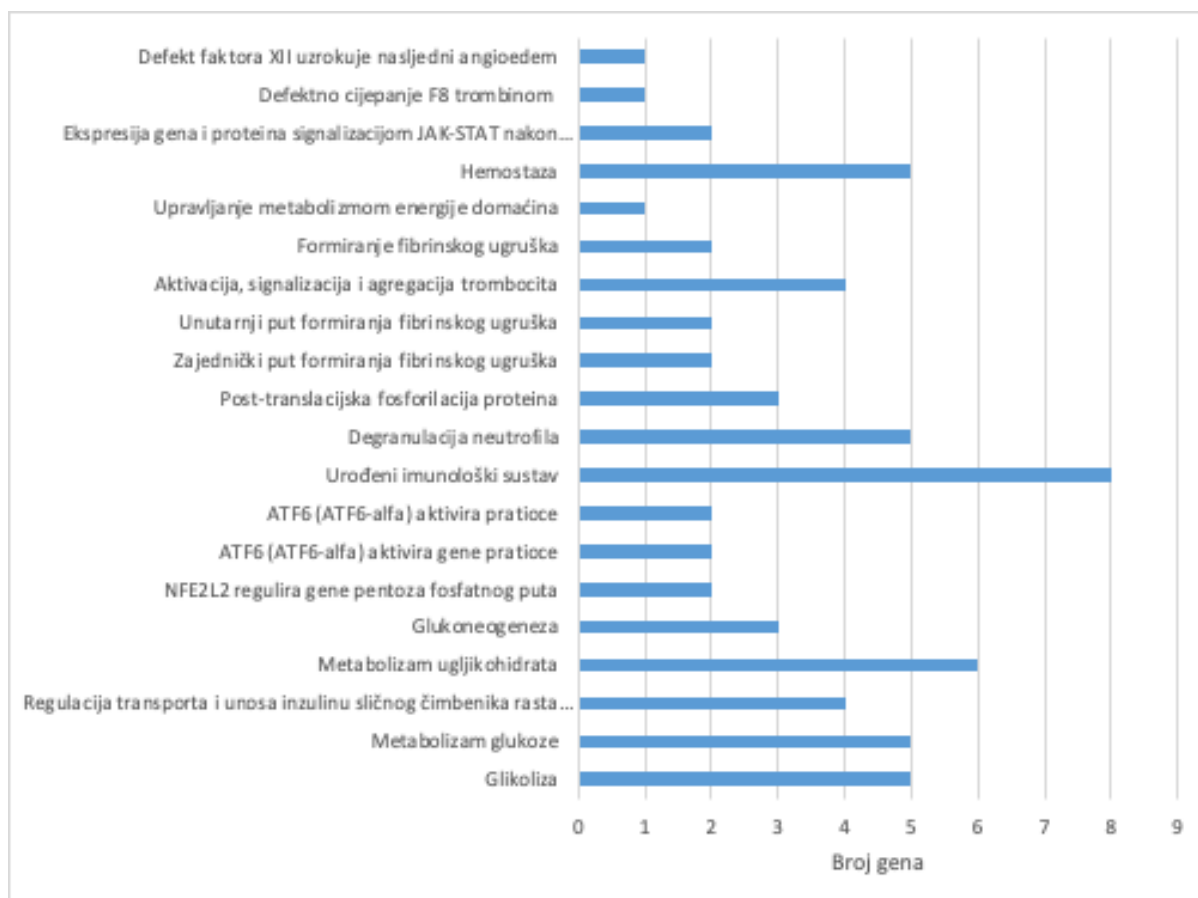
Rezultati analize genske ontologije za staničnu lokalizaciju pokazali su da je najveći broj gena (N = 16) vezan uz stanični anatomski entitet, a samo jedan gen uz kompleks koji sadržava proteine (slika 33).



Slika 33. Prikaz genske ontologije za staničnu lokalizaciju u koji su uključeni različito eksprimirani proteini između skupina u bronhoalveolarnom ispirku napravljen pomoću alata PANTHER (THOMAS i sur., 2022).

#### 5.9.2.2. ANALIZA BIOLOŠKIH PUTEVA PROTEINA BRONHOALVEOLARNOG ISPIRKA

Analiza bioloških puteva povezanih s proteinima bronhoalveolarnog ispirka napravljena je pomoću alata Reactome, te su pretraženi proteini čija se zastupljenost statistički značajno razlikovala među skupinama (N = 17) (slika 34). Dvadeset bioloških puteva s minimalno jednim genom i  $FDR < 0,05$  bilo je statistički značajno. Većina identificiranih i kvantificiranih proteina u proteomu bronhoalveolarnog ispirka uključena je u primarnu i sekundarnu hemostazu, imunosti odgovor i metabolizam ugljikohidrata (slika 34).



Slika 34. Prikaz statistički značajnih bioloških puteva povezanih s proteomom bronhoalveolarnog ispirka pasa oboljelih od bolesti donjih dišnih puteva, napravljen pomoću alata Reactome.

### 5.9.3. REZULTATI PROTEOMSKJE ANALIZE SLINE

Proteomskom analizom 22 uzorka sline identificirana su i kvantificirana 553 proteina od kojih je 325 s najmanje dva jedinstvena peptida. Od njih, 235 proteina kvantificirana su u više od 50 % uzoraka po skupini (u 22 uzoraka). *Post-hoc* analiza identificirala je jedan protein čija se zastupljenost statistički značajno razlikovala među grupama ( $P < 0,05$ ).

Protein koji se statistički značajno razlikovao među skupinama jest protein koji sadržava domenu WAP (engl. *whey acidic protein domain-containing protein*) (UniProt pristupni broj A0A8P0NNP3). Njegova je zastupljenost bila je statistički značajno niža u neupalnoj/neneoplastičnoj skupini nego u kontrolnoj skupini ( $P = 0,0281$ ).

## 6. RASPRAVA

### 6.1. PODATCI O ŽIVOTINJAMA I NALAZIMA DIJAGNOSTIČKIH PRETRAGA

U ovom je istraživanju utvrđeno da su upalne bolesti najučestalija skupina bolesti donjih dišnih puteva (46 %) u populaciji pasa na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu s ciljem dijagnostike respiratornih kliničkih znakova. Najčešća je dijagnoza bila kronični bronhitis (19 %), a gotovo jednako učestalo dijagnosticirala se i gnojna bronhopneumonija (16 %), nakon čega su slijedile primarne (13 %) i metastatske neoplazme pluća (13 %) te bronhomalacija (kolaps bronha) (13 %). Istraživanja o prevalenciji respiratornih bolesti u pasa su rijetka, što napominju i NAKAZAWA i suradnici (2022.). U njihovoj retrospektivnoj studiji 1050 pasa s respiratornim znakovima u Japanu najčešća bolest dušnika i bronha bila je traheomalacija i bronhomalacija, a kronični je bronhitis dijagnosticiran u 34 % slučajeva. U njihovom su istraživanju neoplazme pluća i pneumonije dijagnosticirane u sličnom omjeru, kada se gledalo na bolesti pluća, što odražava rezultate i ovog istraživanja, iako je obuhvaćena populacija pasa premala da bi se mogli izvući definitivni zaključci. Ovo je istraživanje temeljeno ponajprije na dostupnosti uzoraka potrebnih za molekularna i proteomska istraživanja, pa je moguće da je izostavljen određen broj pacijenata koji bi omogućili davanje realnije slike o pretežitosti bolesti donjih dišnih puteva u našoj populaciji pasa. Osim toga, NAKAZAWA i suradnici, (2022.) raspravljaju o mogućnosti izostavljanja slučajeva kroničnog bronhitisa u njihovom istraživanju, s obzirom na to da je bio uključen i velik broj pasa kojima nije učinjena napredna dijagnostika, već je kolaps traheje i bronha dijagnosticiran rendgenski. Poznato je da stariji psi manjih pasmina često boluju od kroničnog bronhitisa, a istodobno mogu imati i kolaps dušnika i bronha (MACREADY i sur., 2007.) te je moguće da bi i u njihovom istraživanju kronični bronhitis bio češći uz uporabu napredne dijagnostike. Zanimljivo, ni u našem istraživanju, kao ni u onomu NAKAZAWA i suradnika (2022.), nisu zabilježeni psi s idiopatskom fibrozom pluća. Ta bolest se navodi kao jedno od najčešćih idiopatskih stanja donjih dišnih puteva, specifičnije, plućnog intersticija, koja nema upalnu niti neoplastičnu etiologiju. Ova bolest pogađa uglavnom zapadnoškotske bijele terijere, iako je opisana i u drugih pasmina, te u mačaka (LAURILA I RAJMÄKI, 2020.). U našem su istraživanju bila prisutna samo dva zapadnoškotska terijera, a ni jedan nije imao dijagnozu idiopatske plućne fibroze.



Prosječna dob zaprimljenih pacijenata u ovom istraživanju iznosila je oko 10 godina, točnije, 9,5 godina za upalne bolesti, 9,75 za tumorske i 10 godina za neupalne i neneoplastične bolesti, što također odražava dosadašnja istraživanja. NAKAZAWA i suradnici (2022.) prijavljuju medijan od 10,75 godina starosti pasa za bronhomalaciju, 10 godina za kronični bronhitis te 11 godina za mase u plućima, što potvrđuje i naš nalaz, da se kronične respiratorne bolesti koje zahtijevaju naprednu dijagnostiku uglavnom pojavljuju u pasa starije životne dobi. Nije pronađena statistički značajna razlika između prosječne starosti pri zaprimanju i pojedinih skupina u ovom istraživanju.

Prosječno vrijeme trajanja bolesti prije zaprimanja na kliničku obradu u ovom istraživanju varira od 0 tjedana do maksimalno 80 tjedana. Pacijenti s neoplastičnim bolestima često kasnije dolaze na pregled (prosječno, nakon što su klinički znakovi bili prisutni 22 tjedna). Razlog tome mogu biti blagi nespecifični klinički znakovi koji nastaju polako i mogu biti sporoprogresivni, dok u nekih pasa nema ni znakova od strane dišnog sustava, već se tumor pluća identificira slikovnom dijagnostikom u sklopu obrade zbog nespecifičnih sistemskih znakova (poput gubitka tjelesne mase) (ETTINGER i sur., 2024.). Psi s neupalnim/neneoplastičnim bolestima (poput kolapsa bronha ili traheje) u prosjeku su brže zaprimani u obradu (13,83 tjedana), moguće zbog akutnije i jače kliničke slike ovih bolesti, što vlasnike ponuka da promptnije potraže pomoć veterinaru. Statistički nije pronađena značajna razlika između prosječnog trajanja bolesti prije zaprimanja i pojedinih skupina u ovom istraživanju.

Kašalj je bio najčešći klinički znak zbog kojeg su psi u ovom istraživanju dovedeni na naprednu dijagnostiku dišnog sustava, prisutan u 26/37 pasa. Kašalj je važan fiziološki obrambeni mehanizam koji sprječava aspiraciju štetnog materijala i stranih tijela u dišni sustav, a pomaže u uklanjanju udahnutih čestica, patogena i prekomjernih izlučevina (poput sluzi ili gnoja). Zbog toga što je refleks teško prekinuti kada započne te zbog njegove glasne prirode, to je klinički znak često zamijećen od strane vlasnika pasa čiju kvalitetu života narušava (ETTINGER i sur., 2024.). Kašalj se, s obzirom na trajanje, može klasificirati kao akutan, odnosno subakutan, u trajanju kraćem od osam tjedana, te kao kroničan, kada traje dulje od osam tjedana (ETTINGER i sur., 2024.). Dijagnostika se u našem istraživanju provodila četverostruko češće u pasa s kroničnim kašljem od onih s akutnim. U ljudi, istraživanja o

čimbenicima rizika za nastanak akutnog, subakutnog i kroničnog kašlja upućuju na moguću etiologiju, pa se akutni kašalj najčešće pojavljuje u pacijenata s alergijama, subakutni ili kronični kašalj u onih s astmom ili kroničnim rinitisom, a kronični kašalj u pacijenata s gastroezofagealnim refluksom (LÄTTI i sur., 2018.). U pasa nedostaju studije koje istražuju najčešće uzroke kašlja ovisno o trajanju kašlja, akutni se kašalj u mladog psa uglavnom povezuje s CIRDC-om (DAY i sur., 2020.), dok je prisutnost kroničnog kašlja preduvjet za postavljanje dijagnoze kroničnog bronhitisa (LILJA-MAULA i sur., 2013.). Kašalj se također može klasificirati kao suh ili produktivan, ovisno o prisutnosti iskašljanog sputuma. Važno je napomenuti da postoje znatna preklapanja ovih dvaju oblika u pasa jer psi mogu kašljati i suho i produktivno istodobno, te to ne pomaže u daljnjoj dijagnostici. U našem je istraživanju većina vlasnika (67,5 %) tvrdila da njihov pas suho kašlje, a tek 16 %, da im pas produktivno kašlje. Pacijenti s upalnim bolestima donjih dišnih puteva češće su imali suhi kašalj u odnosu na kontrolnu skupinu u ovom istraživanju. U ljudi se prisutnost kroničnog suhog kašlja često povezuje s gastroezofagealnim refluksom, postnazalnom sekrecijom i astmom (MAHASUR, 2015.). Iako se prisutnost suhog kašlja u pasa klasično povezuje sa stanjima poput kolapsa dišnih puteva, kroničnog bronhitisa ili ranim stadijem edema pluća, za sada nema dovoljno dokaza da produktivnost kašlja u pasa pomaže u postavljanju dijagnoze, što je dodatno otežano i činjenicama da neki vlasnici nisu u stanju primijetiti i ocijeniti produktivnost kašlja, da psi mogu imati produktivan i neproduktivan kašalj kod iste bolesti i time da psi mogu progutati iskašljani sadržaj a da vlasnici to ne primijete (ETTINGER i sur., 2024.). Naše istraživanje još jednom upućuje na činjenicu da se i upalne bolesti poput bronhopneumonije, koje se klasično povezuju s produktivnim kašljem, mogu očitovati suhim kašljem, čega bi kliničari trebali biti svjesni prilikom izrade liste diferencijalnih dijagnoza za ovaj klinički znak.

Dispneja, odnosno respiratorni distres, definiran kao otežano disanje, hitno je stanje povezano s brojnim bolestima dišnog sustava, ali i bolestima pleuralnog prostora, stijenke prsne šupljine te povremeno i ner respiratornim bolestima poput metaboličkih poremećaja ili poremećaja elektrolita, bolestima središnjeg živčanog sustava i endokrinološkim stanjima (ETTINGER i sur., 2024.). Dispneja je bila prisutna u gotovo 30 % pasa u našem istraživanju. Iako je češće zabilježena u pasa s upalnim te neupalnim/neneoplastičnim bolestima, nije bilo statistički značajne razlike među skupinama.

Inapetencija, hiporeksija, označava smanjen unos hrane, dok anoreksija označava potpuni gubitak unosa hrane. To su česti klinički znakovi zbog kojih vlasnici traže veterinarsku pomoć (ROBINSON i sur., 2015.), povezani i s većim rizikom od uginuća (MOLINA i sur., 2018.). Bolesti dišnog sustava često dovode do smanjenog unosa hrane, što se događa u slučajevima respiratornog distresa, uzimanja kronične terapije, kroničnih bolesti poput tumora dišnog sustava ili vrućice (ETTINGER i sur., 2024.). U našem je istraživanju 1/3 pacijenata kao klinički znak bolesti dišnog sustava imala smanjen unos hrane. Iako je u našem istraživanju smanjen unos hrane najčešće bilježen u pasa s tumorskim bolestima, nije pronađena statistički značajna razlika među skupinama.

Iscjedak iz očiju i nosa bio je prisutan samo u četiri psa u našem istraživanju. Oni se češće pojavljuju u pasa s bolestima gornjih dišnih puteva, ali je važno uzeti u obzir kao klinički znak bolesti koje mogu istodobno zahvatiti gornje i donje dišne puteve, poput CIRDC-a (DAY i sur., 2020.). U skladu s navedenim jedan pas iz našeg istraživanja s iscjetkom iz nosa bolovao je upravo od te bolesti. Zanimljivo, u istraživanju CLERCX i suradnika (2000.) 52 % pasa s eozinofilnom bronhopneumopatijom imalo je serozni do mukopurulentni iscjedak iz nosa. U našem istraživanju ni jedan pas s eozinofilnom bronhopneumopatijom nije imao iscjedak iz nosa ili očiju. Iscjedak iz nosa može biti i znak upale pluća u pasa (DEAR i sur., 2020.). I u našem je istraživanju jedan pas s iscjetkom iz nosa bolovao od gnojne bronhopneumonije. Nije pronađena statistički značajna razlika među pojedinim skupinama i s iscjetkom iz nosa ili očiju, ali još jednom treba naglasiti da je ovaj klinički znak bio rijetko prisutan u pasa obuhvaćenim ovim istraživanjem te je statistička analiza bila ograničena.

Pregledom gojnog stanja životinja u našem istraživanju vidi se da su uglavnom bili dobrog gojnog stanja (s medijanom BCS 5) i da je vrlo mali broj životinja bio blago pretio. Češće je zabilježeno da su psi s kroničnim respiratornim bolestima bili blago do izrazito mršavi. Poznato je da je pretilost u pasa povezana s povećanom incidencijom ortopedskih bolesti, većim rizikom od uginuća kod pankreatitisa i skraćenim životnim vijekom. Pretilost je važna i kod respiratornih bolesti, jer je povezana s ograničenjima prilikom izdisaja u pacijenata s hiperpnejom (BACH i sur., 2007.) i povećanom reaktivnošću bronha (KELLY i sur., 2023.). Iako još nije utvrđena veza između pretilosti i kolapsa dišnih puteva, važno je za napomenuti da je oko 50 % pasa s kolapsom donjih dišnih puteva pretilo (ADAMMA-MORAITOU i sur., 2010.). Kaheksija, gubitak tjelesne mase, poznata je pojava kod kroničnih respiratornih bolesti

ljudi (SANDERS i sur., 2016.). i pasa (FREEMAN, 2018.). Kliničke implikacije ovoga fenomena potencijalno su važne. Kaheksija u ljudi povisuje morbiditet i mortalitet, dok u pasa još nema dovoljno istraživanja koja bi potvrdila da je to primjenjivo i na njih (FREEMAN i sur., 2018.). Kaheksija u pacijenata s tumorskim bolestima dobro je evidentirana, a nastaje što zbog samog tumora što zbog terapije (zračenje, kemoterapija). U našem istraživanju najnižu srednju vrijednost BCS imali su psi s upalnim bolestima (4,53), dok su psi s neoplazmama imali malo veću srednju vrijednost BCS (4,75), ali je i pas s najmanjim BCS-om (1) evidentiran u skupini neoplastičnih bolesti. Nije dokazana statistički značajna razlika između gojnog stanja pasa u našem istraživanju i pojedinih skupina bolesti.

Vrijednosti trijasa često su bilježene u pacijenata u ovom istraživanju, no nije bilo statistički značajnih razlika vrijednosti temperatura, bila i disanja među pojedinim skupinama. Većina pasa imala je vrijednosti temperature unutar referentnog intervala (38 – 39,2 °C), a najviša rektalna temperatura zabilježena je u psa s pneumonijom (40,4 °C). Vrućica može, ali i ne mora, pratiti pojavu upalnih bolesti dišnih puteva, pa je tako zabilježena u tek 16 – 50 % pasa s aspiracijskom pneumonijom (DEAR, 2020.; DEAR i sur., 2024.). Vrućica se rjeđe detektira kod neoplastičnih bolesti pluća, s malim brojem istraživanja koja bilježe tu pojavu u pasa (ETTINGER i sur., 2024.). U našem je istraživanju najviša rektalna temperatura zabilježena u pasa iz neoplastične skupine iznosila 39,6 °C, a većina je pasa imala fiziološku rektalnu temperaturu. Alteracije bila ne navode se kao značajan nalaz kod respiratornih bolesti pasa (ETTINGER i sur., 2024.). Jedan pas s dijagnozom metastatskog tumora pluća (metastaza tumora okruglih stanica iz prsnog koša) imao je najveću frekvenciju bila (188/min), s tim da je u tom trenutku imao i izljev u prsnu šupljinu koji je potencijalno pridonio tahikardiji, dok bradikardija nije detektirana ni u jednog psa. Frekvencija disanja u pasa s respiratornim bolestima može biti povišena (tahipneja), iako bi se klinički relevantna tahipneja trebala razlučiti od dahtanja koje je češće prisutno kod straha, boli ili u svrhu termoregulacije. Životinje koje boluju od bolesti dišnog sustava mogu imati izraženu tahipneju ili češće dahtati, ali to nije pouzdan izolirani nalaz kod bolesti dišnih puteva i trebao bi se tumačiti u skladu s ostalim nalazima (DEAR, 2020.). Tahipneja (a čak i dispneja) često može biti nalaz i kod primarno kardioloških stanja (zastojno zatajivanje srca), toplinskog udara, metaboličkih bolesti (hiperadrenokorticism, hipertireoidizam), ascitesa, proširenja i zavrnuća želudca, hipovolemijskog ili septičkog šoka te intoksikacija (ENGLAR, 2019.). Frekvencija disanja zabilježena je najrjeđe od svih parametara trijasa (21/37 pasa) u ovom istraživanju, s

medijanom od 30/minuti u skupini s upalnim bolestima, 40/minuti u skupini s neoplazmama i u jednog psa s kolapsom bronha (neupalna/neneoplastična skupina). U preostalih pasa frekvencija disanja nije evidentirana, najčešće zbog prisutnosti dahtanja. Nije dokazana statistički značajna razlika između parametara trijasa i pojedinih skupina bolesti u ovome istraživanju.

Auskultacija pluća važan je alat u sklopu kliničkog pregleda kojom se dobivaju osnovne početne informacije i stanju pluća, pa je tako auskultacija provedena u svih pasa u ovom istraživanju. Obostrano uredan dišni šum nad plućima imalo je pet pasa u ovom istraživanju, a često su bilježeni patološki nalazi poput prisutnosti pooštrenog dišnog šuma, jednostrano u jednog psa s bilateralnom paralizom larinksa (ali bez znakova zahvaćanja donjih dišnih puteva), te obostrano u 17 pasa, najčešće onih s upalnim bolestima (N = 9). U ovome su istraživanju hropci detektirani u jednog psa s CIRDC-om i jednog s bilateralnom paralizom larinksa bez znakova zahvaćenosti donjih dišnih puteva, dok su krepitacije zabilježene u jednog psa s gnojnom bronhopneumonijom. U ovom su istraživanju zvižduci zabilježeni u dva psa, jednog s gnojnom bronhopneumonijom te jednog iz kontrolne skupine (s brahicefaličnim sindromom opstrukcije dišnih puteva). Nije pronađena statistički značajna veza među fiziološkim ili patološkim dišnim zvukovima i pojedinih skupina bolesti u ovom istraživanju. Anglosaksonska veterinarska literatura ne prepoznaje razliku među hropaca i krepitacija, te se navodi i problematika opisivanja i prepoznavanja fizioloških i patoloških zvukova nad plućima (ENGLAR, 2019b.). ROUDEBUSH i RYAN (1989.) u svom istraživanju navode nejasnost i nekonzistentnost u definiranju dišnih šumova, te su tada primijetili i po 12 raznih opisivanih zvukova koji bi po svojim karakteristikama odgovarali onome što se u hrvatskoj literaturi opisuje kao hropac ili krepitacija. Do danas ostaje potreba da se standardiziraju dišni šumovi u veterinarskoj medicini, što bi omogućilo lakšu komunikaciju među kliničarima i ustanovama, te lakše sakupljanje podataka za znanstvene radove (ENGLAR, 2019b.). U ovom su istraživanju zvižduci zabilježeni u dva psa, jednog s gnojnom bronhopneumonijom te jednog iz kontrolne skupine (s brahicefaličnim sindromom opstrukcije dišnih puteva). Nije pronađena statistički značajna veza među fiziološkim ili patološkim dišnim zvukovima i pojedinih skupina bolesti u ovom istraživanju.

Šum nad desnom stranom srca povezuje se s degeneracijom trikuspisnih zalistaka i posljedničnom regurgitacijom, ventrikulskim septalnim defektom ili pak s plućnom

hipertenzijom (OHAD i sur., 2013.). Plućna hipertenzija heterogena je skupina bolesti u kojih dolazi do povećanja otpora unutar plućne vaskulature. Bolesti koje dovode do ovog stanja variraju od bolesti lijeve strane srca (poput miksomatozne bolesti mitralnih zalistaka ili bolesti miokarda), preko tromboembolijskih bolesti i dirofilarijaze sve do plućne hipertenzije zbog bolesti pluća (KELLIHAN i STEPIEN, 2010.). Bolesti pluća svakako su jedan od čestih uzroka plućne hipertenzije, pa se ovisno o istraživanjima, njihova učestalost kreće od 23 do 50 % ukupnih bolesti u populaciji pasa koji boluju od plućne hipertenzije (KELLIHAN i STEPIEN, 2010.). Načelno, bilo koja bolest pluća zbog koje nastaju područja alveolarne hipoksije može uzrokovati hipoksijsku vazokonstrukciju plućnih žila. To za posljedicu ima povećanje plućnog vaskularnog otpora, što dovodi do plućne hipertenzije. U ovom je istraživanju desnostrani sistolički srčani šum detektiran u dva psa, od kojih je jedan bolovao od gnojnog rinitisa, a drugi od kroničnog bronhitisa.

Laboratorijske pretrage krvi provedene su često u pasa u ovom istraživanju pa je tako hemogram rađen u svih pasa, a koncentracija CRP-a u gotovo  $\frac{3}{4}$  pasa. U ljudi, tumori pluća pripadaju među najčešće maligne bolesti s rastućim morbiditetom i mortalitetom. Visoki preoperativni hematokrit bio je povoljan faktor za preživljenje, dok su pacijenti s niskim hematokritom imali kraće vrijeme preživljenja u odnosu na one s visokim hematokritom u jednom istraživanju tumora pluća u ljudi (ZHANG i sur., 2018.). Anemija, leukocitoza, i trombocitoza u ljudi često se povezuju sa solidnim tumorima poput tumora pluća (SHOENFELD i sur., 1986.). Istraživanja u ljudi prijavljuju incidenciju anemije 50 – 60 % u pacijenata s tumorima pluća, te se predlaže teorija anemije kronične bolesti kao uzroka (LANGER i sur., 2002.). Iako je anemija povezana sa skraćenim vremenom preživljenja u pasa s limfomom (MILLER i sur., 2009.), rijetki radovi upućuju i na povezanost plućnih tumora sa sekundarnom imunosno posredovanom anemijom (YUKI i NAITOH, 2019.). Ni jedan pas u ovom istraživanju nije imao znakove koji bi odgovarali imunosno posredovanoj hemolitičkoj anemiji (SWANN i sur., 2019.), a samo su dva psa iz skupine neoplastičnih bolesti imala hematokrit niži od 37 %, što bi bilo kompatibilno s anemijom (ETTINGER i sur., 2024.). Jedan od tih dvaju pasa bolovao je od metastaza po plućima, najvjerojatnije podrijetlom od hemangiosarkoma slezene, dok je drugi imao primarni tumor pluća nepoznata podrijetla. Hemangiosarkom slezene jest neoplazma koja se u pasa često povezuje s anemijom, a može nastati zbog ruptуре i krvarenja tumora, diseminirane intravaskularne koagulopatije ili mikroangiopatske hemolize (HAMMOND i PESILLO-CROSBY, 2008.). U kontekstu humane

medicine, anemija se povezuje i s većom stopom ponovne pojave tumora, što potencijalno odražava agresivnije tumore ili veću količinu tumorskog tkiva (BRIZEL i sur., 1999.). Leukocitoza i trombocitoza koje se u ljudi povezuju s tumorima pluća (SHONFELD i sur., 1986.), te paraneoplastična leukocitoza opisana u mačaka s karcinomom pločastog epitela (DOLE i sur., 2004.) nisu zabilježeni u ovom istraživanju. C-reaktivni protein jest protein akutne faze upale koji je važan čimbenik urođene imunosti i, osim što je važan biomarker upale u ljudi (RIZO-TELLEZ i sur., 2023.) i pasa, dokazano je da povećana koncentracija CRP-a može upućivati i na traumatske ili neoplastične procese (MALIN i WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ, 2022.). Pretpostavlja se da rast koncentracije CRP-a u pacijenata (ljudskih i životinjskih) s tumorskim bolestima ne nastaje izravno zbog djelovanja samog tumora, već zbog sekundarne upale koju tumori proizvode. Iako je u pasa niz raznih tumora do sada povezan s porastom koncentracije CRP-a, hematopoetski tumori najčešće uzrokuju znatan rast. Osim toga, diseminirani se tumori češće povezuju s visokim porastom CRP-a, dok solidni tumori rjeđe dovode do povećanja njegove koncentracije (NAKAMURA i sur., 2008.). Dok se u pasa tumori pluća standardno ne povezuju s povećanjem koncentracije CRP-a, u ljudi s tumorima pluća njegova povećana koncentracija korelira s veličinom tumora, lošijom prognozom i metastazama (HART i sur., 2020). U ovom su istraživanju najviše pojedinačne vrijednosti CRP imali pas s konačnom dijagnozom histiocitnog sarkoma u plućima (239,2), te pas sa solitarnom masom u plućima (168,4). Zanimljivo je da skupina s upalnim bolestima u ovom istraživanju nije imala statistički relevantno više razine CRP-a. To se može objasniti i heterogenim dijagnozama koje ulaze u glavne skupine, pa tako u skupinu upalnih bolesti, osim bolesti koje se klasično povezuju sa značajnim porastom CRP-a (poput eozinofilne bronhopneumopatije ili pneumonije) većinu pacijenata u toj skupini čine i psi s kroničnim bronhitisom, bolesti kod koje kronična i blaga upala ne dovodi do porasta CRP-a (MALIN i WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ, 2022.).

Pretrage na parazite povezane s respiratornim invazijama u pasa uključivale su serološke pretrage na srčanog crva (*D. immitis*), brzi antigenski test na plućnog crva (*A. vasorum*) te koprološku pretragu na jajašca *A. vasorum* i *C. vulpis*. Navedenim testovima nije otkrivena prisutnost parazita koji se povezuju s respiratornim invazijama, ali je koprološkom pretragom ustanovljena prisutnost crijevnog parazita *Giardia duodenalis* u dva psa, dok je 4Dx testom u pet pasa otkrivena prisutnost protutijela na mikroorganizme roda *Anaplasma*. Jedan od pasa, s konačnom dijagnozom kolapsa bronha, imao je istodobno gijardijazu i pozitivan

4DX test na mikroorganizme roda *Anaplasma*. Invazija pasa crijevnim parazitom *Giardia duodenalis* je česta, a uloga ovih bičaša u nastanku raznih kliničkih znakova povezanih s probavnim sustavom, uglavnom kroničnim proljevom, dobro je poznata. U istraživanju ŠMIT i suradnika (2023.) zabilježeni su kronični znakovi poput proljeva, smanjenog apetita, povraćanja, gubitka tjelesne mase i prisutnosti sluzi u izmetu, ali znakovi u dišnom sustavu do sada u pasa nisu zabilježeni. *Giardia lamblia* čest je gastrointestinalni parazit ljudi, koji odgovara *G. duodenalis* pasa, gdje također uzrokuje slične kliničke znakove, i iako su nedavna istraživanja dovela u pitanje vezu te invazije u ljudi i respiratornih alergija, za sada nisu pronađeni uvjerljivi dokazi koji bi potvrdili tu teoriju (SOUZA i sur., 2012.). Pseća anaplazmoza s druge strane ima potencijal očitovati se i respiratornim znakovima. Pozitivan 4Dx test označava prisutnost protutijela na proteobakterije roda *Anaplasma*, koja u pasa može imati dva važna patogena: *A. phagocytophilum* i *A. platys*. Prvi mikroorganizam uzrokuje pseću granulocitnu anaplazmozu, emergentnu, potencijalno zoonotsku bolest koja se prenosi krpeljima sa svjetskom distribucijom (CARRADE i sur., 2009.). Prisutnost ovog parazita i u Hrvatskoj dobro je poznata, sa seroprevalencijom od čak 6 % u populaciji naizgled zdravih pasa i pasa iz skloništa (MRLJAK i sur., 2017.) te 0,3 % molekularnom metodom u populaciji naizgled zdravih pasa (HUBER i sur., 2017.). Klinički znakovi u pasa pojavljuju se u relativno malog broja pasa ili pak imaju blag i samolimitirajući tijek bolesti obilježen multisistemskim i (najčešće) nespecifičnim znakovima poput inapetencije, letargije, anoreksije, gubitka tjelesne mase ili vrućice. Opisani su i znakovi u ostalim organskim sustavima poput mišićno-koštanog, probavnog, krvotvornog, ali i dišnog sustava. Opisani respiratorni znakovi uključivali su dispneju, tahipneju i kašalj (EL HAMIANI KHATAT i sur., 2021.). *A. platys* uzrokuje cikličnu trombocitopeniju pasa i načelno se ne povezuje s respiratornim znakovima, osim respiratornog distresa u slučaju krvarenja u pluća ili prsnu šupljinu (ATIF i sur., 2021.). S obzirom na relativno visoku seroprevalenciju u pasa bez kliničkih znakova, za potvrdu dijagnoze potrebno je detektirati rast titra parnih seruma ili potvrditi infekciju molekularnim metodama, a PCR metoda smatra se pouzdanijom i utoliko što detektira mikroorganizme i prije serokonverzije (DINIZ i BREITSCHWERDT, 2012.). Ni jedan pas u ovom istraživanju nakon PCR pretrage krvi nije imao detektirane odsječke nukleinske kiseline *A. phagocytophilum* ili *A. platys*, zbog čega je najvjerojatnije objašnjenje pozitivnog 4Dx testa detekcija protutijela koja su prisutna zbog prethodne infekcije, te da nemaju veze s respiratornim znakovima.



Slikovna dijagnostika provedena je u većine pasa u ovom istraživanju kako bi se došlo do konačne dijagnoze. Rendgenska pretraga bila je provedena u gotovo svih pasa u ovom istraživanju i bila je (u kombinaciji s ostalim dijagnostičkim testovima) dovoljna za postavljanje konačne dijagnoze u 29 pasa, dok je u njih sedam bila potrebna napredna slikovna dijagnostika u obliku CT-a. Nije pronađena statistički značajna veza između prisutnosti patoloških promjena detektiranih slikovnom dijagnostikom i pojedinih skupina bolesti u ovom istraživanju. Napredak u ispravnoj dijagnostici bolesti koje zahvaćaju dišne puteve, plućni parenhim i plućnu vaskulaturu svakako se u velikoj mjeri oslanja na CT (MASSEAU i REINERO, 2019.). Iako postaje sve zastupljeniji u akademskim i privatnim veterinarskim ustanovama diljem svijeta, i dalje se često koristi kao sekundarna metoda nakon rendgenografije prsne šupljine, koja se nameće kao obavezan prvi korak za dobivanje minimalne baze podataka u pasa sa znakovima oboljenja donjih dišnih puteva (ETTINGER i sur., 2024.). U postavljanju inicijalne dijagnoze većine bolesti dišnog sustava i pleuralnog prostora rendgenografija pruža zadovoljavajuće podatke, no daje ograničene informacije o mogućem uzroku, o točnoj lokaciji lezija u odnosu na okolna tkiva i za planiranje kirurškog zahvata (BOZTOK ÖZGERMEN i BUMİN, 2016.).

Traheobronhoskopija pomoću fleksibilnog endoskopa važan je minimalnoinvazivan korak u dijagnostici bolesti donjih dišnih puteva, koji omogućuje inspekciju sluznice dušnika i bronha te uzimanje uzoraka (ETTINGER i sur., 2024). Provedena je u gotovo svih pasa u ovom istraživanju, a patološki nalaz sluznice u obliku zažarenosti ili prisutnosti promjene konzistencije sluznice bili su zabilježeni u polovici pasa u ovom istraživanju. Iako je potrebna dodatna oprema i obrazovanje te iskustvo kliničara, endoskopija se razvila u jednu od najvažnijih dijagnostičkih metoda za dijagnostiku respiratornih bolesti. U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna korelacija između patoloških promjena sluznice, prisutnosti i količine sluzi, te prisutnosti traheomalacije ili bronhomalacije s konačnom dijagnozom. Bronhoalveolarno ispiranje, bilo "slijepo" bilo bronhoskopsko, također je minimalnoinvazivna tehnika koja omogućuje dobivanje uzoraka za daljnje pretrage, osobito u slučaju difuznih bolesti dišnih puteva, plućnog intersticija ili alveola (ŠMIT i VUČKOVIĆ, 2024.). Uz ostale dijagnostičke metode, BAL pomaže u postavljanju konačne dijagnoze u dvije trećine pasa kojima se provodi (KAJIN i sur., 2018.). S druge strane, nalaz patoloških promjena prilikom citološke pretrage bronhoalveolarnih ispiraka značajno je korelirao sa skupinama pasa s

neoplastičnim i upalnim bolestima u ovom istraživanju. Značajna korelacija nije pronađena sa skupinom s neupalnim i neneoplastičnim bolestima i kontrolnom skupinom.

Citološka pretraga BAL ispiraka služi kao osnova postavljanja konačne dijagnoze u 25 % slučajeva, a pomaže poduprijeti dijagnozu u do 50 % slučajeva (HAWKINS, 2020.). Postavljanje konačne dijagnoze moguće je u slučajevima kada su prisutni mikroorganizmi ili maligno promijenjene stanice. Nalaz bakterija treba oprezno komentirati, no kultura BAL ispirka u kombinaciji s citološkom pretragom može povisiti osjetljivost postavljanja dijagnoze infekcije, pogotovo s obzirom na to da traheobronhalno stablo pasa nije sterilno (PEETERS i sur., 2000). Osim toga, citološka pretraga BAL ispirka može pomoći u identifikaciji specifičnih mikroorganizama poput *B.bronchiseptica*, *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp., gljivica i parazita (VALENCIANO i COWELL, 2014.). Pojedina istraživanja navode da se nalazi intracelularnih bakterija pri citološkoj pretrazi poklapaju do 74 % s mikrobiološkim dokazom infekcije (JOHNSON i sur., 2013.). U ovom istraživanju citologija BAL uzoraka nije identificirala specifične mikroorganizme, osim kokoidnih bakterija u jednom uzorku psa s gnojnom upalom i konačnom dijagnozom CIRDC-a te mikrobiološkim dokazom (no ne i molekularnim) dokazom *B. bronchyseptica*. Osim kod upala, citologija BAL uzoraka može ispravnije detektirati prisutnost plućnog limfoma od radiografije, dok se karcinomi mogu detektirati u 57 % slučajeva, a sarkomi jako rijetko (HAWKINS, 2020). Karcinomi čine više od 80 % primarnih tumora pluća i ako zahvaćaju bronhalno stablo, onda se očekuje da će se odljuštene stanice lako sakupiti u BAL, dok su metastatski tumori najčešće u intersticiju, pa se ne očekuje da će BAL biti uspješna metoda dobivanja neoplastičnih stanica (osim ako tumor nije invadirao bronhalno stablo) (VALENCIANO i COWELL, 2014.). U ovom istraživanju citologija BAL uzoraka služila je za postavljanje konačne dijagnoze u samo jednog od sedam pasa iz skupine s neoplastičnim bolestima, i to u psa s histiocitnim sarkomom pluća, gdje su stanice specifične morfologije s kriterijima malignosti prepoznate kao maligno alterirani histioci. Mikrobiološka pretraga bronhoalveolarnih ispiraka podrazumijeva pretragu na aerobne i (rjeđe) anaerobne bakterije, mikoplazme te gljivice. Pozitivan nalaz mikrobiološke pretrage često je nužan u postavljanju konačne dijagnoze infekcije donjih dišnih puteva, iako se ponekad takva dijagnoza postavlja i u nedostatku kulture u pasa s kompatibilnim kliničkim i laboratorijskim nalazima, a važno je i za napomenuti da se postavljanje dijagnoze infekcije često temelji isključivo na pozitivnom nalazu kulture, što dovodi do pretjeranog dijagnostičiranja infekcija, s obzirom na to da dišni putevi pasa nisu sterilni (ANGUS i sur., 1997.). U ovom je istraživanju bakteriološka pretraga na aerobne bakterije pomogla u

postavljanju dijagnoze u većini slučajeva, tako da je infekcija isključena (26/36 uzoraka), dok je u 10 uzoraka nalaz bio pozitivan. Najčešće je izdvojen uzročnik *B. bronchyseptica*, koji se često povezuje s respiratornim infekcijama pasa. Nije izdvojena niti jedna vrsta anaerobna bakterija, a mikrobiološka pretraga na mikoplazme nije provedena ni na jednom uzorku. Kontaminacija, definirana kao rast kolonija samo na mediju za obogaćivanje ili rast tri ili više kolonija, te nedostatak citološke ili kliničke kompatibilnosti, detektirana je u 40 % pretraženih uzoraka. Navedeni podatci u skladu su s nedavno provedenim opsežnim retrospektivnim istraživanjem mikrobiološke i citološke pretrage BAL ispiraka pasa s bolestima donjih dišnih puteva. Tamo je utvrđeno da je polovica pozitivnih kultura (N = 244) bila zbog kontaminacije, a od 105 stvarno pozitivnih najčešće su izdvajane aerobne bakterije, te rjeđe mikobakterije i anaerobni uzročnici (JOHNSON i sur., 2013.). U tom je istraživanju više od polovice pozitivnih anaerobnih kultura bilo detektirano u pasa s dokazom stranog tijela unutar donjih dišnih puteva. U ovom istraživanju ni jedan pas nije imao dokaz stranog tijela u donjim dišnim putevima, bilo putem traheobronhoskopije bilo slikovnom dijagnostikom. Moguće je da kliničari zaduženi za odabir pretraga upravo zbog te činjenice nisu tražili pretragu na anaerobne bakterije. Osim toga, izolacija anaerobnih bakterija zahtijeva posebne medije, podložna je greškama prilikom rukovanja (izlaganje kisiku) i često se događa da aerobne kulture prerastu anaerobne (JOHNSON i sur., 2013.). Mikološka pretraga bronhoalveolarnih ispiraka provedena je često u pasa u ovom istraživanju, s negativnim rezultatom u gotovo svim uzorcima, dok je samo jedan od 36 pretraženih pokazao porast gljivica roda *Aspergillus*. U veterinarskoj medicini postoji nedostatak istraživanja na temu mikološke pretrage bronhoalveolarnih ispiraka, a starije istraživanje navodi da je ova metoda pomogla u detekciji većine blastomikoze i histoplazmoze, ali ne i kokcidioidiomikoze (HAWKINS i DENICOLA, 1990.). Aspergiloza u pasa ima dva opisana oblika: aspergiloza gornjih dišnih puteva i diseminirana aspergiloza (BARRS i DEAR, 2021.). Aspergiloza gornjih dišnih puteva dijeli se na manje neinvazivnu sinonazalnu, te agresivniju sinoorbitalnu. Diseminirana invazivna aspergiloza pasa rijetka je bolest koja nastaje inhalacijom spora u pluća i njihovom diseminacijom po ostatku organizma s posljedičnim višeorganskim znakovima, od kojih dominiraju sistemski znakovi poput letargije, šepanja, anoreksije i kaheksije, povraćanja i proljeva, a rjeđe i respiratornih znakova (BARRS i DEAR, 2021.; LIM i sur., 2022.). Psi kojima su prethodno dobivali glukokortikoide i psi pasmine njemački ovčar prezastupljeni su u ovoj bolesti (LIM i sur., 2022.). Porast gljivica roda *Aspergillus* pronađenih u uzorku BAL jednog psa u ovom istraživanju s konačnom dijagnozom eozinofilne bronhopneumopatije tumači se kao kontaminacija. Taj pacijent nije

imao znakove zahvaćenosti više organa, a nacional, anamneza, podaci kliničkog pregleda i nalaz velikog broja eozinofila u BAL ispirku s negativnom bakteriološkom pretragom i negativnim parazitološkim pretragama, kao i dobar odgovor na imunosupresivnu terapiju, pomogli su u postavljanju dijagnoze eozinofilne bronhopneumopatije, zbog čega je mogućnost diseminirane aspergiloze kod njega smatrana neznčajnom.

Molekularna pretraga provedena je u svih 37 uzoraka bronhoalveolarnog ispirka u ovom istraživanju. Samo je u jednom uzorku dokazana prisutnost *B. bronchiseptica*, i to u psa s konačnom dijagnozom CIRDC-a, gdje je već prethodno ista bakterija izolirana i bakteriološkom pretragom. Zanimljivo, u ostala tri psa, u kojih je bakteriološkom pretragom dokazana *B. bronchiseptica* PCR metodom nije nađen dokaz nukleinske kiseline tog uzročnika. *B. bronchiseptica* je gram-negativna, aerobna, kokobacilarna bakterija koja je prilagođena na kolonizaciju dišnog epitela pasa i jedan je od najčešćih mikroorganizama upletenih u CIRDC, s PCR detekcijom 15 % svih briseva spojnice i ždrijela (MICHAEL i sur., 2021.). Od četiri psa u ovom istraživanju, s pozitivnom bakteriološkom pretragom na ovog uzročnika, tri su psa imala konačnu dijagnozu CIRDC-a, a jedan gnojne bronhopneumonije. Iako bordetela može biti prisutna u gornjim dišnim putevima zdravih pasa, njezina izolacija iz donjih dišnih puteva pasa s kompatibilnom kliničkom slikom svakako učvršćuje dijagnozu klinički relevantne infekcije (REAGAN i SYKES, 2020). Iako su u posljednje vrijeme razvijeni PCR paneli za dijagnostiku više uzročnika upletenih u CIRDC (CPIV, CAV-2, CDV, CRCoV, CHV, CIV, *B. bronchiseptica*, i *Mycoplasma* spp.) lažno negativni rezultati česti su zbog tranzijentnog ili blagog izlučivanja mikroorganizama, te zbog degradacije uzorka prilikom transporta u laboratorij (RUCH-GALLIE i sur., 2016.). U ljudskom istraživanju pacijenata s infekcijom *B. pertussis*, osjetljivost PCR-a bila je malo veća od osjetljivosti bakteriološke pretrage (65 % prema 58 %), ali je PCR bio negativan u 6 % slučajeva s pozitivnom bakteriološkom kulturom nazofaringealnog brisa (LIND-BRANDBERG i sur., 1998.). CANONNE i suradnici (2016.) također prijavljuju veću osjetljivost PCR metode, koristeći qPCR metodu, infekcija *B. bronchiseptica* detektirana je u svim pretraženim uzorcima, dok je bakterijska kultura bila pozitivna u tek malo više od pola pretraženih uzoraka. S obzirom na to da su uzorci BAL ispiraka u ovom istraživanju bili zamrznuti i odmrznuti prije molekularne pretrage, moguće je da se nukleinska kiselina degradirala što je dovelo do veće stope lažno negativnih rezultata PCR-a u odnosu na bakteriološku pretragu. Zamrzavanje se često koristi za čuvanje uzoraka prije raznih pretraga, pa tako i molekularne pretrage. Istraživanja provedena na zamrznutim

uzorcima riba za PCR detekciju *Flavobacterium columnare* (SUOMALAINEN i sur., 2006.), kao i ljudsko istraživanje gdje se molekularnom metodom dokazivala prisutnost nukleinske kiseline *Mycoplasma genitalium* (CARLSEN i sur., 2010.), pokazala su da skladištenje, zamrzavanje i odmrzavanje mogu značajno oštetiti stanice i uništiti nukleinske kiseline, te na taj način smanjiti osjetljivost ove metode. S druge strane, u ovom je istraživanju u 11/37 uzoraka dokazana prisutnost mikroorganizama roda *Mycoplasma*. Mikoplazme su najmanji poznati jednostanični mikroorganizmi, kojima nedostaje stanična stijenka. Njihova uloga u respiratornim bolestima pasa do dan-danas nije u potpunosti razjašnjena, a mogu se izolirati iz pluća i dušnika do 25 % zdravih pasa (REAGAN i SYKES, 2020.). *M. cynos* je jedina mikoplazma koja se značajno povezuje s bolestima dišnih puteva pasa, najčešće pneumonijama, ali još uvijek nije jasno je li ona primarni ili sekundarni patogen jer se, isto kao i ostale mikoplazme, izdvaja i iz pluća zdravih pasa (CHANDLER i LAPPIN, 2022.). U ovom istraživanju PCR metodom nisu dokazane nukleinske kiseline *M. cynos*, zbog čega se nalaz nukleinskih kiselina roda *Mycoplasma* smatra nalazom upitnog kliničkog značenja. JOHNSON i suradnica (2013.) objašnjavaju česti nalaz mikoplazma prilikom mikrobiološke pretrage BAL ispiraka u njihovoj populaciji pasa često upotrebi beta-laktamskih antibiotika, koji selekcioniraju rast mikoplazma u odnosu na bakterije. U našem je istraživanju zabilježeno da je čak 16/37 pasa bilo terapiранo antibioticima prije dijagnostike, a samo dva psa liječena antibioticima imala su pozitivan nalaz PCR-a na mikobakterije, ali ne i *M. cynos*, te nije ustanovljena statistički značajna razlika među tim varijablama.

## 6.2. PROTEOMSKA ANALIZA

Stalna potraga za inovativnim tehnologijama u biomedicinskim istraživanjima vodi ka poboljšanoj dijagnostici bolesti, otkrivanju novih lijekova i terapijskih intervencija, sve s ciljem unapređenja zdravlja životinja i ljudi. U tom kontekstu, proteomika temeljena na spektrometriji masa pruža holistički pristup istraživanju biološke funkcije stanica i tkiva. Ovo istraživanje obuhvatilo je proteomsku karakterizaciju seruma, bronhoalveolarnog ispiraka i sline pasa s bolešću donjih dišnih puteva i bez bolesti donjih dišnih puteva.

### 6.2.1. PROTEOMSKA ANALIZA SERUMA ISTRAŽIVANIH PASA

Serum je jedan od najvrjednijih, lako dostupnih bioloških uzoraka koji se jednostavno uzorkuje, a sadržava stotine proteina. Proteini u serum dolaze normalnim staničnim i tkivnim procesima ili pak s druge strane, oštećenjem stanica. Stoga, prisutnost ili promjena u izražajnosti proteina može upućivati na početak i napredovanje većine bolesnih stanja, pogotovo za tkiva koja nisu unutar krvno-tkivne barijere (WEN i sur., 2018.). Navedeno serum čini odličnim potencijalnim izvorom biomarkera bolesti. S druge strane, sustavna analiza proteoma seruma iznimno je izazovna zbog svoje složenosti, ali i zbog prilično širokog dinamičkog raspona koncentracija proteina koji obuhvaća više od deset redova veličina, te velike fiziološke varijacije među uzorcima. Proteomom seruma također dominira mali broj proteina visoke zastupljenosti, kao što su albumin i imunoglobulini, koji zajedno čine više od 80 % ukupnih proteina seruma (ŠIMONJI, 2023.).

U ovom su istraživanju u serumu pasa sa i bez bolesti donjih dišnih puteva identificirano je 10 proteina s najmanje dva jedinstvena peptida u više od 50% uzoraka po grupi, koji su se statistički značajno razlikovali među skupinama. Mali broj istraživanja istraživanja analizirao je proteom seruma zdravih pasa ili pasa u fiziološkom stanja poput gravidnosti, gdje su utvrđena 32 proteina u zdravih pasa proteomikom temeljenom tehnikom na gelu (dok tehnike bez gela poput TMT omogućuju cjelovitu analizu proteoma) (ATHERTON i sur., 2013a.), a čak 250 proteina u gravidnih kuja (VALDES i sur., 2019.). S druge strane, proteom seruma psa opisan je i kod brojnih patoloških stanja, poput dilatativne kardiomiopatije (BILIĆ i sur., 2018b.), degenerativne bolesti srčanih zalistaka (KULEŠ i sur., 2020.), osteoartritis (GHARBI i sur., 2013.), babezioze (KULEŠ i sur., 2014.), erlihioze (ESCRIBANO i sur., 2017.), lišmanioze (FRANCO-MARTINEZ i sur., 2020a.), hemangiosarkoma (KIRBY i sur., 2011.), multicentričnog limfoma visokog stupnja (ATHERTON i sur., 2013b.), osteosarkoma (BRADY i sur., 2018.) i tumora mliječne žlijezde (FRANCO-MARTINEZ i sur., 2020b.).

Do sada nije provedena analiza proteoma seruma pasa s bolestima donjih dišnih puteva, pa ovo istraživanje predstavlja prvi takav opis. Većina detektiranih proteina seruma odnosila se na procese primarne ili sekundarne hemostaze, te u manjoj mjeri i uz sustav aktivacije komplementa.

Hemostaza i sustav komplementa dva su važna povezana sustava, čija je uloga obrana domaćina od ozljede i uzročnika bolesti. Osim sprečavanja krvarenja, sustav zgrušavanja može se smatrati i djelom urođenog imunskog sustava, s obzirom na to da njegova aktivacija sudjeluje u sprječavanju invazije mikroorganizama. Budući da potječu od zajedničkog pretka, često su se predlagale interakcije između tih dviju kaskada, ali precizni molekularni putevi ove međusobne komunikacije ostali su do danas nepotpuno razjašnjeni (AMARA i sur., 2009.).

Protrombin je ekstracelularni protein koji ima važnu ulogu u procesu zgrušavanja krvi, a njegov se deficit opisuje u pacijenata s nedostatkom vitamina K ili teških bolesti jetre u ljudi, te postoje rijetki zapisi o pacijentima koji takav poremećaj razvijaju kao posljedicu kemoterapije. Postoji i prikaz slučaja žene oboljele od limfoma koja je razvila hipoprotrombinemiju (LEE i sur., 2001.). Abnormalnosti sustava zgrušavanja dobro su dokumentirane u ljudskih pacijenata, a iako se ove bolesti češće očituju tromboemolijskim stanjima, hemoragijske su bolesti također opisane (NAND i sur., 1987.). S obzirom na to da je deficit protrombina rijetko opisivani u pacijenata s neoplazmama, ovaj bi se protein također mogao dalje istražiti da se bolje opiše njegova uloga u karcinogenezi i potencijalno koristi kao serumski biološki biljeg ove skupine bolesti. Deficit protrombina u ljudi opisuje se u sklopu sindrom lupus antikoagulans – hipoprotrombinemije (LAHPS), rijetke upalne bolesti, kod koje dolazi do stvaranja protutijela na protrombin, posljedično, s njegovom smanjenom koncentracijom, ali se osim toga rijetko dovodi u vezu s upalnim stanjima, osobito donjih dišnih puteva (OMER i sur., 2022.). U našem istraživanju relativna zastupljenost protrombina bila je manja u skupini s neoplastičnim bolestima i upalnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu.

Beta-2-glikoprotein 1 topljivi je protein plazme koji regulira komplement i zgrušavanje, a u ljudi je važan zbog toga što sadržava antigene na koje se stvaraju autoprotutijela u pacijenata s autoimunskim antifosfolipidnim sindromom, važnim u kontekstu stvaranja tromba, te u opstetričkih bolesti, gdje dovodi do rekurentnih pobačaja (MCDONNELL i sur., 2020.). Sve uloge ovog proteina, iako je poznata njegova uloga u regulaciji zgrušavanja i komplementa u oba smjera (aktivacija i inaktivacija), nisu u potpunosti razjašnjene u ljudi, a nedavna istraživanja impliciraju i njegovu ulogu u ishemijskoj miokarda, placenti u fizioloških i kompromitiranih trudnoća, ishemijske ozljede mozga,

degeneraciji retine te gram-negativnoj septikemiji (MCDONNELL i sur., 2020.). U pasa se protutijela na ovaj protein impliciraju u imunosno-posredovanu trombocitopeniju, no osim toga nedostaje istraživanja uloge ovog proteina u bolesti pasa, osobito onih koje zahvaćaju dišne puteve (CHEN i sur., 2016.). Njegova zastupljenost bila je niža u pasa s upalnim bolestima i tumorskim bolestima u odnosu na neupalne/neneoplastične bolesti, odražavajući vjerojatno njegovu ulogu u sustavu komplementa i zgrušavanja koji se povezuju sa procesima upale i karcinogeneze. Daljnja su istraživanja potrebna kako bi se razjasnila točnija uloga ovog proteina u procesima bolesti.

Član 1 obitelji serpina G jest ekstracelularan, visoko glikozilirani protein plazme, s brojnim sinonimima (C1 inhibitor, Serpin G1, inhibitor komponente 1 komplementa), koji se u ljudi povezuje s regulacijom kaskade komplementa tako da inhibira njegovu aktivaciju (GENE CARDS, 2024). U ljudi se njegov deficit povezuje s nastankom angioedema, a osim urođenog deficita ovog proteina, njegov stečeni deficit pojavljuje se u sklopu imunosno posredovanih bolesti i karcinoma prostate, iako nedostaju istraživanja o ulozi ovog proteina kod ostalih neoplazmi ljudi i pasa (PENG i sur., 2018.). U našem je istraživanju relativna zastupljenost ovog proteina bila veća u skupini s neoplastičnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu i upalnu skupinu, što se ne poklapa s istraživanjem PENG i suradnika (2018), gdje je njegova ekspresija bila smanjena u pacijenata s karcinomom prostate, iako ti autori navode da je nejasno je li aktivacija sustava komplementa putem Serpin G1 zaslužna za ubijanje tumorskih stanica ili pak potiče karcinogenezu. Osim neposredne važnosti ovog proteina kao biomarkera, on bi mogao poslužiti za daljnja istraživanja karcinogeneze tumora donjih dišnih puteva pasa.

C-tip lektina jest proteinski receptor koji veže razne ligande, s ulogom u urođenom imunosnom odgovoru i, zanimljivo, u apoptozi. Apoptoza je homeostatska smrt stanice, pojava koja je aktivna, regulirana i energijski štedna, s ciljem eradiciranja starih ili oboljelih stanica, s minimalnim posljedicama za organizam (CAMBI i FIGDOR, 2009.). Uloga C-tip lektinskih receptora opisana je u nizu tumora u ljudi, sudjeluju u glikozilaciji tumorskih stanica, izbjegavanju imunosti (opisano kod raka debelog crijeva), promoviraju metastaziranje i diseminiranje tumorskih stanica, uređivanju tumorskog mikrookoliša te infekciji tumora (LI, 2023.). U nedavnom su istraživanju ETEMAD i suradnici (2023.) dokazali da je koncentracija C-tip lektinskog receptora 2 bila manja u pacijenata s kolorektalnim karcinomom, tumorom



mliječne žlijezde i melanomom, dok je u pacijenata s glioblastomom bila veća, te postavljaju hipotezu da je manja koncentracija u većine tumora povezana s internalizacijom ovih receptora aktiviranim trombocitima. U našem istraživanju, član 1 obitelji lektina 3 tip C imao je značajno nižu zastupljenost u skupini s neoplastičnim bolestima i u skupini s neupalnim/neneoplastičnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovaj protein mogao bi poslužiti za daljnja istraživanja biomarkera tumorskih oboljenja donjih dišnih puteva u pasa.

Teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina jest protein iz skupine proteina koji se nazivaju inhibitorima inter-alfa-tripsina, molekule koje su u evolucijskom pogledu jako stare i evoluirale su kroz nekoliko stotina milijuna godina evolucije kralježnjaka, s nepotpuno razjašnjenom ulogom, uglavnom u regulaciji staničnih procesa, kontroli aktivacije neutrofila, inhibiciji komplementa i hijaluronidaza, a u stanicama pluća s ulogom u cijeljenju rana (LORD i sur., 2020.). U patološkom smislu, u ljudi se implicira njihova uloga u bolesti poput astme, ali stanja poput sepse, ozljede središnjeg živčanog sustava, artritisa i raznih tumora (LORD i sur., 2020.). Teški lanac 3 inter-alfa inhibitora tripsina u ljudi se spominje i kao potencijalan biomarker aktivnosti bolesti u pacijenata s mijastenijom gravis (SCHROETER i sur., 2024.), dok se teški lanac 4 inter-alfa inhibitora tripsina koristi kao biomarker septikemije (MA i sur., 2021.) i upalne bolesti crijeva (WEN i sur., 2022.). U našem je istraživanju zastupljenost ovog proteina bila manja u skupini s upalnim bolestima, kao i u skupini s neupalnim/neneoplastičnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu, što se ne podudara s istraživanjem o teškom lancu 4 inter-alfa inhibitora tripsina, čija ekspresija raste kod upalnih stanja, vjerojatno zbog njegove uloge u akutnoj fazi upale gdje sudjeluje u proliferaciji i upalnih migriranju stanica (MA i sur., 2021.). S obzirom na nedostatak istraživanja o ulozi teškog lanca 3 inter-alfa inhibitora tripsina u humanoj i veterinarskom medicini, teško je donijeti zaključke o njegovoj ulozi u upalnom odgovoru, te su potrebna daljnja istraživanja koja bi potvrdila njegov potencijal kao negativnog proteina akutne faze upale.

Apolipoprotein A-II pripada proteinima koji se vežu na lipide kako bi tvorili lipoproteine zbog čega je njihova primarna uloga kao nosilac lipida, a u ljudi oni se sastoje od 22 člana od kojih je jedan i apolipoprotein A-II (REN i sur., 2019.). U našem je istraživanju relativna zastupljenost ovog proteina bila najmanja u skupini s neoplastičnim bolestima, iako je i kod skupine sa upalnim bolestima bila niža u odnosu na kontrolnu. U ljudi je redukcija serumske razine APOA1 važan negativni faktor za predviđanje pojave metastaza i nepovoljne

prognoze u pacijenata s tumorima pluća, nazofarinksa, ovarija, kolona, prostate, bubrega te u limfoma (REN i sur., 2019.). KSHIRO i suradnici (2024.) istražili su ulogu apolipoproteina A-II kao biomarkera za ranu detekciju tumora gušterače, te ističu veću osjetljivost od do tada korištenog biomarkera. Zastupljenost ovog proteina bila je, zanimljivo, manja i u pasa iz skupine upalne bolesti u odnosu na kontrolnu u našem istraživanju. S obzirom na poznata istraživanja uloge apolipoproteina A-I u tumorima pluća, te novija istraživanja o ulozi apolipoproteina A-II u tim bolestima, ovaj bi se protein potencijalno mogao koristiti i za daljnja istraživanja kao potencijalan biomarker tumorskih bolesti pluća u pasa, a možda i upalnih bolesti donjih dišnih puteva pasa. Uloga apolipoproteina A-II nije u potpunosti razjašnjena kod upalnih bolesti ljudi, ali se apolipoprotein E i A-I, koji se eksprimiraju na stanicama pluća, upleću u patogenezu brojnih bolesti poput astme, plućne fibroze, plućne hipertenzije i tumora pluća (YAO i sur., 2016.), pa će se buduća istraživanja potencijalno osvrnuti i na ulogu ovog proteina u upalnim u tumorskim bolestima donjih dišnih puteva pasa.

Protein nalik na Ig jest lanac aminokiselina identificiranih u velikom broju proteina s vrlo različitim biološkim funkcijama, a nalaze se u kralježnjaka, beskrležnjaka, biljaka, gljiva, parazita, bakterija i virusa (HÜTTENER i sur., 2022.) te je trenutačno nejasno na koji bi se način mogli iskoristiti u daljnjim istraživanjima. U našem su istraživanju identificirana čak tri ovakva različita proteina sa statistički značajnim razlikama među skupinama bolesti.

Protein AMBP, poznat pod nazivom prekursor alfa-1-mikroglobulina/bikunina, jest glikoprotein koji se u fiziološkim uvjetima visoko eksprimira u jetri ljudi, a može se detektirati u plazmi i urinu. On je prekursor koji se proteolitički cijepa u dva različita funkcionalna proteina:  $\alpha$ -1-mikroglobulin, koji pripada transportnoj natporodica lipokalina i ima ulogu u regulaciji upalnih procesa; i bikunin, koji je urinarni inhibitor tripsina koji pripada nadobitelji inhibitora proteaze tipa Kunitz i ima važnu ulogu u mnogim fiziološkim i patološkim procesima, kao što je modulacija rasta stanica, blokiranje staničnog unosa kalcija i sudjelovanje u upali. Nedavno je prijavljena povezanost između proteina AMBP i bikunina i malignih tumora u ljudi, poput tumora mliječne žlijezde, karcinoma bubrega i karcinoma pločastog epitela usne šupljine (SEKIKAWA i sur., 2018.), dok se u pasa predlaže kao biomarker ozljede bubrega (NABOULSI i sur., 2024). Ovaj je protein imao značajno nižu zastupljenost u skupini s upalnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu s neoplastičnim bolestima u našem istraživanju. Kako je ranije navedeno, ovaj protein ima ulogu u regulaciji upalnih

processa te ne začuđuje nalaz ovog istraživanja koji govori da bi upravo on mogao služiti kao mogući biomarker upalnih procesa donjih dišnih puteva pasa.

### **6.2.2. PROTEOMSKA ANALIZA BRONHOALVEOLARNIH ISPIRAKA ISTRAŽIVANIH PASA**

Bronhoalveolarni ispirci važan su medij za istraživanje patologije i fiziologije donjih dišnih puteva, dominantno pluća, zbog bogatog repertoara proteina koji se iz njih mogu identificirati, a specifični su za pluća (WEISE i sur., 2023). Ispirak sadržava razne stanične elemente: rezidencijalne stanice pluća kao i upalne ili neoplastične stanice u procesima bolesti, zatim proteine koji tamo dolaze sekrecijom, nukleinske kiseline domaćina i mikroorganizama, što je omogućilo brojna istraživanja koja su opisala specifična patološka stanja i identificirala biomarkere bolesti (TIRONE i sur., 2021.; WEISE i sur., 2023.). S druge strane, njegova inherentna kemijska složenost donosi brojne izazove u proteomici bronhoalveolarnih ispiraka: prisutnost mnogih proteina koji potječu iz plazme s velikom zastupljenošću (npr. albumin, transferin, itd.) koji mogu potisnuti detekciju manjih količina proteina dobivenih BAL, zatim potencijal za interferirajuće molekule koje se nalaze u sluzi i/ili lipidnim surfaktantima, kao i visok sadržaj soli iz fiziološke otopine koja se koristi u kolekciji BAL, a svi oni općenito nisu kompatibilni s proteomskim sustavima temeljenim na nanoskalnom LC-MS/MS, razrjeđivanje molekula izvedenih iz tkiva zbog velikih količina fiziološke otopine koja se ponekad koristi za prikupljanje uzoraka i ograničavanje količine sakupljenog proteinskog materijala, ovisno o subjektu (npr. male pasmine pasa ili mačke u odnosu na velike pse) samo su neka od ograničenja s kojima za znanstvenici suočavaju pri radu s ovim medijem (BOWLER i sur., 2017.). U ovom je istraživanju identificirano 17 proteina koji su imali statistički značajno različitu zastupljenost među skupinama, te na taj način nadodaje znanje na prethodno provedena proteomska istraživanja provedena na bronhoalveolarnim ispicima pasa s plućnom fibrozom, kroničnim bronhitisom i zdravim psima (LILJA-MAULA i sur., 2013.; MAHER i sur., 2022.).

Analiza bioloških puteva povezanih s proteomom bronhoalveolarnog ispirka psa pokazala je da je većina identificiranih proteina povezana s regulacijom urođenog imunskog sustava, primarnom i sekundarnom hemostazom i metaboličkim putevima ugljikohidrata.

Beta nalik na rezistin bio je jedini protein čija je zastupljenost bila statistički značajno manja u pasa s tumorskim bolestima donjih dišnih puteva u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovaj protein pripada u skupinu nedavno identificiranih proteina koji se nazivaju molekulama nalik na rezistin, čija se uloga u ljudi povezuje s upalnim, infektivnim i metaboličkim poremećajima, kao i progresijom tumorskih procesa, osobito tumora pluća (HU i sur., 2017.). Osim toga, njegova uloga u reguliranju funkcije epitela u ljudi s astmom, plućnom hipertenzijom i fibrozom/remodeliranjem pluća također je opisana (DEB i sur., 2021.; SHI i sur., 2023.). Daljnja istraživanja trebaju se usmjeriti na dobivanje kohezivnije slike ove molekule i njezino moguće korištenje kao biomarker neoplastičnih bolesti donjeg dišnog sustava iz bronhoalveolarnih ispiraka.

Sedam proteina sa statistički različitom zastupljenošću identificirano je između skupina s upalnim bolestima i kontrolne skupine, gdje je zastupljenost glukoza-6-fosfat-1-dehidrogenaze, fruktoza-bisfosfat-aldolaze, faktora maturacije glije i poli(rc) vezujućeg proteina 1 bila veća u pasa s upalnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je zastupljenost antitrombina-III, serotransferina i alfa-2-HS-glikoproteina bila manja. Glukoza-6-fosfat-1-dehidrogenaza jest enzim uključen u reguliranje redoks-reakcija unutar stanica i kao antioksidans, a inhibicija ove molekule pokazala je atenuacijski učinak u mišjem modelu akutne ozljede pluća (NADEEM i sur., 2018.). Ljudi s urođenim deficitom ovog enzima predisponirani su na autoimunosne bolesti i infekcije s mogućom ulogom ovog proteina u stvaranju proupalnog stanja, najvjerojatnije putem oksidacijskog stresa (ISRAEL i sur., 2023.). Fruktoza-bisfosfat-aldolaza jest ubikvitarni citosolni enzim koji sudjeluje u procesu glikolize, a nedavna istraživanja dokazuju i mnoštvo drugih, neglikolitičkih funkcija unutar i van stanice, od kojih su važna za napomenuti imunogena svojstva. Uloga ovog proteina istražuje se i povezuje s karcinomom pločastog epitela pluća ljudi (DU i sur., 2014.) i sprečavanjem plućne fibroze (DIAS i sur., 2019.). Nedavno istraživanje upućuje i na ulogu ovog proteina u preživljavanju i umnažanju patogena (ZIVERI i sur., 2017.). Faktor maturacije glije jest protein koji se uglavnom nalazi u središnjem živčanom sustavu, osobito astrocitima, s mogućom proupalnom ulogom, a dokazano je na modelu ishemijske ozljede mozga da ovaj protein ima i

izravan proupalni učinak i dovodi do oštećenja plućne mikrovaskulature (XU i sur., 2018.). S druge strane, niska ekspresija ovog proteina povezana je s nižom stopom preživljenja u ljudi s tumorima pluća (TANG i sur., 2022.). Poli(rc) vezujući protein 1 pripada u podskupinu heterogenih ribonuklearnih proteina te interaktira s RNK i proteinima, regulirajući na taj način ekspresiju gena na više razina, a njegova je uloga za sada opisana i u supresiji tumora, među kojima je opisano i da inhibira nastanak adenokarcinoma pluća (ZHENG i sur., 2022.). Uloga ovog proteina povezuje se i s rastom stanica te modulacijom neurorotektivnih i upalnih čimbenika, snižavajući razinu interleukina 6 (proupalnog čimbenika), a povisujući razinu interleukina 10 (protuupalnog čimbenika) (MA i sur., 2024.). Depozicija fibrina unutar alveola jedno je od obilježja pneumonije, a antitrombin-III, zajedno s drugim molekulama, služi za sprečavanje zgrušavanja i shodno tome ima i protuupalni učinak, pa su CHOI i suradnici (2008.) na štakorskom modelu upale pluća dokazali da dodavanje antitrombina-III značajno smanjuje procese zgrušavanja vezane uz upalu pluća. Osim toga, razina serumske koncentracije, kao i koncentracije u bronhoalveolarnim ispircima, antitrombina-III bila je niža nakon inhalacije dima, pogoršavajući na taj način koagulopatiju povezanu sa sistemskim upalnim odgovorom kod ovog stanja u ljudi (KOWAL-VERN i sur., 2020.). Serotransferin, poznat i pod nazivom transferin, pripada u skupinu glikoproteina koji vežu željezo, a imaju antimikrobni učinak, učinak na diferencijaciju i rast stanica, te su uključeni u citoprotektivne procese. U plućima se sintetiziraju u plućnom epitelu i stanicama submukoznih žlijezda, a uloga ovog proteina opisuje se u bronhoalveolarnom ispirku ljudi sa sarkoidozom, sistemskom granulomatoznom upalom koja zahvaća i tkivo pluća, (SHIGEMURA i sur., 2010.), zatim kroničnom opstruktivnom bolešću pluća i sindromom akutnog respiratornog distresa ljudi (STITES i sur., 1995.). Alfa-2-HS-glikoprotein, poznat i pod nazivom fetuin A, jest protein koji se dominantno proizvodi u jetri i oslobađa u plazmu, a sudjeluje u sprečavanju kalcifikacije tkiva. Opisana je i njegova uloga u nastanku inzulinske rezistencije, kardiovaskularnim bolestima i policističnim jajnicima (VOELKL i sur., 2014.). Ovaj je protein izdvojen i iz bronhoalveolarnih ispiraka zdravih ljudi (CHEN i sur., 2008.).

Protuupalni učinak fetuina A antagoniziranjem faktora nekroze tumora beta i alfa opisan je te se smatra da ima važnu ulogu u zaštiti protiv letalnih sistemskih upala (CHEKOL ABEBE i sur., 2022.). S obzirom na ulogu svih ovih proteina u modulaciji upalnih procesa, buduća su istraživanja potrebna da se razjasni uloga ovih proteina u patogenezi bolesti donjih dišnih puteva pasa, a neke bi od njih mogle biti istražene kao kandidati za biomarkere upalnih bolesti donjih dišnih puteva u pasa.

Devet je proteina sa statistički različitom zastupljenošću otkriveno između skupina s neoplastičnim i upalnim bolestima u ovom istraživanju. Fosfoglicerat-kinaza, piruvat-kinaza, protrombin, protein toplinskog šoka 90-alfa klasa B član 1, protein toplinskog šoka 90-beta član 1, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze, protein kontrole dijeljenja stanice 42 (homolog), prednji gradijentni protein 2 član obitelji disulfid-izomeraza, heterogeni nuklearni ribonukleoprotein imali su statistički značajno veću zastupljenost u skupini pasa s upalnim bolestima u odnosu na one s tumorskim bolestima donjih dišnih puteva. Fosfoglicerat-kinaza jest esencijalni metabolički enzim koji sudjeluje u generiranju adenzin-trifosfata tijekom glikolize. No uloga ovog proteina opisuje se i u biološkim procesima poput reguliranja angiogeneze i popravka DNK, a njegova amplifikacija povezuje se s onkogenim učinkom, pa se opisuje i u pojedinim tumorima pluća u ljudi (TIAN i sur., 2024.). Piruvat-kinaza jest enzim koji je uključen u proces glikolize, a ima četiri izoenzima: jetreni, eritrocitni, mišićno/moždani (PKM1), te izoenzim koji se nalazi u većini tkiva odraslih jedinki (PKM2), od kojih su posljednja dva eksprimirana genom PKM, koji je detektiran u našem istraživanju (KULSOOM i sur., 2020.). Uloga PKM2 dovodi se u usku vezu s procesom tumorogeneze u ljudi, a njegova ekspresija služi kao histopatološki marker loše prognoze u ljudi s adenokarcinomom pluća (ZHANG i sur., 2020.). Osim toga, PKM2 potiče i proupalne medijatore u modelu alergijske bolesti dišnih puteva (VAN DE WATERING i sur., 2020.). Uloga protrombina (faktora zgrušavanja II) u bronhoalveolarnim ispicima ljudi i životinja za sada je nerazjašnjena, on se producira na mjestu vaskularne ozljede i ima ulogu u upali i cijeljenju tkiva pluća, a visoka razina trombina dokazana je u bronhoalveolarnim ispicima ljudi s upalom pluća (GOAO i sur., 2023.). Proteini toplinskog šoka 90 velika su obitelj brojnih proteina prisutnih u eukariotskim, ali i bakterijskim stanicama. Ti proteini služe kao molekularni “pratioci”, pomažući u nabiranju proteina, sprečavaju agregaciju proteina te pomažu popravljati oštećene proteine, a njihova visoka ekspresija povezuje se s brojnim patološkim stanjima ljudi, poput neurodegenerativnih bolesti, upala i tumora (WEI i sur., 2024.). Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza protein je citosola koji sudjeluje u metabolizmu glukoze i poznat je kao molekula “domaćica” stanice, a pojedina istraživanja upućuju i na ulogu ovog proteina u procesima apoptoze, reparacije DNK i zaštite telomera (HARA i sur., 2006.). Ovaj je protein pokazao i protuupalni učinak, štiteći od sepse i smanjujući broj proupalnih citokina u mišjem modelu akutne ozljede pluća (TAKOTA i sur., 2014.). Protein kontrole dijeljenja stanice 42 jest membranski protein koji regulira migraciju stanice, s ulogom i u brojnim tumorskim i netumorskim bolestima ljudi zbog

prometastatskog učinka, učinka na proliferaciju stanica, a njegova se visoka ekspresija povezuje s malignim tumorima, ali i stanjima poput upale dišnih puteva (FU i sur., 2022.). Prednji gradijentni protein 2, član obitelji disulfid-izomeraza, pripada u obitelj disulfidnih izomeraza, proteina vezanih uz endoplazmatski retikul, koji kataliziraju nabiranje proteina, ali se povezuju i s tumorima, pogotovo kada su pretjerano eksprimirani, pa se tako pokazalo da ima ulogu i u nastanku brojnih tumora, osobito tumora pluća (CHAVET i sur., 2013.). Heterogeni nuklearni ribonukleoprotein regulira procese transkripcije i translacije, sudjeluje u remodeliranju kromatina i održavanju stabilnosti RNK, pri čemu nedavna istraživanja pokazuju i da sudjeluje u reguliranju tumorogeneze kao i supresije tumora, služeći kao onkogen brojnih malignih oboljenja ljudi, poglavito tumora pluća ljudi (LI i sur., 2022.). S obzirom na nerazjašnjene uloge svih navedenih proteina u neoplazmama, ali i upali, buduća bi istraživanja mogla osvijetliti njihovu kompleksnu međusobnu interakciju te potencijalno korištenje tih proteina kao biomarkera za razlikovanje upalnih od tumorskih bolesti donjih dišnih puteva pasa.

### **6.2.3. PROTEOMSKA ANALIZA SLINE ISTRAŽIVANIH PASA**

Slina je važna izlučevina koja održava homeostazu usne šupljine, sadržava brojne proteine, peptide (uključujući imunoglobuline), enzime i citokine, sa svrhom vlaženja hrane, formiranja bolusa, lubriciranja sluznice usne šupljine, održavanjem mineralizacije zubi, s imunološkom ulogom, te služi kao pufer za usnu šupljinu (SANGUANSERMSRI i sur., 2018.). Iako slina potječe uglavnom od slinskih žlijezda, manji se dio sastoji od krvi, te nosno-bronhalnog iscjetka (GUO i sur., 2006.). Relativno lako i neinvazivno dobivanje uzoraka sline dovelo je do porasta zanimanja istraživača za proučavanje sastava ove biološke tekućine u zdravih pojedinaca s krajnjim ciljem identificiranja biomarkera bolesti, koji bi mogli poslužiti kao neinvazivni biljezi patoloških stanja. Proteom zdravih pasa identificirao je 2,491 proteina, a proteomikom su otkriveni i proteini koji bi se mogli koristiti kao biomarkeri bolesti u stanja poput piometre (FRANCO-MARTINEZ i sur., 2020.), parvoviroze i pojedinih neoplazmi (pogotovo onih koji zahvaćaju usnu šupljinu) (GONZÁLEZ-AROSTEGUI i sur., 2021.). Iako se smatra da je i u humanoj medicini proteomika za istraživanje bolesti donjih dišnih puteva tek u svojim povojima, postoje brojna istraživanja koja su prikazana u nedavnom pregledu

literature, gdje je komentirana primjena proteomike za identifikaciju potencijalnih biomarkera u ljudi s bronhalnom astmom, kroničnom opstruktivnom bolešću pluća, pneumonijom, tuberkulozom i tumorima pluća (LI i sur., 2021.).

U ovom je istraživanju identificiran samo jedan protein sline, protein koji sadržava WAP domenu, čija je zastupljenost bila manja u skupini s neupalnim/neneoplastičnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu. Proteini koji sadržavaju WAP domenu jesu skupina proteina s važnom ulogom u reguliranju imunskog odgovora domaćina i imaju visoku ekspresiju u slini ljudi, gdje se smatra da ima antimikrobni učinak i ključnu ulogu u obrani sluznice (SHIMOMURA-KUROKI i sur., 2020.). Uloga ovog proteina u bolestima dišnog sustava ljudi i pasa za sada nije ustanovljena, te se buduća istraživanja mogu osvrnuti na ulogu proteina koji sadržava WAP domenu u bolestima donjih dišnih puteva pasa.



## 7. ZAKLJUČCI

- 1) Najučestalije bolesti donjih dišnih puteva pretražene populacije pasa bile su upalne bolesti, od kojih su najčešće dijagnosticirani kronični bronhitis i gnojna bronhopneumonija.
- 2) Najučestaliji klinički znak bolesti donjih dišnih puteva u ovom istraživanju bio je kašalj, koji je u većine pasa bio kroničnog tijeka i suhog karaktera. Suhi je kašalj bio značajno češći u skupine pasa s upalnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu.
- 3) Psi s neoplazmama donjih dišnih puteva imali su značajno manje vrijednosti hematokrita i značajno veće serumske vrijednosti C-reaktivnog proteina u odnosu na ostale skupine.
- 4) Prevalencija zaraznog kašlja pasa u pretraženoj populaciji pasa u skladu je s dosadašnjim istraživanjima o učestalosti ove bolesti.
- 5) Proteomskom analizom seruma utvrđene su statistički značajne promjene ekspresije devet proteina među skupinama pasa s upalnim, neoplastičnim, neupalnim/neneoplastičnim bolestima te u kontrolnoj skupini, većina kojih je uključena u procese primarne i sekundarne hemostaze.
- 6) Proteomskom analizom bronhoalveolarnih ispiraka utvrđene su statistički značajne promjene ekspresije 17 proteina među skupinama pasa s upalnim i neoplastičnim bolestima, te u kontrolnoj skupini, većina kojih je uključena u procese primarne i sekundarne hemostaze, imunosni odgovor i metabolizam ugljikohidrata.
- 7) Proteomskom analizom sline utvrđene su značajne promjene ekspresije jednog proteina (protein koji sadržava WAP domenu) među skupinama pasa s neupalnim/neneoplastičnim bolestima i u kontrolnoj skupini.
- 8) Proteini sa statistički značajno visokom zastupljenošću među skupinama s upalnim bolestima, neoplastičnim bolestima i neupalnim/neneoplastičnim bolestima mogu poslužiti u budućim istraživanjima kao kandidati za biološke biljege.

## 8. POPIS LITERATURE

ADAMAMA-MORAITOU, K. K., D. PARDALI, M. J. DAY, N.N. PRASSINOS, M. KRITSEPI-KONSTANTINOY, M. N. PATSIKAS, T.S. RALLIS (2010): Canine bronchomalacia: a clinicopathological study of 18 cases diagnosed by endoscopy. *Vet J.*;191(2):261-6. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.11.021.

AL-AMRANI, S., Z. AL-JABRI, A. AL-ZAABI, J. ALSHEKAILI, M. AL-KHABORI (2021): Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem.* 27;12(5):57-69. doi: 10.4331/wjbc.v12.i5.57.

AMARA, U., D. RITTIRSCH, M. FLIERL, U. BRUCKNER, A. KLOS, F. GEBHARD, J. D. LAMBRIS, M. HUBER-LANG (2008): Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* doi: 10.1007/978-0-387-78952-1\_6.

ANDEREGG, L., M. IM HOF GUT, U. HETZEL, E. W. HOWERTH, F. LEUTHARD, K. KYÖSTILÄ, H. LOHI, L. PETTITT, C. MELLERSH, K.M. MINOR, J.R. MICKELSON, K. BATCHER, D. BANNASCH, V. JAGANNATHAN, T. LEEB. (2019): NME5 frameshift variant in Alaskan Malamutes with primary ciliary dyskinesia. *PLoS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1008378.

ANDREASEN, C. B. (2003): Bronchoalveolar lavage. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 33, 69-88. doi: 10.1016/s0195-5616(02)00056-6.

AMIS, T. C., B. C. MCKIERNAN (1986): Systematic identification of endobronchial anatomy during bronchoscopy in the dog. *Am J Vet Res*;47:2649.

ANGUS, J.C., S.S. JANG, D.C. HIRSH (1997): Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). *J Am Vet Med Assoc.* ;210(1):55-8. PMID: 8977649.

ARMBRUST L. J., D. S. BILLER, A. BAMFORD (2012): Comparison of three-view thoracic radiography and computed tomography for detection of pulmonary nodules in dogs with neoplasia. *J Am Vet Med Assoc.*; 240(9):1088–1094.

ATHERTON, M.J., M. BRACELAND, J. HARVIE, R.J. BURCHMORE, S. EADIE, P.D. ECKERSALL, J.S. MORRIS. (2013A): Characterisation of the normal canine serum proteome

using a novel electrophoretic technique combined with mass spectrometry. *Vet J.* 2013 Jun;196(3):315-9. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.12.011.

ATHERTON, M.J., M. BRACELAND, S. FONTAINE, M.M. WATERSTON, R.J. BURCHMORE, S. EADIE, P.D. ECKERSALL, J.S. MORRIS. (2013b): Changes in the serum proteome of canine lymphoma identified by electrophoresis and mass spectrometry. *Vet J.* 2013 Jun;196(3):320-4. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.12.010.

ATIF, F.A., S. MEHNAZ, M.F. QAMAR, T. ROHEEN, M.S. SAJID, S. EHTISHAM-UL-HAQUE, M. KASHIF, M. BEN SAID (2021): Epidemiology, Diagnosis, and Control of Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia and Granulocytic Anaplasmosis: Emerging Diseases of Veterinary and Public Health Significance. *Vet Sci.* 2021 Dec 8;8(12):312. doi: 10.3390/vetsci8120312.

BACH, J. F., E. A. ROZANSKI, D. BEDENICE, D. L. CHAN, L. M. FREEMAN, J. L. LOFGREN, T. J. OURA, A. M. HOFFMAN (2007): Association of expiratory airway dysfunction with marked obesity in healthy adult dogs. *Am J Vet Res.* Jun;68(6):670-5. doi: 10.2460/ajvr.68.6.670. PMID: 17542702.

BARRETT, L. E., R. E. POLLARD, A. ZWINGENBERGER, A. ZIERENBERG-RIPOLL, K. A. SKORUPSKI (2014): Radiographic characterization of primary lung tumors in 74 dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound. The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association.* Sep-Oct;55(5):480-487. doi: 10.1111/vru.12154.

BARKER, A.F. (2002): Bronchiectasis. *N Engl J Med.*346:1383–1393. doi: 10.1056/NEJMra012519.

BARRS, V. R., J. D. DEAR (2021): Aspergillosis and penicilliosis. In: Sykes JE (ed): *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 5th ed. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, pp. 1069-93.

BELLAU-PUJOL S., A. VABRET, L. LEGRAND, J. DINA, S. GOUARIN, J. PETITJEAN-LECHERBONNIER, B. POZZETTO, C. GINEVRA, F. FREYMUTH (2005): Development

of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *Journal of Virological Methods*. Jun;126(1-2):53-63. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.01.020.

BETTINI, G., M. MORINI, L. MARCONATO, P. S. MARCATO, E. ZINI (2010): Association between environmental dust exposure and lung cancer in dogs. *Vet J*. Dec;186(3):364-9. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.09.004.

BILIĆ, P., J. KULEŠ, A. GALAN, L. GOMES DE PONTES, N. GUILLEMIN, A. HORVATIĆ, A. FESTA SABES, V. MRLJAK, P.D. ECKERSALL (2018a): Proteomics in veterinary medicine and animal science: neglected scientific opportunities with immediate impact. *Proteomics* 18 (14). doi: 10.1002/pmic.201800047.

BILIĆ P., N. GUILLEMIN, A. KOVAČEVIĆ, B. BEER LJUBIĆ, I. JOVIĆ, A. GALAN, P. D. ECKERSALL, R. BURCHMORE, V. MRLJAK (2018): Serum proteome profiling in canine idiopathic dilated cardiomyopathy using TMT-based quantitative proteomics approach. *J Proteomics*. May 15;179:110-121. doi: 10.1016/j.jprot.2018.03.007.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69, 1-7. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.

BOSSHARD, P. P. (2011): Incubation of fungal cultures: how long is long enough? *Mycoses*. 54(5):e539-45 doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01977.x.

BRADY, J. V., R. M. TROYER, S. A. RAMSEY, H. LEEPER, L. YANG, C. S. MAIER, C. P. GOODALL, C. E. RUBY, H. A. M. ALBARQI, O. TARATULA, S. BRACHA (2018): A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. *Transl Oncol*. Oct;11(5):1137-1146. doi: 10.1016/j.tranon.2018.07.004.

BRETON, A. N.: Pneumonia in the Dog and Cat. *International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium* 2012.

BRIZEL D. M., R. K. DODGE, R. W. CLOUGH, M. W. DEWHIRST (1999): Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol.* Nov;53(2):113-7. doi: 10.1016/s0167-8140(99)00102-4.

BRUNET A., M. BALDASSO, M. CERVONE, L. CHABANNE, J. L. CADORÉ, J. YUGUEROS MARCOS, P. GRACIEUX, E. KRAFFT (2020): Detection of Pathogens Implicated in Canine Infectious Respiratory Disease Complex in Dogs Without Respiratory Signs Hospitalized in a Veterinary Teaching Hospital. *ECVIM-CA Online Congress 2020*.

BOTTERO E., C. BELLINO, D. DE LORENZI, P. RUGGIERO, A. TARDUCCI, A. D'ANGELO, P. GIANELLA (2013): Clinical evaluation and endoscopic classification of bronchomalacia in dogs. *J Vet Intern Med.* Jul-Aug;27(4):840-6. doi: 10.1111/jvim.12096.

BOWLER R. P., C. H. WENDT, M. B. FESSLER, M. W. FOSTER, R. S. KELLY, J. LASKY-SU, A. J. ROGERS, K. A. STRINGER, B. W. WINSTON (2017): American Thoracic Society Workgroup on Metabolomics and Proteomics. New Strategies and Challenges in Lung Proteomics and Metabolomics. An Official American Thoracic Society Workshop Report. *Ann Am Thorac Soc.* Dec;14(12):1721-1743. doi: 10.1513/AnnalsATS.201710-770WS.

BOZTOK ÖZGERMEN B., A. BUMİN (2016): Comparison of computed tomography and thoracic radiography findings for the assessment of pulmonary diseases in dogs. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 63, 339-346. doi: 10.1501/Vetfak\_0000002750.

CLERCX, C., D. PEETERS, F. SNAPS, P. HANSEN, K. MCENTEE, J. DETILLEUX, M. HENROTEAUX, M. J. DAY (2000): Eosinophilic bronchopneumopathy in dogs. *J Vet Intern Med.* May-Jun;14(3):282-91. doi: 10.1892/0891-6640(2000)014<0282:ebid>2.3.co;2.

CLERCX, C., D. PEETERS, A. J. GERMAN, Y. KHELIL, K. MCENTEE, A. VANDERPLASSCHEN, F. SCHYNTS, P. HANSEN, J. DETILLEUX, M.J. DAY (2002): An immunologic investigation of canine eosinophilic bronchopneumopathy. *J Vet Intern Med.* May-Jun;16(3):229-37. doi: 10.1892/0891-6640(2002)016<0229:aiioce>2.3.co;2.

CLSI (2015): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for Bacteria isolated from animals. In: *CLSI Supplement VET01S*, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

CÔTÉ, E., N. J. EDWARDS, S. J. ETTINGER, V. L. FUENTES, K.A. MACDONALD, B.A. SCANSEN, D.D. SISSON, J. A. ABBOTT; WORKING GROUP OF THE AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE SPECIALTY OF CARDIOLOGY ON INCIDENTALLY DETECTED HEART MURMURS (2015): Management of incidentally detected heart murmurs in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* May 15;246(10):1076-88. doi: 10.2460/javma.246.10.1076.

CANNON, M. S., L. R. JOHNSON, P. A. PESAVENTO, P. H. KASS, E. R. WISNER (2013): Quantitative and qualitative computed tomographic characteristics of bronchiectasis in 12 dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2013 Jul-Aug;54(4):351-357. doi: 10.1111/vru.12036.

CANONNE, A. M., F. BILLEN, C. TUAL, E. RAMERY, E. ROELS, I. PETERS, C. CLERCX (2016): Quantitative PCR and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Dogs with *Bordetella bronchiseptica* Infection. *J Vet Intern Med.* 2016 Jul;30(4):1204-9. doi: 10.1111/jvim.14366. PMID: 27461723.

CANONNE, A. M., I. PETERS, E. ROELS, L. DESQUILBET, C. CLERCX (2018): Detection of specific bacterial agents by quantitative PCR assays in the bronchoalveolar lavage fluid of dogs with eosinophilic bronchopneumopathy vs. dogs with chronic bronchitis and healthy dogs. *Vet J.* Feb; 232:52-56. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.014.

CARRADE, D. D., J.E. FOLEY, D. L. BORJESSON, J. E. SYKES (2009): Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med.* Nov-Dec;23(6):1129-41. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x.

CECILIANI, F., D. ECKERSALL, R. BURCHMORE, C. LECCHI (2013): Proteomics in Veterinary Medicine: Applications and Trends in Disease Pathogenesis and Diagnostics. *Veterinary Pathology*, 51 (2), 351-362. doi: 10.1177/0300985813502819.

CHOI, G., J. J. HOFSTRA, J. J. ROELOFS, A. W. RIJNEVELD, P. BRESSER, J. S. VAN DER ZEE, S. FLORQUIN, T. VAN DER POLL, M. LEVI, M. J. SCHULTZ (2008): Antithrombin inhibits bronchoalveolar activation of coagulation and limits lung injury during *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in rats. *Crit Care Med.* Jan;36(1):204-10. doi: 10.1097/01.CCM.0000292012.87482.F4.

CHANDLER, J. C., M. R. LAPPIN (2002): Mycoplasmal Respiratory Infections in Small Animals: 17 Cases (1988–1999). *J Am Anim Hosp Assoc* 1 March 2002; 38 (2): 111–119. doi: <https://doi.org/10.5326/0380111>

CHEKOL ABEBE, E., Z. TILAHUN MUCHE, T. BEHAILE, A. MARIAM, T. MENGIE AYELE, M. MEKONNEN AGIDEW, M. TESHOME AZEZEW, E. ABEBE ZEWDE, T. ASMAMAW DEJENIE, M. ASMAMAW MENGSTIE (2022): The structure, biosynthesis, and biological roles of fetuin-A: A review. *Front Cell Dev Biol.* Jul 18;10:945287. doi: 10.3389/fcell.2022.945287.

CHEN, J., S. RYU, S. A. GHARIB, D. R. GOODLETT, L. M. SCHNAPP. (2008): Exploration of the normal human bronchoalveolar lavage fluid proteome. *Proteomics Clin Appl.* Apr;2(4):585-95. doi: 10.1002/prca.200780006.

CHEN, Y. C., L. M. CHI, K. C. CHOW, S. H. CHIOU, Y. H. FAN, S. P. HO, Y. C. HSU, Y. C. HWANG, M. X. WU, W. M. LEE, S. L. LIN, C.L. TSANG, F. C. MAO (2016): Association of anticardiolipin, antiphosphatidylserine, anti- $\beta$ 2 glycoprotein I, and antiphosphatidylcholine autoantibodies with canine immune thrombocytopenia. *BMC Vet Res.* Jun 13;12(1):106. doi: 10.1186/s12917-016-0727-3.

CHUN, J. L., H. T. BANG, S. Y. JI, J. Y. JEONG, M. KIM, B. KIM, S.D. LEE, Y. K. LEE, K. E. REDDY, K. H. KIM (2019): A simple method to evaluate body condition score to maintain the optimal body weight in dogs. *J Anim Sci Technol.* Nov;61(6):366-370. doi: 10.5187/jast.2019.61.6.366.

CURRAN, M., D. M. BOOTHE, T. L. HATHCOCK, T. LEE-FOWLER (2020): Analysis of the effects of storage temperature and contamination on aerobic bacterial culture results of bronchoalveolar lavage fluid. *J. Vet. Intern. Med.* 34, 160-165. doi: 10.1111/jvim.15686.

DALLMAN, M.J, R.C. MCCLURE, E.M. BROWN (1988): Histochemical study of normal and collapsed tracheas in dogs. *Am J Vet Res.*; 49:2117–2125.

DANESI, P., M. PETINI, C. FALCARO, M. BERTOLA, E. MAZZOTTA, T. FURLANELLO, M. KROCKENBERGER, R. MALIK (2022): Pneumocystis Colonization in

Dogs Is as in Humans. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Mar 8;19(6):3192. doi: 10.3390/ijerph19063192.

DARCY, H. P., K. HUMM, G. TER HAAR (2018): Retrospective analysis of incidence, clinical features, potential risk factors, and prognostic indicators for aspiration pneumonia in three brachycephalic dog breeds. *J Am Vet Med Assoc* Vol 253 (7) pp. 869-876.

DAY, M.J., S. CAREY, C. CLERCX, B. KOHN, F. MARSILLO, E. THIRY, L. FREYBURGER, B. SCHULZ, D.J. WALKER (2020): Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe. *J Comp Path*. Vol. 176, 86-108. doi: 10.1016/j.jcpa.2020.02.005.

DEAR, J.D. (2020): Bacterial Pneumonia in Dogs and Cats: An Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Mar;50(2):447-465. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.10.007.

DEAR, J.D. S.E. HULSEBOSCH, J, L.R. OHNSON (2024): Recognition and Diagnosis of Underlying Disease Processes in Bacterial Pneumonia. *Animals* 2024, 14, 1601. <https://doi.org/10.3390/ani14111601>

DEB, A., B. DESHMUKH, P. RAMTEKE, F. K. BHATI, M. K. BHAT (2021): Resistin: A journey from metabolism to cancer, *Translational Oncology*, Volume 14, Issue 10, doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101178.

DELLA MAGGIORE, A. (2020): An update on tracheal and airway collapse in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2020;50:419–430.

DEAR J.D. (2020): Bacterial pneumonia in dogs and cats: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2020;50:447–465.

DEBERRY, J. D., C. R. NORRIS, V. F. SAMII, S. M. GRIFFEY, F.S. ALMY (2002): Correlation between fine-needle aspiration cytopathology and histopathology of the lung in dogs and cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2002 Jul-Aug;38(4):327-36. doi: 10.5326/0380327.

DIAS, H. B., J. R. DE OLIVEIRA, M. V. F. DONADIO, S. KIMURA (2019) Fructose-1,6-bisphosphate prevents pulmonary fibrosis by regulating extracellular matrix deposition and



inducing phenotype reversal of lung myofibroblasts. *PLoS ONE* 14(9): e0222202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222202>.

DINIZ, P. P., E. B. BREITSCHWERDT: *Anaplasma phagocytophilum* Infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th ed. St. Louis, Elsevier Saunders 2012 pp. 244-254.

DODGE, Y. (2007): *Dictionnaire statistique encyclopédique*. Springer, Berlin, Njemačka.

DOLE, R. S., C. M. MACPHAIL, M. R. LAPPIN (2004): Paraneoplastic leukocytosis with mature neutrophilia in a cat with pulmonary squamous cell carcinoma. *J Feline Med Surg*. 2004 Dec;6(6):391-5. doi: 10.1016/j.jfms.2004.03.001.

ENGLAR, R. E. (2017): *Performing the Small Animal Physical Examination*. Hoboken, NJ: Wiley.

DU, S., Z. GUAN, L. HAO, Y. SONG, L. WANG, L. GONG, L. LIU, X. QI, Z. HOU, S. SHAO (2014): Fructose-Bisphosphate Aldolase A Is a Potential Metastasis-Associated Marker of Lung Squamous Cell Carcinoma and Promotes Lung Cell Tumorigenesis and Migration. *PLoS ONE* 9(1): e85804. doi.org/10.1371/journal.pone.0085804.

EL HAMIANI KHATAT, S., S. DAMINET, L. DUCHATEAU, L. ELHACHIMI, M. KACHANI, H. SAHIBI (2021): Epidemiological and Clinicopathological Features of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Dogs: A Systematic Review. *Front Vet Sci*. Jun 23;8:686644. doi: 10.3389/fvets.2021.686644.

ENGLAR, R. E. (2019a). Changes in Respiratory Rates and Patterns. In *Common Clinical Presentations in Dogs and Cats*. Wiley, Hoboken, SAD. doi.org/10.1002/9781119414612.ch36

ENGLAR, R. E. (2019B). Abnormal Lung Sounds. In *Common Clinical Presentations in Dogs and Cats*, R. E. Englar. Wiley, Hoboken, SAD. doi.org/10.1002/9781119414612.ch37.

EPSTEIN, S. E., K. HOPPER, M. S. MELLEMA, L. R. JOHNSON (2013): Diagnostic utility of D-dimer concentrations in dogs with pulmonary embolism. *J Vet Intern Med*. Nov-Dec;27(6):1646-9. doi: 10.1111/jvim.12177.

ERICSSON, A. C., A. R. PERSONETT, M. E. GROBMAN, H. RINDT, C. R. REINERO (2016): Composition and predicted metabolic capacity of upper and lower airway microbiota

of healthy dogs in relation to the fecal microbiota. PLoS One. 11e0154646. doi: 10.1371/journal.pone.0154646.

ESCRIBANO, D., H. CIHAN, S. MARTÍNEZ-SUBIELA, P. LEVENT, M. KOCATURK, N. AYTUG, J. J. CERÓN, A. TVARIJONAVICIUTE, Z. YILMAZ (2017): Changes in serum proteins in dogs with Ehrlichia canis infection. Microb Pathog. Dec;113:34-39. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.024.

ETTINGER, S.J., E.C. FELDMAN, E. COTE (2024): Ettinger's Textbook Of Veterinary Internal Medicine, Two-Volume Set, Ninth Edition. Elsevier, Inc., St. Louis, SAD. pp. 2673-2851

EUCAST, 2024. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. <http://www.eucast.org>

FASTRÈS, A., B. TAMINIAU, E. VANGRINSVEN, A. C. TUTUNARU, E. MOYSE, F. FARNIR, G. DAUBE and C. CLERCX (2019): Effect of an antimicrobial drug on lung microbiota in healthy dogs. Heliyon. 5, e02802 doi: 10.1016/j.heliyon.2019. e02802

FASTRÈS, A., E. VANGRINSVEN, B. TAMINIAU, A. C. TUTUNARU, H. JABRI, G. DAUBE, C. CLERCX (2020): Assessment of lung microbiota in healthy dogs: impact of breed and living conditions. J. Vet. Int. Med. 339. doi: 10.1111/jvim.15658

FAUL, F., E. ERDFELDER, A. BUCHNER, A. A. G. LANG (2009). Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. Behavior Research Methods, 41, 1149-1160.

FORD, R. B. (2012): Canine Infectious Respiratory Disease. In: Greene CE u Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th ed. Elsevier Saunders, St. Louis, SAD pp. 55-65.

FREEMAN, L. M. (2018): Cachexia and Sarcopenia in Companion Animals: An Under-Utilized Natural Animal Model of Human Disease. JCSM Rapid Communications, 1: 1-17. doi.org/10.1002/j.2617-1619.2018.tb00006.x

FOWLER, J., S. M. STIEGER-VANEGAS, J. A. VANEGAS, G. BOBE, K. P. POULSEN (2017): Comparison of Thoracic Radiography and Computed Tomography in Calves with Naturally Occurring Respiratory Disease. *Front Vet Sci.* Jul 6;4:101. doi: 10.3389/fvets.2017.00101.

FRANCO-MARTÍNEZ, L., M. VILLAR, A. TVARIJONAVICIUTE, D. ESCRIBANO, L. J. BERNAL, J. J. CERÓN, M. D. C. THOMAS, L. MATEOS-HERNÁNDEZ, F. TECLES, J. DE LA FUENTE, M. C. LÓPEZ, S. MARTÍNEZ-SUBIELA (2020A): Serum proteome of dogs at subclinical and clinical onset of canine leishmaniosis. *Transbound Emerg Dis.* Jan;67(1):318-327. doi: 10.1111/tbed.13354.

FRANCO-MARTÍNEZ, L., A. GELEMANOVIĆ, A. HORVATIĆ, M. D. CONTRERAS-AGUILAR, R. DAŃBROWSKI, V. MRLJAK, J. J. CERÓN, S. MARTÍNEZ-SUBIELA, A. TVARIJONAVICIUTE (2020B): Changes in Serum and Salivary Proteins in Canine Mammary Tumors. *Animals (Basel).* Apr 24;10(4):741. doi: 10.3390/ani10040741.

FU, J., B. LIU, H. ZHANG, F. FU, X. YANG, L. FAN, M. ZHENG, S. ZHANG (2022): The role of cell division control protein 42 in tumor and non-tumor diseases: A systematic review. *J Cancer.* 2022 Jan 1;13(3):800-814. doi: 10.7150/jca.65415.

GENE CARDS<sup>®</sup> THE HUMAN GENE DATABASE <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPING1#summaries> (22.07.2024.)

GHARBI. M., C. SANCHEZ, G. MAZZUCHELLI, E. DE PAUW, Y. HENROTIN (2013): Identification of differential pattern of protein expression in canine osteoarthritis serum after anterior cruciate ligament transection: a proteomic analysis. *Vet J.* Sep;197(3):848-53. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.05.037.

GAO. J., Z. ZHANG, J. Y. YAN, Y. X. GE, Y. GAO (2023): Inflammation and coagulation abnormalities via the activation of the HMGB1-RAGE/NF- $\kappa$ B and F2/Rho pathways in lung injury induced by acute hypoxia. *Int J Mol Med.* 2023 Aug;52(2):67. doi: 10.3892/ijmm.2023.5270.

GOGGS, R., D. L. CHAN, L. BENIGNI, C. HIRST, L. KELLETT-GREGORY, V. L. FUENTES (2014): Comparison of computed tomography pulmonary angiography and point-of-care tests for pulmonary thromboembolism diagnosis in dogs. *J Small Anim Pract.* Apr;55(4):190-7. doi: 10.1111/jsap.12185.

GRAVES, P. R., T.A.J. HAYSTEAD (2002): Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 39-63. doi: 10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002

HAMMOND, T. N., S. A. PESILLO-CROSBY (2008): Prevalence of hemangiosarcoma in anemic dogs with a splenic mass and hemoperitoneum requiring a transfusion: 71 cases (2003-2005). *J Am Vet Med Assoc.* Feb 15;232(4):553-8. doi: 10.2460/javma.232.4.553.

HART, P. C., I. M. RAJAB, M. ALEBRAHEEM, L. A. POTEMPA (2020): C-Reactive Protein and Cancer-Diagnostic and Therapeutic Insights. *Front Immunol.* Nov 19;11:595835. doi: 10.3389/fimmu.2020.595835.

HAWKINS, E. C., D. B. DENICOLA (1990): Cytologic analysis of tracheal wash specimens and bronchoalveolar lavage fluid in the diagnosis of mycotic infections in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1990 Jul 1;197(1):79-83.

HAWKINS, E. C., W. B. MORRISON, D. B. DENICOLA, W. E. BLEVINS (1993): Cytologic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from 47 dogs with multicentric malignant lymphoma. *JAVMA* 203, 1418-1425.

HAWKINS, E. C., D. B. DENICOLA, M. L. PLIER (1995): Cytological analysis of bronchoalveolar lavage fluid in the diagnosis of spontaneous respiratory tract disease in dogs: a retrospective study. *J Vet Intern Med.* 1995 Nov-Dec;9(6):386-92. doi: 10.1111/j.1939-1676.1995.tb03298.x.

HAWKINS, E. C., A. J. BIRKENHEUER, H.S. MARR, A. R. ROGALA, E. E. LARGE, K. B. ADLER (2007): Quantification of mucin gene expression in tracheobronchial epithelium of healthy dogs and dogs with chronic bronchitis. *Am J Vet Res.* 68(4), 435-440. doi: 10.2460/ajvr.68.4.435

HAWKINS, E. C., L. D. CLAY, J. M. BRADLEY, M. DAVIDIAN (2010): Demographic and historical findings, including exposure to environmental tobacco smoke, in dogs with chronic cough. *J Vet Intern Med.* Jul-Aug;24(4):825-31. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0530.x.

HAWKINS, E. C. (2020): Respiratory System Disorders. In: *Small Animal Internal Diseases, Sixth Edition* (Nelson, R.W., Couto, C.G.), Elsevier Mosby, St. Louis, SAD, pp. 282-356.

HEIKKILÄ, H. P., A. K. LAPPALAINEN, M. J. DAY, C. CLERCX, M. M. RAJAMÄKI (2011): Clinical, bronchoscopic, histopathologic, diagnostic imaging, and arterial oxygenation findings in West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Vet Intern Med.* 25(3): 433-9. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0694.x.

HEIKKILÄ, H. P., A. K. LAPPALAINEN, M. J. DAY, C. CLERCX, M. M. RAJAMÄKI (2011): Clinical, bronchoscopic, histopathologic, diagnostic imaging, and arterial oxygenation findings in West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Vet Intern Med.* 2011 May-Jun;25(3):433-9. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0694.x.

HEIKKILÄ, H. P., E. KRAFFT, P. JESPERS, K. MCENTEE, M. M. RAJAMÄKI, C. CLERCX (2013): Procollagen type III amino terminal propeptide concentrations in dogs with idiopathic pulmonary fibrosis compared with chronic bronchitis and eosinophilic bronchopneumopathy. *Vet J.* 2013 Apr;196(1):52-6. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.07.023.

HEIKKILÄ-LAURILA, H. P., M. M. RAJAMÄKI (2014): Idiopathic pulmonary fibrosis in west highland white terriers. *Vet Clin North Am Small Anim Pract Vol 44* (1) pp. 129-42.

HEILMANN, R.M., J.M. STEINER (2018): Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *J Vet Intern Med.* 32(5), 1495-1508. doi: 10.1111/jvim.15247

HENDERSON, R.F. (1984): Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage, *Env Health Perspec* 56:115–129.

HORVATIĆ, A., N. GUILLEMIN, H. KAAB, D. MCKEEGAN, E. O'REILLY, M. BAIN, J. KULEŠ, P. D. ECKERSALL (2019). Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with *Escherichia coli*

lipopolysaccharide endotoxin. *Journal of proteomics*, 192, 64–77.  
doi: 10.1016/j.jprot.2018.08.009

HSIEH, B. M., A.K. BEETS (2020): Coughing in Small Animal Patients. *Frontiers in Veterinary Science*. 6, 513-527. doi: 10.3389/fvets.2019.00513

HU, W. W., C. H. TANG, Y. SUN, T. T. LU, P. JIANG, Y. M. WU, C. Q. WANG, S. F. YANG, C. M. SU (2017): Correlation between resistin gene polymorphism and clinical aspects of lung cancer. *Medicine (Baltimore)*. Dec;96(52):e9485. doi: 10.1097/MD.00000000000009485.

HUBER, D., I. REIL, S. DUVNJAK, D. JURKOVIĆ, D. LUKAČEVIĆ, M. PILAT, A. BECK, Ž. MIHALJEVIĆ, L. VOJTA, A. POLKINGHORNE, R. BECK (2017): Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Wolbachia* sp. but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. *Parasitol Res.* 2017 Nov;116(11):3019-3026. doi: 10.1007/s00436-017-5611-y.

HÜTTENER, M., J. HERGUETA, M. BERNABEU, A. PRIETO, S. AZNAR, S. MERINO, J. TOMÁS, A. JUÁREZ (2022): Roles of Proteins Containing Immunoglobulin-Like Domains in the Conjugation of Bacterial Plasmids. *mSphere*. 2022 Feb 23;7(1):e0097821. doi: 10.1128/msphere.00978-21.

IBAÑEZ-TALLON, I., N. HEINTZ, H. OMRAN (2003): To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet.*;12 Spec No 1:R27-R35.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. doi.org/10.1038/35057062

ISRAEL, A., A. A. SCHÄFFER, M. BERKOVITCH, D. J. OZERI, E. MERZON, I. GREEN, A. GOLAN-COHEN, E. RUPPIN, S. VINKER, E. MAGEN (2023): Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency and Long-Term Risk of Immune-Related diseases. *Mar* 24:2023.03.23.23287616. doi: 10.1101/2023.03.23.23287616.

JAFFEY, J. A., K. WIGGEN, S. B. LEACH, I. MASSEAU, R. E. GIRENS, C. R. REINERO (2019): Pulmonary hypertension secondary to respiratory disease and/or hypoxia in dogs: Clinical features, diagnostic testing and survival. *Vet J.* 2019 Sep;251:105347. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.105347.

JAMESON, P. H., L. A. KING, M. R. LAPPIN, R. L. JONES (1995): Comparison of clinical signs, diagnostic findings, organisms isolated, and clinical outcome in dogs with bacterial pneumonia: 93 cases (1986-1991). *J Am Vet Med Assoc.* Jan 15;206(2):206-9. PMID: 7751223.

JEOUNG H.Y., D.S. SONG, W.S. JEONG, W.H. LEE, J.Z. SONG, D.J. AN (2013): Simultaneous detection of canine respiratory disease associated viruses by a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 2013 Jan;75(1):103-106. doi: 10.1292/jvms.12-0287. PMID: 22971595.

JOFFE, D., R. LELEWSKI, J. WEESE, J. MCGILL-WORSLEY, C. SHANKEL, S. MENDONCA, T. SAGER, M. SMITH, Z. POLJAK (2016). Factors associated with development of Canine Infectious Respiratory Disease Complex (CIRDC) in dogs in 5 Canadian small animal clinics. *Canadian Veterinary Journal-revue Veterinaire Canadienne*, 57(1), 46-51.

JOHNSON, L.R., M. R. LAPPIN, D. C. BAKER (1995): Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *J Vet Intern Med.* Jul-Aug;13(4):338-45. doi: 10.1892/0891-6640(1999)013<0338:ptid>2.3.co;2. PMID: 10449226.

JOHNSON, L. R. (2010): *Clinical Canine and Feline Respiratory Medicine.* Blackwell Publishing, Ames, SAD.

JOHNSON, L. R, R.E. POLLARD. Tracheal collapse and bronchomalacia in dogs: 58 cases (7/2001-1/2008). *J Vet Intern Med.* 24:298–305.

JOHNSON, L. R., W. VERNAU (2011): Bronchoscopic findings in cats with spontaneous lower respiratory tract disease (2002-2009). *J. Vet. Int. Med.* 25, 236-243. doi: 10.1111/j.1939- 1676.2011.00688.x

JOHNSON, L.R., E.V. QUEEN, W. VERNAU, J.E. SYKES, B.A. BYRNE (2013): Microbiologic and Cytologic Assessment of Bronchoalveolar Lavage Fluid from Dogs with Lower Respiratory Tract Infection: 105 Cases (2001–2011). *J Vet Intern Med*, 27: 259-267. doi.org/10.1111/jvim.12037

JOHNSON, L.R., M.K. SINGH, R.E., POLLARD Agreement among radiographs, fluoroscopy and bronchoscopy in documentation of airway collapse in dogs. *J Vet Intern Med*. 2015;29:1619–1626.

JOHNSON, L. R., W. VERNAU (2019): Bronchoalveolar lavage fluid lymphocytosis in 104 dogs (2006-2016). *J. Vet. Intern. Med.* 33, 1315- 1321. doi: 10.1111/jvim.15489

JOHNSON, L. R., E. G. JOHNSON, S. E. HULSEBOSCH, J. D. DEAR, W. VERNAU (2019): Eosinophilic bronchitis, eosinophilic granuloma, and eosinophilic bronchopneumopathy in 75 dogs (2006-2016). *J Vet Intern Med*. 2019 Sep;33(5):2217-2226. doi: 10.1111/jvim.15605.

JUNG, D. Y., S. M. PARK, G.H. LIM, K. W. SEO, Y. I. OH, H. Y. YOUN (2024): Assessment of MMP-9 and clinical characteristics in dogs with tracheal collapse based on cough severity and fluoroscopic findings: a cross-sectional study. *BMC Vet Res*. 2024 Feb 10;20(1):52. doi: 10.1186/s12917-023-03872-1. PMID: 38341543; PMCID: PMC10858467.

KAJIN, F., I. SPAJIĆ, V. MATIJATKO, I. KIŠ, M. BRKLJAČIĆ, I. ŠMIT, M. TORTI i V. BENKO (2018): Kad nam “slijepi” BAL otvori oči. Veterinary days scientific-professional conference with international participation. (Opatija, Croatia, October 15-18). *Zbornik radova*. 193-204.

KAJIN, F., I. ŠMIT, V. STEVANOVIĆ, D. REŠETAR MASLOV, I. RUBIĆ, V. MRLJAK, J. KULEŠ (2025). Current application of proteomics in the veterinary field – a short summary and literature review. *Veterinarska stanica*, 56 (2), 245-256. doi.org/10.46419/vs.56.2.6

KASHIRO, A., M. KOBAYASHI, T. OH, M. MIYAMOTO, J. ATSUMI, K. NAGASHIMA, K. TAKEUCHI, S. NARA, S. HIJIOKA, C. MORIZANE, S. KIKUCHI, S. KATO, K. KATO, H. OCHIAI, D. OBATA, Y. SHIZUME, H. KONISHI, Y. NOMURA, K. MATSUYAMA, C. XIE, C. WONG, Y. HUANG, G. JUNG, S. SRIVASTAVA, H. KUTSUMI, K. HONDA



(2024): Clinical development of a blood biomarker using apolipoprotein-A2 isoforms for early detection of pancreatic cancer. *J Gastroenterol.* Mar;59(3):263-278. doi: 10.1007/s00535-023-02072-w.

KELLY, D., F. JUVET, V. LAMB, A. HOLDSWORTH (2023): Bronchial collapse and bronchial stenting in 9 dogs. *J Vet Intern Med.* Nov-Dec;37(6):2460-2467. doi: 10.1111/jvim.16859.

KELLIHAN, H. B., R. L STEPIEN (2010): "Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy." *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 40 4 (2010): 623-41.

KIRBY, G.M., A. MACKAY, A. GRANT, P. WOODS, B. MCEWEN, C. KHANNA, J. MACRI, HAYES MA, STALKER M (2011): Concentration of lipocalin region of collagen XXVII alpha 1 in the serum of dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med.* May-Jun;25(3):497-503.  
doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0709.x.

KOGAN, D. A., L. R. JOHNSON, K. E. JANDREY, R. E. POLLARD (2008): Clinical, clinicopathologic, and radiographic findings in dogs with aspiration pneumonia: 88 cases (2004-2006). *J Am Vet Med Assoc.* 2008 Dec 1;233(11):1742-7.  
doi: 10.2460/javma.233.11.1742.

KOWAL-VERN, A., A. J. DENNIS, P. BOURDON, L. E. CASEY, B. A. LATENSER (2020): Bronchoalveolar lavage and plasma Antithrombin and cytokines in inhalation and burn injury: a pilot study. *Int J Burns Trauma.* Oct 15;10(5):255-262.

KRAFFT, E., P. LYBAERT, E. ROELS, H. P. LAURILA, M.M. RAJAMÄKI, F. FARNIR, M. MYLLÄRNIEMI, M.J. DAY, K. MCENTEE, C. CLERCX (2014): Transforming growth factor beta 1 activation, storage, and signaling pathways in idiopathic pulmonary fibrosis in dogs. *J Vet Intern Med.* 28(6), 1666-1675. doi: 10.1111/jvim.12432

KULEŠ, J., C. DE TORRE, R. BARIĆ RAFAJ, J.SELANEC, V. MRLJAK, J. CERON (2014) A proteomic profile of uncomplicated and complicated babesiosis in dogs. *Farm animal proteomics.* pp: 166-170.

KULEŠ, J., P. BILIĆ, A. HORVATIĆ, A. KOVAČEVIĆ, N. GUILLEMIN, B. B. LJUBIĆ, A. GALAN, I. JOVIĆ, M. TORTI, I. RUBIĆ, P. D. ECKERSALL, V. MRLJAK (2020): Serum proteome profiling in canine chronic valve disease using a TMT-based quantitative proteomics approach. *J Proteomics*. 2020 Jul 15;223:103825. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103825.

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. *Journal of proteomics*, 247, 104332. doi.org: 10.1016/j.jprot.2021.104332

KULSOOM, Z., D. TULIKA, M. S. PRATAP, P. UMA (2020): Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*, Volume: 10 doi=10.3389/fonc.2020.00159

KUZI, S., G. SEGEV, E. HARUVI, I. AROCH (2010): Plasma antithrombin activity as a diagnostic and prognostic indicator in dogs: a retrospective study of 149 dogs. *J Vet Intern Med*. 2010 May-Jun;24(3):587-96. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0497.x.

Lamb, C.R., J. Whitlock, A.T. Foster-Yeow (2019): Prevalence of pulmonary nodules in dogs with malignant neoplasia as determined by CT. *Vet Radiol Ultrasound*.;60:300–305.

LANGER, C.J., H. CHOY, J. A. GLASPY, A. COLOWICK (2002): Standards of care for anemia management in oncology: focus on lung carcinoma. *Cancer*. 2002 Aug 1;95(3):613-23. doi: 10.1002/cncr.10712. PMID: 12209755.

LAURILA, H. P., M. M. RAJAMÄKI (2021): Update on Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis in West Highland White Terriers. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Mar;50(2):431-446. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.11.004.

LEBASTARD, M., S. BEURLET-LAFARGE, E. GOMES, K. LE BOEDEC (2022): Association between quantitative bacterial culture of bronchoalveolar lavage fluid and antibiotic requirement in dogs with lower respiratory tract signs. *J. Vet. Intern. Med*. 36, 1444-1453. doi: 10.1111/jvim.16456

LEE, E. S., B. K. HIBSMAN, H. A. LIEBMAN (2001): Acquired bleeding disorder in a patient with malignant lymphoma. *Cancer*, 91: 636-641. doi.org/10.1002/1097-0142(20010215)91:4<636::AID-CNCR1046>3.0.CO;2-V

LI, C. X., L. ZHANG, Y. R. YAN, Y. J. DING, Y. N. LIN, J. P. ZHOU, N. LI, H. P. LI, S. Q. LI, X.W. SUN, Q.Y. LI (2021): A narrative review of exploring potential salivary biomarkers in respiratory diseases: still on its way. *J Thorac Dis*. Jul;13(7):4541-4553. doi: 10.21037/jtd-21-202.

LI, M., X. YANG, G. ZHANG, L. WANG, Z. ZHU, W. ZHANG, H. HUANG, R. GAO (2022): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes the progression of lung cancer by inhibiting the p53-dependent signaling pathway. *Thorac Cancer*. May;13(9):1311-1321. doi: 10.1111/1759-7714.14387.

LIDINGTON, E. A., D. O. HASKARD, J. C. MASON (2000): Induction of decay-accelerating factor by thrombin through a protease-activated receptor 1 and protein kinase C-dependent pathway protects vascular endothelial cells from complement-mediated injury. *Blood*. Oct 15;96(8):2784-92. PMID: 11023512.

LILJA-MAULA, L. I, M. J. PALVIAINEN, H. P. HEIKKILÄ, M. R. RAEKALLIO, M.M. RAJAMÄKI (2013): Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid samples obtained from West Highland White Terriers with idiopathic pulmonary fibrosis, dogs with chronic bronchitis, and healthy dogs. *Am J Vet Res*. Jan;74(1):148-54. doi: 10.2460/ajvr.74.1.148.

LI, Q. (2023): The multiple roles of C-type lectin receptors in cancer. *Front Oncol*. Nov 28;13:1301473. doi: 10.3389/fonc.2023.1301473. PMID: 38090489; PMCID: PMC10715585.

LIM, Y. Y., C. MANSFIELD, M. STEVENSON, M. THOMPSON, D. DAVIES, J. WHITNEY, F. JAMES, A. TEBB, D. FRY, S. BUOB, L. HAMBROOK, G. BOO, J. R. S. DANDRIEUX (2022): A retrospective multi-center study of treatment, outcome, and prognostic factors in 34 dogs with disseminated aspergillosis in Australia. *J Vet Intern Med*. Mar;36(2):580-590. doi: 10.1111/jvim.16366.

LIND-BRANDBERG, L., C. WELINDER-OLSSON, T. LAGERGÅRD, J. TARANGER, B. TROLLFORS, G. ZACKRISSON (1998): Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections. *J Clin Microbiol.* Mar;36(3):679-83. doi: 10.1128/JCM.36.3.679-683.1998.

LORD. M. S., J. MELROSE, A. J. DAY, J. M. WHITELOCK (2020): The Inter- $\alpha$ -Trypsin Inhibitor Family: Versatile Molecules in Biology and Pathology. *J Histochem Cytochem.* 2020 Dec;68(12):907-927. doi: 10.1369/0022155420940067.

LUCENA S., A.V. COELHO, S. I. ANJO, B. MANADAS, V. MRLJAK, F. CAPELA E SILVA, E. LAMY, A. TVARIJONAVICIUTE (2019): Comparative proteomic analysis of saliva from dogs with and without obesity-related metabolic dysfunction, *Journal of Proteomics*, Volume 201, pp. 65-72. doi.org/10.1016/j.jprot.2019.04.010.

MA, Y., R. LI, J. WANG, W. JIANG, X. YUAN, J. CUI, C. WANG (2021): ITIH4, as an inflammation biomarker, mainly increases in bacterial bloodstream infection. *Cytokine.* 2021 Feb;138:155377. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155377.

MA, L. Y., B. JIA, H. GENG, J. LIANG, L. HUO (2024): Poly(rC)-binding protein 1 alleviates neurotoxicity in 6-OHDA-induced SH-SY5Y cells and modulates glial cells in neuroinflammation. *Brain Res.* Jun 1;1832:148863. doi: 10.1016/j.brainres.2024.148863.

MABONI, G., M. SEGUEL, A. LORTON, R. BERGHAUS, S. SANCHEZ (2019): Canine infectious respiratory disease: New insights into the etiology and epidemiology of associated pathogens. *Plos one.* 2019;14(4):e0215817. doi: 10.1371/journal.pone.0215817.

MACREADY, D.M, L.R. JOHNSON, R.E. POLLARD (2007): Fluoroscopic and radiographic evaluation of tracheal collapse in dogs: 62 cases (2001-2006). *J Am Vet Med Assoc.*;230(12):1870–1876. doi: 10.2460/javma.230.12.1870.

MAHASHUR, A. (2015): Chronic dry cough: Diagnostic and management approaches. *Lung India.* 2015 Jan-Feb;32(1):44-9. doi: 10.4103/0970-2113.148450.

MAHER, R. E., M. MÄÄTTÄ, R. J. BEYNON, H. P. LAURILA, P. S. MCNAMARA, M. M. RAJAMÄKI (2022): Quantitative proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in West Highland white terriers with canine idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Vet Res.* 18. doi: 10.1186/s12917-022-03202-x

MALIN, K., O. WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ (2022): C-Reactive Protein as a Diagnostic Marker in Dogs: A Review. *Animals (Basel)*. 2022 Oct 21;12(20):2888. doi: 10.3390/ani12202888.

MATSUU, A., M. YABUKI, E. AOKI, M. IWAHANA (2020): Molecular detection of canine respiratory pathogens between 2017 and 2018 in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2020 Jun;82(6):690-694. doi: 10.1292/jvms.20-0017.

MASSEAU, I., C. R. REINERO (2019): Thoracic computed tomographic interpretation for clinicians to aid in the diagnosis of dogs and cats with respiratory disease. *The Veterinary Journal*, Volume 253. doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105388.

MAYHEW, P. D., G. B. HUNT, M. A. STEFFEY, W. T. CULP, K. N. MAYHEW, M. FULLER, L. R. JOHNSON, P. J. PASCOE (2013): Evaluation of short-term outcome after lung lobectomy for resection of primary lung tumors via video-assisted thoracoscopic surgery or open thoracotomy in medium- to large-breed dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2013 Sep 1;243(5):681-8. doi: 10.2460/javma.243.5.681.

MARVEL, S., E. MONNET (2013): Ex vivo evaluation of canine lung biopsy techniques. *Vet Surg*. 2013 May;42(4):473-7. doi: 10.1111/j.1532-950X.2013.01108.x.

MCDONNELL, T., C. WINCUP, I. BUCHHOLZ, C. PERICLEOUS, I. GILES, V. RIPOLL, H. COHEN, M. DELCEA, A. RAHMAN (2020): The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Rev Jan*; 39:100610. doi: 10.1016/j.blre.2019.100610.

MERVEILLE, A. C., G. BATAILLE, F. BILLEN, S. DELEUZE, M. FREDHOLM, A. THOMAS, C. CLERCX, A. S. LEQUARRÉ (2014): Clinical findings and prevalence of the mutation associated with primary ciliary dyskinesia in Old English Sheepdogs. *J Vet Intern Med*. May-Jun;28(3):771-8. doi: 10.1111/jvim.12336.

MESQUITA, L., R. LAM, C. R. LAMB, J. F. MCCONNELL (2015): Computed tomographic findings in 15 dogs with eosinophilic bronchopneumopathy. *Vet Radiol Ultrasound*. Jan-Feb;56(1):33-9. doi: 10.1111/vru.12187.

MICHAEL, H.T., T.WATERHOUSE, M. ESTRADA, M.A. SEGUIN (2021): Frequency of respiratory pathogens and SARS-CoV-2 in canine and feline samples submitted for respiratory testing in early 2020. *J Small Anim Pract*, 62: 336-342.doi.org/10.1111/jsap.13300

MILLER, A. G., P. S. MORLEY, S.RAO, A. C. AVERY, S. E. LANA, C. S. OLVER (2009), Anemia Is Associated with Decreased Survival Time in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23: 116-122. doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0210.x

MOCHIZUKI, M., A. YACHI, T. OHSHIMA, A. OHUCHI, T. ISHIDA (2008): Etiologic Study of Upper Respiratory Infections of Household Dogs, *Journal of Veterinary Medical Science*, 2008, Volume 70, Issue 6, Pages 563-569.

MORDELET-DAMBRINE, M., A. A. ARNOUX, G.G. STANISLAS-LEGUERN, D. SANDRON, J. CHRETIEN, G. HUCHON (1984): Processing of lung lavage fluid causes variability in bronchoalveolar cell count. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 305-306.

MORE, G., N. CAVE, P. BIGGS, E. ACKE, M. DUNOWSKA, (2021): A molecular survey of canine respiratory viruses in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 69(4), 224–233.doi.org/10.1080/00480169.2021.1915211

MORITA, T., K. NAKAMURA, T. OSUGA, K. HANAZONO, K. MORISHITA, M.TAKIGUCHI (2019): Change in right ventricular function in an American cocker spaniel with acute pulmonary thromboembolism. *J Vet Med Sci*. Sep 3;81(9):1259-1265. doi: 10.1292/jvms.19-0082.

MRLJAK, V., J. KULEŠ, Ž. MIHALJEVIĆ, M. TORTI, J. GOTIĆ, M. CRNOGAJ, T. ŽIVIČNJAK, I. MAYER, I. ŠMIT, M. BHIDE, R. BARIĆ RAFAJ (2017): Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. Jun;17(6):398-408. doi: 10.1089/vbz.2016.1990.

NABOULSI, W., H. PLANATSCHER, F. F. SCHMIDT, A. STEINHILBER, T. O. JOOS, A. O. ADEDEJI, J. E. MCDUFFIE, O. POETZ (2024): Immunoaffinity proteomics for kidney injury biomarkers in male beagle dogs. *Excli J.* Jan 15;23:180-197. doi: 10.17179/excli2023-6621.

NAFE, L. A., A. E. DECLUE, C. R. REINERO (2011): Storage alters feline bronchoalveolar lavage fluid cytological analysis. *J. Feline Med. Surg.* 13, 94-100. doi: 10.1016/j.jfms.2010.09.017

NAKAMURA, M., M. TAKAHASHI, K. OHNO, A. KOSHINO, K. NAKASHIMA, A. SETOGUCHI, Y. FUJINO, H. TSUJIMOTO (2008): C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci.* Feb;70(2):127-31. doi: 10.1292/jvms.70.127. PMID: 18319571.

NAKAZAWA, Y., T. OHSHIMA, M. FUJITA, A. FUJIWARA-IGARASHI (2023). Retrospective study of 1050 dogs with respiratory symptoms in Japan (2005–2020). *Veterinary Medicine and Science*, 9, 638–644. doi.org/10.1002/vms3.983

NADEEM, A., N. O. AL-HARBI, S. F. AHMAD, K. E. IBRAHIM, N. SIDDIQUI, M. M. AL-HARBI (2018): Glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition attenuates acute lung injury through reduction in NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Clin Exp Immunol.* Mar;191(3):279-287. doi: 10.1111/cei.13097.

NAND, S., S. G. FISHER, R. SALGIA, R. I. FISHER (1987): Hemostatic abnormalities in untreated cancer: incidence and correlation with thrombotic and hemorrhagic complications. *J Clin Oncol.* Dec;5(12):1998-2003. doi: 10.1200/JCO.1987.5.12.1998.

NORMAN, K. C., B. B. MOORE, K. B. ARNOLD, D. N. O'DWYER (2018): Proteomics: Clinical and research applications in respiratory diseases. *Respirology.* Nov;23(11):993-1003. doi: 10.1111/resp.13383.

OHAD, D. G, I. LENCHNER, T. BDOLAH-ABRAM, G. SEGEV (2013): A loud right-apical systolic murmur is associated with the diagnosis of secondary pulmonary arterial hypertension: retrospective analysis of data from 201 consecutive client-owned dogs (2006-2007). *Vet J.* Dec;198(3):690-5. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.09.067

OKONKOWSKI, L. K., D. SZLOSEK, J. OTTNEY, M. COYNE, S. A. CAREY (2021): Asymptomatic carriage of canine infectious respiratory disease complex pathogens among healthy dogs. *J Small Anim Pract*, 62: 662-668. doi.org/10.1111/jsap.13378

OMER, M. H., H. SALAMA, A. M. ALGHAYTHI, A. A. ALHARBI, G. ALJOHANI (2022): Lupus Anticoagulant-Hypoprothrombinemia Syndrome and Pseudotumor Cerebri as an Initial Presentation of Systemic Lupus Erythematosus in a 16-Year-Old Male Patient: A Case Report and Literature Review. *Am J Case Rep*. 2022 Oct 8;23:e938051. doi: 10.12659/AJCR.938051.

PACHOLEC, C., G. R. LISCIANDRO, I. MASSEAU, L. DONNELLY, A. DECLUE, C. R. REINERO (2021): Lung ultrasound nodule sign for detection of pulmonary nodule lesions in dogs: Comparison to thoracic radiography using computed tomography as the criterion standard. *Vet J*. Sep;275:105727. doi: 10.1016/j.tvjl.2021.105727.

PARKIH, N. I., R. S. VASAN (2007): Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomark Med*. 1, 419-436. doi: 10.2217/17520363.1.3.419.

PEETERS, D. E., B. C. MCKIERNAN, R. M. WEISIGER, D. J. SCHAEFFER, C. CLERCX (2008): Quantitative bacterial cultures and cytological examination of bronchoalveolar lavage specimens in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 14, 534-541. doi: 10.1892/0891-6640(2000)0142.3.co;2

PENG, S., T. DU, W. WU, X. CHEN, Y. LAI, D. ZHU, Q. WANG, X. MA, C. LIN, Z. LI, Z. GUO, H. HUANG (2018): Decreased expression of serine protease inhibitor family G1 (SERPING1) in prostate cancer can help distinguish high-risk prostate cancer and predicts malignant progression. *Urol Oncol*. Aug;36(8):366.e1-366.e9. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.05.021.

PIRAS, I. S., C. BLEUL, A. SINIARD, A. J. WOLFE, M. D. DE BOTH, A. G. HERNANDEZ, M. J. HUENTELMAN (2020): Association of Common Genetic Variants in the CPSF7 and SDHAF2 Genes with Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the West Highland White Terrier. *Genes (Basel)*. May 30;11(6):609. doi: 10.3390/genes11060609.



PRIESTNALL, S. L., J. A. MITCHELL, C. A. WALKER, K. ERLES, J. BROWNLIE (2014): New and Emerging Pathogens in Canine Infectious Respiratory Disease. *Veterinary Pathology*. 2014;51(2):492-504. doi:10.1177/0300985813511130

PROULX, A., D. Z. HUME, K. J. DROBATZ, E. L. REINEKE (2014): In vitro bacterial isolate susceptibility to empirically selected antimicrobials in 111 dogs with bacterial pneumonia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24: 194-200. <https://doi.org/10.1111/vec.12128>

RAUSCH, J. L. (2015): Respiratory Tumors In Dogs And Cats: Update On Current Options & Outcomes. Proceedings of the ACVIM Forum, 3-6 July, Indianapolis, USA.

REAGAN, K. L, J. E. SYKES (2020): Canine Infectious Respiratory Disease. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. Mar;50(2):405-418. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.10.009.

REBAR, A. H., D. B. DENICOLA, B. A. MUGGENBURG (1980): Bronchopulmonary lavage cytology in the dog: Normal findings. *Vet. Pathol.* 17, 294-304. doi: 10.1177/030098588001700303

REN, L., J. YI, W. LI, X. ZHENG, J. LIU, J. WANG, G. DU (2019): Apolipoproteins and cancer. *Cancer Med.* 2019 Nov;8(16):7032-7043. doi: 10.1002/cam4.2587.

REŠETAR MASLOV, D., V. FARKAŠ, I. RUBIĆ, J. KULEŠ, A. BELETIĆ, B. BEER LJUBIĆ, I. ŠMIT, V. MRLJAK, M. TORTI (2023): Serum Proteomic Profiles Reflect the Stages of Myxomatous Mitral Valve Disease in Dogs. *International Journal of Molecular Sciences* 24, no. 8: 7142. doi: [org/10.3390/ijms24087142](https://doi.org/10.3390/ijms24087142)

REZAEYAN, H., M. ARABFARD, H. R. RASOULI, A. SHAHRIARY, B. F. N. M. GH (2023): Evaluation of common protein biomarkers involved in the pathogenesis of respiratory diseases with proteomic methods: a systematic review. *Immun Inflamm Dis.* 2023; 11:e1090. doi:10.1002/iid3.1090

RHEINWALD, M., K. HARTMANN, M. HÄHNER, G. WOLF, R. K. STRAUBINGER, B. SCHULZ (2015): Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from 502 dogs with respiratory signs. *Vet Rec.* 2015 Apr 4;176(14):357. doi: 10.1136/vr.102694.

RIECKS, T. W., S. J. BIRCHARD, J. A. STEPHENS (2007): Surgical correction of brachycephalic syndrome in dogs: 62 cases (1991-2004). *J Am Vet Med Assoc.* 230(9):1324–1328.

RIJNBERK, A., F. S. VAN SLUIJS (2009). *Medical History and Physical Examination in Companion Animals*, 333 p. Elsevier Limited. The Netherlands.

RIZO-TÉLLEZ, S. A., M. SEKHERI, J. G. FILEP (2023): C-reactive protein: a target for therapy to reduce inflammation. *Front Immunol.* 2023 Jul 26;14:1237729. doi: 10.3389/fimmu.2023.1237729.

ROBINSON, N. J., R. S. DEAN, M. COBB, M. L. BRENNAN (2015): Investigating common clinical presentations in first opinion small animal consultations using direct observation. *Vet Rec.* 2015 May 2;176(18):463. doi: 10.1136/vr.102751.

ROELS, E., E. KRAFFT, F. FARNIR, S. HOLOPAINEN, H. P. LAURILA, M. M. RAJMÄKI, M. J. DAY, N. ANTOINE, D. PIROTTIN, C. CLERCX (2015): Assessment of CCL2 and CXCL8 chemokines in serum, bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue samples from dogs affected with canine idiopathic pulmonary fibrosis. *VET J.* 206(1), 75-82. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.06.001

ROELS, E., T. COUVREUR, F. FARNIR, C. CLERCX, J. VERSCHAKELEN, G. BOLEN (2017): Comparison Between Sedation And General Anesthesia For High Resolution Computed Tomographic Characterization Of Canine Idiopathic Pulmonary Fibrosis In West Highland White Terriers. *Vet Radiol Ultrasound.* 2017 May;58(3):284-294. doi: 10.1111/vru.12481.

ROUDEBUSH, P., J. RYAN (1989). Breath sound terminology in the veterinary literature. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194 (10): 1415–1417.

ROTH, K., J. A. HARDIE, A. H. ANDREASSEN, F. LEH, T. M. EAGAN (2008): Predictors of diagnostic yield in bronchoscopy: a retrospective cohort study comparing different

combinations of sampling techniques. *BMC Pulm Med.* 2008 Jan 26;8:2. doi: 10.1186/1471-2466-8-2.

RUCH-GALLIE, R., S. MOROFF, M.R. LAPPIN (2016): Adenovirus 2, Bordetella bronchiseptica, and Parainfluenza Molecular Diagnostic Assay Results in Puppies After vaccination with Modified Live Vaccines. *J Vet Intern Med*, 30: 164-166. <https://doi.org/10.1111/jvim.13821>

SABATTINI, S., F. R. MANCINI, L. MARCONATO, B. BACCI, F. ROSSI, M. VIGNOLI, G. BETTINI (2012): EGFR overexpression in canine primary lung cancer: pathogenetic implications and impact on survival. *Vet Comp Oncol.* 2014 Sep;12(3):237-48. doi: 10.1111/vco.12002.

SANDERS, K. J., A. E. KNEPPERS, C. VAN DE BOOL, R. C. LANGEN, A. M. SCHOLS (2015): Cachexia in chronic obstructive pulmonary disease: new insights and therapeutic perspective. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016 Mar;7(1):5-22. doi: 10.1002/jcsm.12062.

SANGUANSEMSRI, P., H. F. JENKINSON, J. THANASAK, K. CHAIRATVIT, S. ROYTRAKUL, S. KITTISENACHAI, D. PUENGSURIN, R. SURARIT (2018): Comparative proteomic study of dog and human saliva. *PLoS One.* 2018 Dec 4;13(12):e0208317. doi: 10.1371/journal.pone.0208317.

SCHROETER, C. B., C. NELKE, F. STASCHEIT, N. HUNTEMANN, C. PREUSSE, V. DOBELMANN, L. THEISSEN, M. PAWLITZKI, S. RÄUBER, A. WILLISON, A. VOGELSANG, A. D. MARINA, H. P. HARTUNG, N. MELZER, F. F. KONEN, T. SKRIPULETZ, A. HENTSCHEL, S. KÖNIG, M. SCHWEIZER, K. STÜHLER, G. POSCHMANN, A. ROOS, W. STENZEL, A. MEISEL, S. G. MEUTH, T. (2024): Ruck Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 is a potential biomarker for disease activity in myasthenia gravis. *Acta Neuropathol.* Jun 18;147(1):102. doi: 10.1007/s00401-024-02754-6.

SCHULTZ, R. M., J. PETERS, A. ZWINGENBERGER (2009): Radiography, computed tomography and virtual bronchoscopy in four dogs and two cats with lung lobe torsion. *J Small Anim Pract.* 2009 Jul;50(7):360-3. doi: 10.1111/j.1748-5827.2009.00728.x.

SEKIKAWA, S., T. ONDA, N. MIURA, T. NOMURA, N. TAKANO, T. SHIBAHARA, K. HONDA (2018): "Underexpression of  $\alpha$ -1-microglobulin/bikunin precursor predicts a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma". *International Journal of Oncology* 53, no. 6: 2605-2614. doi.org/10.3892/ijo.2018.4581

SELTING, K. A. (2016): Current Options for Diagnosis and Treatment of Primary and Metastatic Lung Cancer in Dogs and Cats. *Proceedings from the ACVIM Forum*, 8-11 June, Denver, USA.

SHI, Y., N. ZHU, Y. QIU, J. TAN, F. WANG, L. QIN, A. DAI (2023): Resistin-like molecules: a marker, mediator and therapeutic target for multiple diseases. *Cell Commun Signal*. Jan 23;21(1):18. doi: 10.1186/s12964-022-01032-w.

SHIGEMURA, M., Y. NASUHARA, S. KONNO, T. HATTORI, C. SHIMIZU, K. MATSUNO, M. NISHIMURA. (2010): Levels of transferrin in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis. *Lung*. Apr;188(2):151-7. doi: 10.1007/s00408-009-9218-7.

JUNKO SHIMOMURA-KUROKI, TOMOKO NASHIDA, YUKIO MIYAGAWA, TAKAO MORITA, SACHIKO HAYASHI-SAKAI (2020): Analysis of salivary factors related to the oral health status in children, *Journal of Oral Science*, Volume 62, Issue 2, Pages 226-230, Released on J-STAGE March 28, Online ISSN 1880-4926, Print ISSN 1343-4934, doi.org/10.2334/josnusd.18-0293

SHOENFELD, Y., A. TAL, S. BERLINER, J. PINKHAS (1986): Leukocytosis in non hematological malignancies--a possible tumor-associated marker. *J Cancer Res Clin Oncol*.;111(1):54-8. doi: 10.1007/BF00402777.

SOUZA, V. M., I. R. SALES, D. M. PEIXOTO, V. M. COSTA, J. A. RIZZO, A. R. SILVA, R. F. CAMILO, F. F. PIEROTTI, D. SOLÉ, E. S. SARINHO (2012): Giardia lamblia and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. *J Pediatr (Rio J)*. May;88(3):233-8. doi: 10.2223/JPED.2184.

STITES, S. W., M. E. NELSON, L. J. WESSELIUS (1995): Transferrin concentrations in serum and lower respiratory tract fluid of mechanically ventilated patients with COPD or ARDS. *Chest*. 1995 Jun;107(6):1681-5. doi: 10.1378/chest.107.6.1681.

SUOMALAINEN, L. R., H. REUNANEN, R. IJÄS, E. T. VALTONEN, M. TIIROLA (2006): Freezing induces biased results in the molecular detection of *Flavobacterium columnare*. *Appl Environ Microbiol.* Feb;72(2):1702-4. doi: 10.1128/AEM.72.2.1702-1704.2006.

SZABO, D., J. SUTHERLAND-SMITH, B. BARTON, E. A. ROZANSKI, O. TAEYMANS (2015): Accuracy of a computed tomography bronchial wall thickness to pulmonary artery diameter ratio for assessing bronchial wall thickening in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* May-Jun;56(3):264-71. doi: 10.1111/vru.12216.

ŠIMONJI, K. (2023): Proteomsko profiliranje seruma i jetre jelena običnog (*cervus elaphus*) primjenom spektrometrije masa. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

ŠMIT, I, D. POTOČNJAK, V. MATIJATKO, M. TORTI, I. JOVIĆ, D. GRDEN, M. CRNOGAJ, R. BECK (2023): The Influence of *Giardia duodenalis* on the Occurrence of Clinical Signs in Dogs. *Vet Sci.* Dec 7;10(12):694. doi: 10.3390/vetsci10120694.

TAKAOKA, Y., S. GOTO, T. NAKANO, H. P. TSENG, S. M. YANG, S. KAWAMOTO, K. ONO, C. L. CHEN (2014): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced, sepsis-related severe acute lung injury in mice. *Sci Rep.* 2014 Jun 6;4:5204. doi: 10.1038/srep05204.

TAMBOR, V., A. FUČÍKOVÁ, J. LENCO, M. KACEROVSKÝ, V. ŘEHÁČEK, J. STULÍK, R. PUDIL (2009): Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiol Res.* 2010;59(4):471-497. doi: 10.33549/physiolres.931758.

TANG, H., J. LIU, J. HUANG (2022): GMFG (glia maturation factor gamma) inhibits lung cancer growth by activating p53 signaling pathway. *Bioengineered.* 2022 Apr;13(4):9284-9293. doi: 10.1080/21655979.2022.2049958.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM (JANUARY 2008). "The Gene Ontology project in 2008". *Nucleic Acids Research.* 36 (Database issue): D440–4. doi:10.1093/nar/gkm883.

THOMAS, P.D., D. EBERT, A. MURUGANUJAN, T. MUSHAYAHAMA, L. P. ALBOU, H. MI (2022): PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*. 2022; 31: 8–22. doi.org/10.1002/pro.4218

TIAN, T., Y. LENG, B. TANG, X. DONG, Q. REN, J. LIANG, T. LIU, Y. LIU, W. FENG, S. LIU, Y. ZHOU, H. ZHAO, L. SHEN (2024): The oncogenic role and regulatory mechanism of PGK1 in human non-small cell lung cancer. *Biol Direct*. 2024 Jan 2;19(1):1. doi: 10.1186/s13062-023-00448-9.

THRALL, D.E. (2013): Principles of radiographic interpretation of the thorax. In: Thrall D.E, ed. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska. pp. 474–488.

TURK, R., N. ROŠIĆ, J. KULEŠ, A. HORVATIĆ, A. GELEMANOVIC, A. GALEN, B. BEER LJUBIĆ, M. BENIĆ, V. STEVANOVIĆ, V. MRLJAK, C. C. CHADWICK, P. D. ECKERSALL (2021): Milk and serum proteomes in subclinical and clinical mastitis in Simmental cows. *Journal of Proteomics*, Vol. 244. doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104277

UHLÉN, M., L. FAGERBERG, B. M. HALLSTRÖM, C. LINDSKOG, P. OKSVOLD, A. MARDINOGLU, Å. SIVERTSSON, C. KAMPF, E. SJÖSTEDT, A. ASPLUND, I. OLSSON, K. EDLUND, E. LUNDBERG, S. NAVANI, C. A. SZIGYARTO, J. ODEBERG, D. DJUREINOVIC, J. O. TAKANEN, S. HOBER, T. ALM, P. H. EDQVIST, H. BERLING, H. TEGEL, J. MULDER, J. ROCKBERG, P. NILSSON, J. M. SCHWENK, M. HAMSTEN, K. VON FEILITZEN, M. FORSBERG, L. PERSSON, F. JOHANSSON, M. ZWAHLEN, G. VON HEIJNE, J. NIELSEN, F. PONTÉN (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. Jan 23;347(6220):1260419. doi: 10.1126/science.1260419. PMID: 25613900.

VALDÉS, A., B. S. HOLST, S. LINDERSSON, M. RAMSTRÖM (2019): Development of MS-based methods for identification and quantification of proteins altered during early pregnancy in dogs. *J Proteomics*. Feb 10;192:223-232. doi: 10.1016/j.jprot.2018.09.004.

VALENCIANO, A. C., R. L. COWELL (2014): *Cowell And Tyler's Diagnostic Cytology And Hematology Of The Dog And Cat*, Fourth Edition. Mosby Inc., St. Louis, USA.

VAN DE WETERING, C., R. ABOUSHOUSA, A. M. MANUEL, S. B. CHIA, C. ERICKSON, M. B. MACPHERSON, J. L. VAN DER VELDEN, V. ANATHY, A. E. DIXON, C. G. IRVIN, M. E. POYNTER, A. VAN DER VLIET, E. F. M. WOUTERS, N. L. REYNAERT, Y. M. W. JANSSEN-HEININGER (2020): Pyruvate Kinase M2 Promotes Expression of Proinflammatory Mediators in House Dust Mite-Induced Allergic Airways Disease. *J Immunol.* Feb 15;204(4):763-774. doi: 10.4049/jimmunol.1901086.

VIITANEN, S.J., H.P. LAURILA, L.I. LJILJA-MAULA, M.A. MELAMIES, M.M. RAJAMÄKI (2014): Serum C-reactive protein as a diagnostic biomarker in dogs with bacterial respiratory diseases. *J vet Intern Med.*, 28(1), 84-91 doi: 10.1111/jvim.12262

VIITANEN, S. J., A. LAPPALAINEN, M.M. RAJAMÄKI (2015): Co-infections with respiratory viruses in dogs with bacterial pneumonia. *J Vet Intern Med.* Mar-Apr;29(2):544-51. doi: 10.1111/jvim.12553.

VOELKL, J. T. PAKLADOK, Y. LIN, R. VIERECK, A. LEBEDEVA, D. KUKUK, B. J. PICHLER, I. ALESUTAN, F. LANG (2014): Up-Regulation of Hepatic Alpha-2-HS-Glycoprotein Transcription by Testosterone *via* Androgen Receptor Activation. *Cellular Physiology and Biochemistry* 1 July 2014; 33 (6): 1911–1920. <https://doi.org/10.1159/000362968>

WEN, Q., E. I. TANG, Y. GAO, T. T. JESUS, D. S. CHU, W. M. LEE, C. K. C. WONG, Y.-X. LIU, X. XIAO, B. SILVESTRINI, C. Y. CHENG (2018): Signaling pathways regulating blood–tissue barriers — Lesson from the testis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1860, Issue 1, Pages 141-153, ISSN 0005-2736, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.020>.

WEI, H., Y. ZHANG, Y. JIA, C. XUNAN, N. TENGDA, C. ANIRUDDHA, H. PENGXING, H. GUIQIN (2024): Heat shock protein 90: biological functions, diseases, and therapeutic targets. *MedComm.* 2024; 5:e470.

WEISSE, C., A. BERENT, N. VIOLETTE, R. MCDUGALL, K. LAMB (2019): Short-, intermediate-, and long-term results for endoluminal stent placement in dogs with tracheal collapse. *J Am Vet Med Assoc.* 2019 Feb 1;254(3):380-392. doi: 10.2460/javma.254.3.380.

WEN, N., N, ZHAO, H, XU, Y. ZHAO, J. MA (2022): Serum inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 in patients with inflammatory bowel disease: correlation with disease risk, inflammation, activity, and its variation after treatment. *Ir J Med Sci.* Oct;191(5):2105-2111. doi: 10.1007/s11845-021-02837-3.

WITHERS, S. S., E. G. JOHNSON, W.T. CULP, C.O. RODRIGUEZ JR, K. A. SKORUPSKI, R. B. REBHUN (2015): Paraneoplastic hypertrophic osteopathy in 30 dogs. *Vet Comp Oncol.* Sep;13(3):157-65. doi: 10.1111/vco.12026.

WOOD, E. F., R. T. O'BRIEN, K. M. YOUNG (1998): Ultrasound-guided fine needle aspiration of focal parenchymal lesions of the lung in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 1998;12(5):338–342.

WÖHRER, D., J. SPERGSE, G. BAGRINOVSKI, K. MÖSTL, H. WEISSENBÖCK (2016): Age-related presence of selected viral and bacterial pathogens in paraffin-embedded lung samples of dogs with pneumonia. *Acta Vet Hung.* Mar;64(1):103-15. doi: 10.1556/004.2016.011.

XU, F.F., Z. B. ZHANG, Y. Y. WANG, T. H. WANG (2018): Brain-Derived Glia Maturation Factor  $\beta$  Participates in Lung Injury Induced by Acute Cerebral Ischemia by Increasing ROS in Endothelial Cells. *Neurosci Bull.* 2018 Dec;34(6):1077-1090. doi: 10.1007/s12264-018-0283-x.

YAMAYA, Y., K. SUZUKI, T. WATARI, R. ASANO (2014): Bronchoalveolar Lavage Fluid and Serum Canine Surfactant Protein A Concentrations in Dogs with Chronic Cough by Bronchial and Interstitial Lung Diseases. *J Vet Med Sci.* 76(4) 593-596. doi: 10.1292/jvms.13-0428

YAO, X., E. M. GORDON, D. M. FIGUEROA, A. V. BAROCHIA, S. J. LEVINE (2016): Emerging Roles of Apolipoprotein E and Apolipoprotein A-I in the Pathogenesis and Treatment of Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016 Aug;55(2):159-69. doi: 10.1165/rcmb.2016-0060TR.



YUKI, M., E. NAITOH (2019): Complete Remission of Associative Immune-Mediated Hemolytic Anemia in a Dog Following Surgical Resection of Intestinal Leiomyosarcoma. *Vet Sci.* Jun13;6(2):55. doi: 10.3390/vetsci6020055.

ZHANG, X., F. ZHANG, W. QIAO, X. ZHANG, Z. ZHAO, M. LI (2018): Low Hematocrit Is a Strong Predictor of Poor Prognosis in Lung Cancer Patients. *Biomed Res Int.* Oct 17;2018:6804938. doi: 10.1155/2018/6804938.

ZHANG, J., C. ZHANG, X. LIU, N. SUN, C. ZHANG, R. LI, Z. ZHANG (2020): Pyruvate kinase M2 is a marker of poor prognosis in lung adenocarcinoma but not lung squamous cell carcinoma. *Transl. Cancer Res.* May;9(5):3293-3302. doi: 10.21037/tcr.2020.04.23.

ZHENG, J.Z., Y. LI, T. LIN, A. ESTRADA, X. LU, C. FENG (2017): Sample Size Calculations for Comparing Groups with Continuous Outcomes. *Shanghai Archives of Psychiatry.* 29(4):250–256 doi: 10.11919/j.issn.1002-0829.217101

ZHENG. Y., Z. ZHOU, R. WEI, C. XIAO, H. ZHANG, T. FAN, B. ZHENG, C. LI, J. HE (2022): The RNA-binding protein PCBP1 represses lung adenocarcinoma progression by stabilizing DKK1 mRNA and subsequently downregulating  $\beta$ -catenin. *J Transl Med.* Jul 30;20(1):343. doi: 10.1186/s12967-022-03552-y.

ZHU A., T. ZEMBOWER, Q. CHAO (2021): Molecular detection, not extended culture incubation, contributes to diagnosis of fungal infection. *BMC Infect. Dis.* 21(1):1159.

ZIERENBERG-RIPOLL, A., R.E. POLLARD, S.L. STEWART, S.D. ALLSTADT, L.E. BARRETT, J.M. GILLEM, K.A. SKORUPSKI (2018): Association between environmental factors including second-hand smoke and primary lung cancer in dogs. *J Small Anim Pract.* 59:343-349. doi.org/10.1111/jsap.12778

ZIVERI, J., F. TROS, I. C. GUERRERA, C. CHHUON, M. AUDRY, M. DUPUIS, M. BAREL, S. KORNIOTIS, S. FILLATREAU, L. GALES, E. CAHOREAU, A. CHARBIT (2017): The metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase acts as a transcriptional regulator in pathogenic *Francisella*. *Nat Commun* 8, 85. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00889-7>

## 9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

### Osobni podaci:

- Ime i prezime: Filip Kajin
- Datum i mjesto rođenja: 28.2.1991., Rijeka, Republika Hrvatska
- Državljanstvo / narodnost: Hrvatsko / Hrvat
- Zvanje: doktor veterinarske medicine (dr. med. vet.)

### Obrazovanje:

- 2020. – 2023. Residency training programme (European College of Veterinary Neurology), Tierärztliche Hochschule Hannover
- 2017. - Doktorski studij Veterinarske znanosti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2009. – 2016. - Integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine, usmjerenje "Kućni ljubimci, egzotične i laboratorijske životinje", Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2005. – 2009. - Gimnazija Eugena Kumičića, Opatija
- 1997. – 2005. - Osnovna škola Rikard Katalinić Jeretov, Opatija

### Radno iskustvo:

- 01.04.2020. – Asistent u Klinici za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 16.1.2019. -15.1.2020. - Stručni suradnik na Klinici za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 9.4.2018. – 15.1.2019. - Asistent na Klinici za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 21.4.2017. – 8.4.2018. - Stručni suradnik na Klinici za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 20.7.2016. – 20.4.2017. - Asistent na Klinici za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### **Dodatno usavršavanje tijekom studiranja:**

- 2013. – 2016. - Volonter na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu
- 2014. – Suradnik na radionici "MALA PRAKSA – UVOD U CITOLOGIJU S PRAKTIKUMOM" na Veterinarskim danima u Opatiji
- 2015. – Suradnik na dvodnevnoj citološkoj radionici "CITOLOGIJA, ODGOVOR NA PITANJE: UPALA ILI NEOPLAZMA!?" u Osijeku

### **Stručno usavršavanje i konferencije:**

- 2024. – EVECC 21st Congress, Goteburg, Švedska
- 2023. - Veterinarski dani. Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, Hrvatska
- 2022. - XIth Basic Neuropathology & Neuroanatomy Course for ECVN and ACVIM residents and trainees in Veterinary Neurosciences of the UAB 2022” , Barcelona, Španjolska
- 2022. - ECVN Symposium, Palma de Majorca, Španjolska
- 2021. - ACVIM Brain Camp Online Part II
- 2020. - ACVIM Brain Camp Online Part I
- 2019. – 8th International Congress “Veterinary Science and Profession”, Zagreb, Hrvatska.
- 2019. – Neurology Symposium, Zagreb, Hrvatska
- 2018. Veterinarski dani 2018. Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska
- 2018. – 3rd Eastern European Regional Veterinary Conference, Zagreb, Hrvatska
- 2018. – Joint meeting 5<sup>th</sup> International Vet-Istanbul Group Congress & 8<sup>th</sup> International Scientific Meeting Days of veterinary medicine, Ohrid, Makedonija.
- 2017. – Veterinarski seminar male prakse " KARDIOLOGIJA, GASTROENTEROLOGIJA, DERMATOLOGIJA", Zagreb, Hrvatska
- 2017.- The Vet Symposium, Royal canin, Montpellier, Francuska.
- 2016. – 7th Alpe-Adria Diagnostic Cytology Symposium, Basic and Advanced course, Ljubljana, Slovenija.

- 2016. – WSAVA Continuing Education Course "CARDIOLOGY IN DOGS AND CATS", Opatija, Hrvatska.
- 2016. – 6. Hrvatski Veterinarski Kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska
- 2016. – Eastern European Veterinary Conference, Beograd, Srbija.
- 2016. – Veterinarski seminar male prakse "VIRUSNI GASTROENTERITISI PASA, NOVOSTI U VAKCINACIJI PASA, BOLESTI JETRE I DIJAGNOSTIKA, DIJETA KRITIČNOG PACIJENTA", Zagreb, Hrvatska.
- 2016. - 4. Hrvatski stručno-edukativni susret „NAŠA PRAKSA“, Daruvarske toplice.
- 2015. – Veterinarski seminar male prakse "OFTALMOLOGIJA, GASTROENTEROLOGIJA I VAKCINACIJA MAČAKA", Zagreb, Hrvatska.
- 2015. - 6th International Congress "VETERINARY SCIENCE AND PROFESSION" Zagreb, Hrvatska.
- 2015. - Volonter/suradnik u organizaciji Znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem „VETERINARSKI DANI“ u Opatiji.
- 2014. - Simpozij "EMERGENTNI I RE-EMERGENTNI FLAVIVIRUSI – ZAJEDNIČKI IZAZOV I ODGOVORNOST HUMANE I VETERINARSKJE MEDICINE" u Zagrebu.
- 2014. - Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem „VETERINARSKI DANI“ u Opatiji.

### **Usmena izlaganja:**

- "Postmortal diagnostics of feline verminous pneumonia", 6th International Congress "Veterinary Science and Profession", Zagreb, 2015.
- "Anemije u tvorova – prikaz slučajeva", 6. Hrvatski Veterinarski Kongres, Opatija, Hrvatska, 2016.
- Kad nam "slijepi BAL" otvori oči, Veterinarski dani 2018.
- "Bacterial pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in urinary tract infections in dogs" - 8th International Congress "Veterinary Science and Profession"

- Neurološki pregled: koje su nam informacije najbitnije u neurološkoj lokalizaciji? - Veterinarski dani 2023. Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, Hrvatska
- Epilepsija u praksi – što sve možemo bez napredne dijagnostike - Veterinarski dani 2023. Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, Hrvatska
- Kroničan i neuropatski bol – gdje smo trenutno? - Veterinarski dani 2023. Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, Hrvatska

## Popis objavljenih radova

### 1. Znanstveni radovi objavljeni u znanstvenim časopisima s međunarodnom recenzijom

1. **KAJIN, F.**, N. MEYERHOFF, S. MELLER, R. CARLSON, A. TIPOLD, R. GUTIERREZ-QUINTANA, A. KACZMARSKA, D. SANCHEZ-MASIAN, E. IVES, J. BROCAL, T. VON KLOPMANN, A. V. HOLGER (2024): Canine Idiopathic Generalized Tremor Syndrome, immune-mediated? *Front. Vet. Sci.*, 11. doi: 10.3389/fvets.2024.1453698

2. **KAJIN, F.**, I. ŠMIT, IVA, V. STEVANOVIĆ, D. REŠETAR MASLOV, I. RUBIĆ, V. MRLJAK, J. KULEŠ (2025): Current application of proteomics in the veterinary field – a short summary and literature review. *Veterinarska stanica*, 56 (2), 245-256. <https://doi.org/10.46419/vs.56.2.6>

3. FLETCHER, C. D. A., E. J. IVES, **F. KAJIN**, I. SEATH, N. GRAPES, B. A. LOPES, A. KNEBEL, H. A. VOLK, S. DE DECKER (2023): Thoracic to lumbar vertebral column length and length ratios in miniature dachshunds with and without thoracolumbar intervertebral disc extrusion. *Veterinary record*, e3057; 1-7. doi: 10.1002/vetr.3057.

4. **KAJIN, F.**, L. SCHUWERK, A. BEINEKE, H. A. VOLK, N. MEYERHOFF, J. NESSLER (2023): Teach an old dog new tricks: Meningoencephalitis of unknown origin (MUO) in Australian shepherd dogs. *Veterinary record case reports*, 11, e589, 8. doi: 10.1002/vrc2.589.

5. **KAJIN, F., N. MEYERHOFF, M. CHARALAMBOUS, H. A. VOLK** (2023): "Resistance Is Futile": A Pilot Study into Pseudoresistance in Canine Epilepsy. *Animals*, 13 19; 1-11. doi: 10.3390/ani13193125.
6. DUTIL, G. F., J. GUEVAR, D. SCHWEIZER, P. ; ROOSJE, **F. KAJIN**, H. A.VOLK, N. J. GRAPES, S. DE DECKER, R. GUTIERREZ-QUINTANA, J.ABOUZEID (2022): Otitis media and interna with or without polyps in cats: association between meningeal enhancement on postcontrast MRI, cerebrospinal fluid abnormalities, and clinician treatment choice and outcome. *Journal of feline medicine and surgery*, 24, e481-e489. doi: 10.1177/1098612X221125573.
7. ZAMORA, M., S. MELLER, **F. KAJIN**, J. J. SERMON, R. TOTH, M.BENJABER, DJ. DIJK, BOGACZ, G. A. WORRELL, A. VALENTIN (2021):Case Report: Embedding "Digital Chronotherapy" Into Medical Devices-A Canine Validation for Controlling Status Epilepticus Through Multi-Scale Rhythmic Brain Stimulation. *Front Neurosci*. doi: 10.3389/fnins.2021.734265. PMID: 34630021; PMCID: PMC8498587.
8. PALIĆ, M., M. BRKLJAČIĆ, I. KIŠ, M. CRNOGAJ, N. KUČER, M. TORTI, I.ŠMIT, **F. KAJIN**, V. MATIJATKO (2020): Hypoadrenocorticism in dogs – the Mad Hatter of veterinary internal medicine. *Veterinarska stanica*, 51. 281-292. doi: 10.46419/vs.51.3.5
9. BRKLJAČIĆ, M. M. CRNOGAJ, I. KIŠ, K. BOJANIĆ, **F. KAJIN**, I. ŠMIT, M.TORTI, I. HARAPIN, V. MATIJATKO (2020): Fever of unknown origin in dogs: 50 cases // *Veterinarski arhiv*, 90, 255-269. doi: 10.24099/vet.arhiv.0831
10. ŠMIT, I., D. POTOČNJAK, V. MATIJATKO, I. JOVIĆ, **F. KAJIN**, M.BRKLJAČIĆ, R. BECK (2017): Povezanost invazije parazita *Giardia duodenaliss* pokazateljima hematoloških i biokemijskih pretraga krvi, *Veterinarska stanica*, 48., 345-355.
11. **KAJIN, F.**, A. BECK, D. HUBER, E. GAGOVIĆ, R. BECK (2016): Verminozna pneumonija mačaka, *Veterinarska stanica*, 47, 265-276.

## **2. Radovi objavljeni u zbornicima s međunarodnih znanstvenih skupova**

1. GAGOVIĆ, E., **F. KAJIN**, D. HUBER, R. BECK, A. BECK (2015): Postmortal diagnostics of feline verminous pneumonia. Book of Abstracts, The 6th International Congress "Veterinary Science and Profession", Zagreb, Hrvatska, pp. 71-71 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  
2. **KAJIN, F.**, G. J. KRSTESKA, M. TORTI, I. ŠMIT, V. MATIJATKO (2016): Anemije u tvorova. Zbornik radova 6. Hrvatskog Veterinarskog Kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, Hrvatska, pp. 507-512. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
  
3. MRAOVIĆ, J., D. HUBER, A. BECK, **F. KAJIN**, N. ŠANTA, D. JURKOVIĆ, R. BECK (2017): Preliminary evaluation of idexx combo snap® test for usage on postmortal samples. Book of Abstracts, 7th International Congress "Veterinary Science and Profession", Zagreb, Hrvatska. pp. 140-140 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  
4. BECK, A., B. PIRKIĆ, **F. KAJIN**, I. JOVIĆ, D. HUBER, J. MRAOVIĆ, D. JURKOVIĆ, R. BECK (2017): Canine ocular dirofilariasis-a case report. Book of Abstracts, 7th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 90-90 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
  
5. JOVIĆ, I., I. ŠMIT, **F. KAJIN**, J. GOTIĆ, V. MATIJATKO, I. KIŠ, M. TORTI (2017): Prevalence and clinical characteristics of congenital heart diseases in dogs examined at the clinic for internal diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb in the period from 2013-2017. Book of Abstracts, 7th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 83-83 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
  
6. **KAJIN, F.**, I. SPAJIĆ, V. MATIJATKO, I. KIŠ, M. BRKLJAČIĆ, I. ŠMIT, M. TORTI, V. BENKO (2018): Kad nam "slijepi" BAL otvori oči. Zbornik radova 8. Hrvatskog

Veterinarskog Kongresa s međunarodnim sudjelovanjem, Veterinarski dani 2018, Opatija, Hrvatska, pp. 193-204 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

7. MATIJATKO, V., I. KIŠ, M. CRNOGAJ, M. TORTI, I. ŠMIT, **F. KAJIN**, M. BRKLJAČIĆ (2018): Ludi šeširdžija veterinarske medicine - Addisonova bolest u pasa u Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem "Veterinarski dani 2018." Harapin, Ivica (ur.). Zelina: Hrvatska veterinarska komora/Veterinarski fakultet u Zagrebu, 2018. str. 183-192.

8. KIŠ, I., M. BRKLJAČIĆ, **F. KAJIN**, I. ŠMIT, M. CRNOGAJ, M. TORTI, G. JURKIĆ KRSTESKA, V. MATIJATKO, VESNA (2018): Terapija epileptičkog statusa: terapijske mogućnosti i naša iskustva. Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem "Veterinarski dani 2018." / Harapin, Ivica (ur.). Zelina: Hrvatska veterinarska komora/Veterinarski fakultet u Zagrebu, 2018. str. 173-180.

9. FILIPČIĆ, I., I. JOVIĆ, J. GOTIĆ, I. ŠMIT, **F. KAJIN**, V. MATIJATKO, I. KIŠ, M. BRKLJAČIĆ, M. TORTI (2019): Retrospective study of pulmonary hypertension in dogs examined at the Clinic for internal diseases, Faculty of veterinary medicine, Zagreb (2016-2019), Book of Abstracts, 8th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 82-82 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

10. **KAJIN, F.**, M. TORTI, I. ŠMIT, I. JOVIĆ, M. CRNOGAJ, J. GOTIĆ, M. BRKLJAČIĆ, V. MATIJATKO, I. KIŠ, J. TRŠAN, I. FILIPČIĆ, Z. ŠTRITOF (2019): Bacterial pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in urinary tract infections in dogs, Book of Abstracts, 8th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 84-84 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).

11. HUBER, D., I. MIHOKOVIĆ, **F. KAJIN**, Ž. GRABAREVIĆ, B. ARTUKOVIĆ, A. G. KURILJ, I. C. Š. ZUCKERMANN, L. M. ZAGRADIŠNIK, M. HOHŠTETER (2019): Internal hydrocephalus in bulldog breeds, Book of Abstracts, 8th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 150 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).



12. VRBANAC, Z., A. KRALJEVIĆ, T. BUREŠ, N. B. BOTTEGARO, B. ŠKRLIN, D. STANIN, I. KIŠ, **F. KAJIN** (2019): Rehabilitation of acute canine polyradiculoneuritis in two dogs – a case report, Book of Abstracts, 8th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 153 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).
13. FILIPČIĆ, I., I. SPAJIĆ, V. MATIJATKO, I. KIŠ, M. BRKLJAČIĆ, I. ŠMIT, **F. KAJIN**, M. TORTI (2018): Velika i mlohava srca - dilatacijska kardiomiopatija u pasa na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (2012-2018). Znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem "Veterinarski dani 2018." / Harapin, Ivica (ur.).Zelina: Hrvatska veterinarska komora/Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2018. str. 205-212.
14. KOSTEŠIĆ, P., M. VUČKOVIĆ, A. SMAJLOVIĆ, T. KONSTANJŠEK, **F. KAJIN**, J. BORAS, I. BATA, H. CAPAK, B. PIRKIĆ (2019): Minimally invasive fracture repair of comminuted tibial fracture in ring-tailed lemur, Book of Abstracts, 8th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 126-126 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
15. BENKO, V., D. I. ŠKODA, G. JURKIĆ, N. KUČER, A. PETAK, **F. KAJIN**, M. TORTI (2019): Review of clinical cases of body cavity effusions (2015-2019) – Overview of clinical cytology findings and associated aetiologic factors, Book of Abstracts, 8th International Congress "Veterinary Science and Profession" Zagreb, Hrvatska, pp. 141-141 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
16. JOVIĆ, I., J. GOTIĆ, M. CRNOGAJ, D. GRDEN, T. DODIG, I. FILIPČIĆ, **F. KAJIN**, T. POLJIČANIN, J. DIMNJAKOVIĆ, M. TORTI (2021): Comparison of left atrial volume in working and non- working Belgian Malinois dogs. Book of Abstracts.. 99-99.
17. **F. KAJIN**, H. VOLK, N. MEYERHOFF, J. NEBLER (2021): Old dog-new tricks - Suspected MUO in two Australian shepherd dogs: A case series. Proceedings 33rd On-line Symposium ESVN-ECVN, 17<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> September 2021, (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

18. G. F. DUTIL, J. GUEVAR, D. SCHWEIZER, P. ROOSJE, **F. KAJIN**, H. A. VOLK, N. J. GRAPES, S. DE DECKER, R. GUTIERREZ-QUINTANA, J. ABOUZEID, P. FREEMAN, K. FALLER, V. M. STEIN, A. MAIOLINI (2021): Otitis media/interna with or without polyp in cats: Does meningeal enhancement on postcontrast MRI and/or inflammatory CSF change our perspectives? Proceedings 33rd On-line Symposium ESVN-ECVN, 17<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> September 2021, (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

### 3. Stručni radovi

1. KRALJEVIĆ, A., **F. KAJIN**, I. KIŠ, N. BRKLJAČA BOTTEGARO, B. PIRKIĆ, T. BUREŠ, Z. VRBANAC (2021): Rehabilitacija pasa oboljelih od akutnog idiopatskog poliradikuloneuritisa - prikaz slučajeva. Veterinarska stanica, 52, 245-253. 245563, 9. doi: 10.46419/vs.52.2.6

2. BRKLJAČIĆ M., **F. KAJIN**, M. TORTI, I. JOVIĆ, I. KIŠ, I. ŠMIT, M. CRNOGAJ, V. MATIJATKO (2017): Systemic lupus erythematosus - diagnostic and treatment challenges, Veterinarski glasnik, **71** (2), pp. 134-140.

### 4. Pozvana predavanja

1. **F. KAJIN** (2023): Neurološki pregled: koje su nam informacije najbitnije u neurološkoj lokalizaciji? Zbornik radova / Severin, Krešimir (ur.) Osijek: Hrvatska veterinarska komora; Hrvatski veterinarski institut; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (pozvano predavanje)

2. **F. KAJIN** (2023): Epilepsija u praksi – što sve možemo bez napredne dijagnostike? Zbornik radova / Severin, Krešimir (ur.) Osijek: Hrvatska veterinarska komora; Hrvatski veterinarski institut; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023

**3. F. KAJIN** (2023): Kroničan i neuropatski bol – gdje smo trenutno? Zbornik radova / Severin, Krešimir (ur.) Osijek: Hrvatska veterinarska komora; Hrvatski veterinarski institut; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023

## 5. Studentski radovi

Usporedba citomorfoloških kriterija malignosti sa sastavom međustanične tvari kutanih mastocitoma pasa (Comparison of cytomorphologic criteria of malignancy with the composition of the extracellular matrix in canine cutaneous mast cell tumors).