

VETERINARSKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Dora Ivšić Škoda

**METABOLOMSKI PRISTUP
U OTKRIVANJU NOVIH BIOMARKERA
AKUTNE OZLJEDE BUBREGA
U PIOMETRI PASA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
UNIVERSITY OF ZAGREB

Dora Ivšić Škoda

**METABOLOMIC APPROACH IN THE
DISCOVERY OF NOVEL BIOMARKERS
OF ACUTE KIDNEY INJURY
IN CANINE PYOMETRA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

VETERINARSKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Dora Ivšić Škoda

**METABOLOMSKI PRISTUP
U OTKRIVANJU NOVIH BIOMARKERA
AKUTNE OZLJEDE BUBREGA
U PIOMETRI PASA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Vladimir Mrljak,
Professor emeritus

Zagreb, 2025.

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
UNIVERSITY OF ZAGREB

Dora Ivšić Škoda

**METABOLOMIC APPROACH IN THE
DISCOVERY OF NOVEL BIOMARKERS
OF ACUTE KIDNEY INJURY
IN CANINE PYOMETRA**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. dr. sc. Vladimir Mrljak
Professor emeritus

Zagreb, 2025.

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Dora Ivšić Škoda, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

Zagreb, 2025.

INFORMACIJA O MENTORU

Dr. sc. Vladimir Mrljak je redoviti profesor u trajnom zvanju na Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Doktorirao je 1995. godine s temom „Promet bakra, cinka i željeza u različitim razdobljima reproduktivnog ciklusa krmača". Sudjelovao je u svim oblicima nastave na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju veterinarske medicine. Za studente veterinarske medicine napisao je program iz više kolegija koji su dio integriranog preddiplomskog i diplomskog studija na Veterinarskom fakultetu. Profesor Mrljak sudjeluje u poslijediplomskoj nastavi na doktorskom studiju „Veterinarske znanosti" gdje je napisao program za tri kolegija dokorskog studija. Bio je mentor na 12 doktorskih radova, među kojima se ističu dva dvojna doktorata između Sveučilišta u Zagrebu i University of Glasgow te Sveučilišta u Zagrebu i University of Bonn.

Profesor Mrljak je organizirao grupu istraživača koja tijekom više od 17 godina istražuje protozojske bolesti. Rezultat tih aktivnosti je 10 obranjenih doktorskih radova te jedan magistarski rad, odnosno više desetaka radova objavljenih u relevantnim bazama podataka. Zadnjih deset godina profesor Mrljak je usmjerio pažnju s babezioze prema primjeni postgenomskih tehnologija, naročito proteomike i metabolomike, na otkrivanje novih biomarkera unutarnjih bolesti, te time postavio temelje razvoju kliničke proteomike i metabolomike u veterinarskoj medicini u Hrvatskoj. Bio je voditelj na 14 domaćih i stranih projekata. Među dobivenim projektima posebno se ističe ERA Chairs projekt „VetMedZg", ukupne vrijednosti preko 2,9 milijuna eura, u okviru kojeg je poticao istraživanja u molekularnoj medicini na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, osobito u primjeni proteomike i metabolomike u veterinarskoj medicini. U okviru projekta osnovan je Laboratorij za proteomiku opremljen različitim instrumentima za molekularna istraživanja među kojima se posebno ističe spektrometar masa Orbitrap tehnologije (MS/MS) spregnut s tekućinskim kromatografima (nanoLC i UHPLC). Zajedno sa svojim kolegama iz inozemstva bio je gost urednik u više znanstvenih časopisa.

Do sada je objavio više od 280 znanstvenih i stručnih radova (CROSBI 2023), među kojima valja posebno istaknuti 140 znanstvenih radova indeksiranih u citatnoj bazi podataka SCOPUS. Radovi profesora Mrljaka citirani su preko 2100 puta, h-indeks 25 (SCOPUS), odnosno preko 3400 puta, h-indeks 29 (Google Scholar). Profesor Mrljak je dobitnik više priznanja Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2023. Sveučilište u Zagrebu dodijelio je profesoru Mrljaku počasno zvanje *Professor emeritus*.

ZAHVALE

... Ponajprije zahvaljujem svim članovima Vijeća doktorskog studija što su imali mnogo razumijevanja i svaki put izašli ususret.

... Posebno zahvaljujem mentoru prof. emer. Vladimiru Mrljaku na velikoj profesionalnoj podršci, savjetima i iznimnoj širokogrudnosti. Malo je ljudi koji tako predano žive za znanost.

... Veoma mnogo dugujem svim kolegama s Klinike za porodništvo i reprodukciju. Od srca im zahvaljujem na svemu, ispunili su svaku molbu.

... Velika hvala predstojnici Klinike za unutarnje bolesti izv. prof. Ivi Šmit na razumijevanju i ukazanom povjerenju. Bez njezine velikodušnosti bilo bi gotovo nemoguće završiti.

... Zahvaljujem kolegama s Klinike za unutarnje bolesti na moralnoj podršci, a posebno kolegicama Blanki i Vlasti na ogromnoj strpljivosti.

... Također zahvaljujem kolegama s Klinike za zarazne bolesti i sa Zavoda za patologiju na nesebičnom intelektualnom i materijalnom doprinosu ovom doktorskom radu.

... Zahvaljujem dragim kolegicama Ivani, Josipi i Dini iz Proteomskog laboratorija bez čije stručnosti i savjeta ne bi bilo niti rezultata.

... Zahvaljujem od srca Nenadu, Adriani i Lovorki koji su, ne pitajući ništa, pomogli kad je zaista trebalo i pružili mi ruku spasa.

... Zahvaljujem svim dobrim ljudima koji su me nosili u mislima, Ivoni, Valeriji, Siniši,... što ih ne treba nagovarati da učine dobro djelo.

... Također zahvaljujem svima koji se vesele što će doktorat konačno ugledati svjetlo dana.

... Velika hvala mojemu Darku, obrisao je mnoge suze, i posebno djeci Borni, Franu, Tadeju, Magdi i Vidu, oni su moja motivacija.

... I na kraju, poput one žene koja je dvanaest godina bolovala od krvarenja, tako sam i ja ozdravila kad sam se dotakla Tvojih haljina. Hvala Ti na čudesnim putevima!

Doktorat posvećujem Luki i jednoj Franki.

SAŽETAK

Piometra je česta upalna bolest endometrija kuja čiji patofiziološki mehanizam nije potpuno razjašnjen. Uzrokovana je bakterijama, najčešće *Escherichia coli*, koje dovode do nakupljanja gnojnog sadržaja u lumenu maternice. Bolest se klinički očituje polidipsijom, poliurijom, letargijom, anoreksijom, povraćanjem, proljevom i, kod otvorene piometre, iscjedkom. U slučaju jake upale piometra se može razviti u sepsu koja sa sobom nosi niz komplikacija. Jedna od njih je akutna ozljeda bubrega. Konvencionalni pokazatelji bubrežne funkcije poput ureje i kreatinina nisu dovoljno osjetljivi pa dijagnoza akutne ozljede bubrega često bude prekasno postavljena. Razvoj novih analitičkih pristupa, kao što su -omika tehnologije, omogućuje pronalazak novih, osjetljivijih biomarkera bubrežne funkcije.

Istraživanje je provedeno na kontrolnoj skupini kuja (N=18) i skupini kuja oboljelih od piometre (N=19). Primijenjen je neciljani metabolomski pristup upotrebom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa na uzorcima seruma i mokraće pri čemu je skupina kuja oboljelih od piometre podijeljena na temelju omjera ukupnih proteina i kreatinina u mokraći (engl. *Urine Protein to Creatinine Ratio*, UPCR) (UPCR <0,5; UPCR >0,5). U skupini kuja s piometrom nije došlo do razvoja azotemije. Metabolomske analize seruma i mokraće kuja s piometrom su pokazale da postoje značajne razlike u odnosu na metabolomski profil seruma i mokraće zdravih kuja. Metabolomski profil kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a se značajno razlikuje u odnosu na metabolomski profil zdravih kuja. Metabolomski profil kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i koje su u riziku od razvoja akutne ozljede bubrega (UPCR >0,5) se također značajno razlikuje od metabolomskog profila zdravih kuja. U metabolomu seruma i mokraće kuja s piometrom detektirani su metaboliti i metabolički putevi koji potvrđuju razvoj upale i daju smjernice za nova istraživanja na području akutne ozljede bubrega povezane s piometrom.

Ključne riječi: metabolomika; akutna ozljeda bubrega; piometra; pas

ABSTRACT

a) Introduction

Pyometra is a common chronic inflammatory disease of the uterus that occurs in intact, sexually mature female domestic dogs (lat. *Canis lupus familiaris*), usually older than four years. It is caused by a secondary bacterial infection that leads to an accumulation of purulent contents in the uterine lumen. Hormones (progesterone) play a key role in the development of the infection, but the complex pathogenesis of pyometra is not completely understood. The disease develops after oestrus, during the luteal phase, when the uterus is suitable for pregnancy but also for the growth of opportunistic bacteria. Clinical manifestations include polydipsia, polyuria, dehydration, lethargy, depression, abdominal pain, loss of appetite, anorexia, vomiting, diarrhoea and, in the case of overt pyometra, mucopurulent discharge. A positive pyometra finding implies an enlarged uterus, which is diagnosed on ultrasound or X-ray by tubular horn (horns) filled with hypoechoic fluid. Surgical ovariohysterectomy is the most effective method of treating pyometra as it directly removes the source of infection.

The most common cause of pyometra in bitches is the gram-negative bacteria *Escherichia coli*, whose lipopolysaccharide in the outer membrane can trigger an inflammatory reaction. The inflammatory process in pyometra can develop into an uncontrolled response of the host's immune system mediated by cytokines, nitric oxide and reactive oxygen species (ROS). Untreated pyometra can develop into sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or multiple organ dysfunction syndrome (MODS) with a fatal outcome. The diagnosis of sepsis is made when SIRS manifests clinically with a proven or suspected infection.

During pyometra, acute or subacute damage to the glomeruli and/or tubules in the kidneys may occur. Due to increased glomerular permeability and/or reduced protein reabsorption, proteins appear in the urine filtrate. The International Renal Interest Society (IRIS) has developed guidelines for the clinical differentiation and classification of acute (and chronic) kidney disease in dogs and cats, which are similar to the criteria used in human medicine. The stages of acute kidney injury (AKI) are based on serum creatinine concentration, urine output and the need for renal replacement therapy. These parameters are insensitive, non-specific and have a considerable latency period, especially in sepsis-associated acute kidney injury (SA-AKI).

At the onset of sepsis, pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) are released from the damaged cells. The pathogenesis of SA-AKI includes a dysregulated immune response, systemic inflammation, accumulation of cytokines in the kidney, changes in haemodynamics, dysfunction of the microvascular endothelial cells in the kidney, and damage to the epithelial cells of the renal tubules. The epithelial cells of the proximal renal tubules are particularly susceptible to injury due to the so-called double-hit mechanism, in which PAMPs and DAMPs are recognised by TLRs on both the apical and basolateral membranes.

The metabolically most important part of the kidney is the proximal tubule of the nephron. The exchange of solutes requires a continuous supply of energy in the form of adenosine triphosphate (ATP), which is why the proximal tubule cells are densely packed with mitochondria. The most important “fuel” of the proximal tubule are fatty acids, as they provide the highest ATP yield. Oxidative phosphorylation is a highly efficient energy production pathway and the default metabolic pattern in most cell types, especially in cells whose functions require a lot of energy (cardiac muscle cells, skeletal muscle cells, epithelial cells of the renal proximal tubule).

Metabolic reprogramming is the process by which cells adapt their metabolism to the demands of changing external factors. Sepsis triggers metabolic reprogramming in almost all cell types. In the early phase of sepsis, the metabolism of renal tubular epithelial cells switches from oxidative phosphorylation, which depends on fatty acid oxidation, to aerobic glycolysis with activation of the pentose phosphate pathway, while gluconeogenesis occurs to a lesser extent. This reduces the formation of reactive oxygen species and ensures rapid ATP synthesis for early pathogen clearance and cell survival despite the limitation of some specialised renal functions. Reduced β -oxidation of free fatty acids in the epithelial cells of the renal tubules leads to a significant accumulation of fatty acids and triglycerides. Changes in energy metabolism that occur in AKI are reflected in the metabolism of amino acids, e.g. glutamine, arginine, tryptophan and branched-chain amino acids.

b) Hypothesis and research objectives

The study tested the hypothesis that during pyometra in bitches with the development of acute kidney injury, there is a change in the metabolome in the serum and urine of affected bitches.

The study also hypothesized that there are differences in the serum and urine metabolome between different stages of AKI in bitches with pyometra.

The main objective of the study was to investigate the serum and urine metabolome of bitches with pyometra and correlate it with different stages of renal function, analyze changes in the metabolite network during AKI in bitches with pyometra, and discover new biomarkers with potential diagnostic and/or prognostic significance for kidney disease.

Another aim of the study was to compare the serum and urine metabolomes of healthy bitches with the serum and urine metabolomes of bitches with pyometra, to analyze biological metabolic pathways during pyometra in bitches and to identify new diagnostic and/or prognostic biomarkers for pathophysiological mechanisms in bitches with pyometra.

c) Materials and methods

The study comprised two groups of bitches of different breeds and ages. The bitches were clinically examined and admitted to the Clinic of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, College of Zagreb. The health status of the bitches was assessed on the basis of their clinical condition and complete blood count, as well as biochemical serum parameters and analyzes. Blood and urine samples were collected from all bitches at spaying and ovariohysterectomy, respectively, and urine was obtained by cystocentesis. The urine samples from both groups of bitches and the uterine swab from bitches with pyometra were sent for general bacteriological examination to determine the bacterial cause of the pyometra. The control group consisted of eighteen clinically healthy bitches (average weight 14.0 kg, average age 1.0 years) that had undergone elective laparoscopic spaying. The group of affected bitches consisted of nineteen bitches with spontaneous pyometra (average weight 25.8 kg, average age 8.7 years) that had undergone ovariohysterectomy due to pyometra. The diagnosis of pyometra was made by a positive ultrasound finding of an enlarged uterine horn or horns with hypoechoic content. Pyometra was confirmed in all the bitches without concomitant acute or chronic, inflammatory or neoplastic disease. Most bitches had overt pyometra and had poor appetite and increased thirst in the previous days. One bitch with pyometra had stage III AKI and did not survive ovariohysterectomy.

Complete blood counts of both groups of bitches were performed using Horiba ABX automated hematology analyzer. Urine supernatants and separated sera were aliquoted and stored at -80 °C until metabolomic testing was performed. Biochemical tests in the serum and urine supernatants were performed on an Abbott Architect 4000c automated analyzer according to the recommended standard methods using commercial reagents from Abbott and Gentian. Urine osmolality was measured using the cryoscopic method on an Osmomat 030-d Gonotec osmometer.

For the serum and urine samples, an untargeted metabolomic approach using liquid chromatography coupled with mass spectrometry was used. The mass spectrometer recorded full-scan mass spectra using electrospray ionization with positive and negative polarity switching. The analyzes were performed in the mass-to-charge ratio (m/z) range of 70 to 1050 with a mass resolution of 70000.

The comparison of the complete blood count, the biochemical parameters in the serum and the physico-chemical parameters in the urine between healthy bitches and bitches with pyometra was carried out using the *MedCalc* statistical software. Depending on the normality of the data distribution, the differences between the two groups were determined using the Student's t-test or the Mann-Whitney test and the differences between the three groups were determined using ANOVA analysis or the Kruskal-Wallis test. At a parameter value of $p < 0.05$, the change was considered statistically significant.

The result of the LC-MS/MS analysis is the combined data presented as a peak intensity table obtained by bioinformatic processing. The metabolites were identified by comparing the exact molecular mass and retention time of the detected analytes with standard analytes. Metabolites were also identified using the Human Metabolome Database (HMDB) and/or the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Statistical analysis of metabolome data was performed using univariate and multivariate analysis of the online statistical tool for metabolome data processing *MetaboAnalyst 6.0*. Serum and urine data were normalized by logarithmization and autoscaling, while urine samples were additionally normalized by osmolality. In addition to the statistical significance parameter $p < 0.05$, a systematic correction with a false discovery rate (FDR) < 0.05 was also performed. Metabolic pathway analyzes were performed based on the canine metabolic pathway database (lat. *Canis lupus familiaris*).

d) Results

To gain insight into the metabolic changes associated with the occurrence of AKI in bitches with pyometra, a group of bitches with pyometra and with serum creatinine $<140 \mu\text{mol/L}$ was studied. The group of bitches with pyometra was subdivided according to urine protein to creatinine ratio (UPCR), i.e. the group with UPCR $<0,5$ and group with UPCR $>0,5$.

In bitches with pyometra and the onset of acute kidney injury, an increased total leucocyte count, MPV and absolute number of monocytes, unsegmented and segmented neutrophils as well as a decreased total erythrocyte count, haemoglobin, haematocrit and absolute number of eosinophils were found in comparison to the control group. In addition, increased concentrations of CRP, triglycerides, total cholesterol, ALP, lipase DGGR and LDH as well as increased and decreased concentrations of albumin, glucose, ALT, urea and γ -GT were found in comparison to the control group. In the urine of bitches with pyometra and the onset of acute kidney injury, the concentrations of total protein and sodium as well as UPCR were significantly increased, and osmolality was decreased in comparison to the control group of bitches.

In bitches with pyometra, the most altered biological pathway is the biosynthesis of arginine in serum and the biosynthesis of phenylalanine, tyrosine and tryptophan in urine. In bitches with pyometra, pantothenate, L-glutamine, L-proline, L-arginine and L-citrulline are very strongly reduced in the serum and L-glutamate and L-phenylalanine are very strongly increased in the urine. Pantothenate, L-glutamine and L-proline in the serum of bitches have the potential to be excellent biomarkers for pyometra, and L-glutamate and L-phenylalanine in urine.

At the beginning of the AKI stage, the metabolism of glyoxylate and dicarboxylate is most altered in the serum of bitches with pyometra. In bitches with pyometra and the onset of AKI phase I, malonate, N-acetyl-glutamine and orotate were significantly increased in serum, *cis*-aconitate and creatinine were significantly decreased and *cis*-aconitate was very significantly increased in urine. Malonate in serum and *cis*-aconitate in urine have the potential to be very good biomarkers for the occurrence of stage I AKI in bitches with pyometra.

Examination of the correlations between UPCr levels and metabolites in bitches with pyometra and the onset of stage I AKI revealed that serum pantothenate levels and the amino acids L-proline, L-glutamine and glycine decrease with increasing UPCr levels, while urinary levels of L-glutamate, D-gluconic acid and *cis*-aconitate increase.

The correlation between the average UPCr values of the groups and the relative intensity of the metabolites was moderate and negative ((-0.75) - (-0.50)) for L-proline, pantothenate, L-glutamine, glycine, L-tryptophan, L-citrulline and L-arginine, and moderate and positive (0.50 – 0.75) for L-carnitine.

e) Conclusions

The metabolome of bitches with pyometra and the onset of stage I AKI differs markedly from the metabolome of healthy bitches. Alterations include biological metabolic pathways related to the metabolism of amino acids, lipids, carbohydrates, nucleic acids and cellular energy metabolism.

Keywords: pyometra; acute kidney injury; IRIS; dog; metabolomics; UPCr; metabolic reprogramming

1. UVOD.....	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1. METABOLOMIKA.....	4
2.1.1. METABOLOMIKA I METABOLITI.....	4
2.1.2. PRISTUPI U METABOLOMICI	5
2.1.3. ANALITIČKE METODE U METABOLOMICI.....	6
2.1.4. UZORCI ZA METABOLOMSKA ISTRAŽIVANJA	7
2.1.5. METABOLOMSKA ISTRAŽIVANJA NA PSIMA	8
2.1.6. BIOMARKERI	8
2.2. PIOMETRA.....	9
2.2.1. PIOMETRA I CISTIČNA HIPERPLAZIJA ENDOMETRIJA	9
2.2.2. ČIMBENICI RAZVOJA PIOMETRE	10
2.2.3. UZROČNICI PIOMETRE.....	12
2.2.4. SIMPTOMI PIOMETRE	13
2.2.5. DIJAGNOSTIKA PIOMETRE	13
2.2.6. LIJEČENJE PIOMETRE.....	14
2.2.7. KOMPLIKACIJE PIOMETRE	14
2.3. AKUTNA OZLJEDA BUBREGA	15
2.3.1. DEFINICIJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA	15
2.3.2. KLINIČKA SLIKA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA.....	15
2.3.3. KLASIFIKACIJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA	16
2.3.4. UKUPNI PROTEINI I KREATININ U MOKRAĆI	18
2.3.4.1. Proteinurija.....	18
2.3.4.2. Kreatinin	19
2.3.5. ETIOLOGIJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA.....	21
2.3.5.1. Sepsa	22
2.3.6. AKUTNA OZLJEDA BUBREGA POVEZANA SA SEPSOM.....	23
2.4. METABOLIZAM BUBREGA I AKUTNA OZLJEDA BUBREGA.....	26
2.4.1. PROKSIMALNI TUBULI BUBREGA	26
2.4.1.1. Mitohondriji epitelnih stanica bubrežnih tubula.....	29
2.4.2. METABOLIČKO REPROGRAMIRANJE.....	31
2.4.2.1. Metabolizam glukoze.....	33
2.4.2.2. Metabolizam lipida	35

2.4.2.3.	Metabolizam aminokiselina	36
2.4.2.4.	Metabolizam nukleotida.....	37
3.	OBRAZLOŽENJE TEME	38
4.	MATERIJAL I METODE	39
4.1.	ISTRAŽIVANE SKUPINE KUJA	39
4.2.	MJERNI INSTRUMENTI I REAGENCI.....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.3.	ANALIZA METABOLITA NECILJANOM METABOLOMSKOM METODOM.....	42
4.4.	OBRADA PODATAKA.....	43
4.4.1.	OBRADA REZULTATA OPĆIH LABORATORIJSKIH PRETRAGA	43
4.4.2.	OBRADA REZULTATA METABOLOMSKIH ANALIZA	43
5.	REZULTATI.....	47
5.1.	ISTRAŽIVANE SKUPINE KUJA	47
5.1.1.	KONTROLNA SKUPINA KUJA	47
5.1.2.	SKUPINA KUJA OBOLJELIH OD PIOMETRE.....	48
5.2.	ISTRAŽIVANJE PIOMETRE KUJA	49
5.2.1.	ANALIZA PUNE KRV.....	49
5.2.2.	ANALIZE SERUMA.....	50
5.2.2.1.	Biokemijska analiza seruma	50
5.2.2.2.	Neciljana metabolomska analiza seruma	52
5.2.3.	ANALIZE MOKRAĆE	62
5.2.3.1.	Fizikalna i biokemijska analiza mokraće	62
5.2.3.2.	Neciljana metabolomska analiza mokraće.....	63
5.3.	ISTRAŽIVANJE POČETKA RAZVOJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA U PIOMETRI KUJA	72
5.3.1.	ANALIZA PUNE KRV.....	72
5.3.2.	ANALIZE SERUMA.....	73
5.3.2.1.	Biokemijska analiza seruma	73
5.3.2.2.	Neciljana metabolomska analiza mokraće.....	75
5.3.3.	ANALIZE MOKRAĆE	85

5.3.3.1.	Fizikalna i biokemijska analiza mokraće.....	85
5.3.3.2.	Neciljana metabolomska analiza mokraće.....	86
5.4.	<i>ISTRAŽIVANJE POVEZANOSTI PROTEINURIJE I POČETKA RAZVOJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA U PIOMETRI KUJA</i>	95
5.4.1.	ANALIZA PUNE KRVÍ.....	95
5.4.2.	ANALIZE SERUMA.....	96
5.4.2.1.	Biokemijska analiza seruma	96
5.4.2.2.	Neciljana metabolomska analiza seruma	98
5.4.3.	ANALIZE MOKRAĆE	106
5.4.3.1.	Fizikalna i biokemijska analiza mokraće	106
6.	RASPRAVA.....	114
6.1.	<i>OPĆE LABORATORIJSKE PRETRAGE PUNE KRVÍ, SERUMA I MOKRAĆE KUJA S PIOMETROM</i>	115
6.2.	<i>NECILJANA METABOLOMSKA ANALIZA SERUMA I MOKRAĆE KUJA S PIOMETROM.....</i>	116
7.	ZAKLJUČCI.....	127
8.	POPIS LITERATURE	129
9.	POPIS KRATICA.....	160
10.	<i>ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA.....</i>	161
10.1.	<i>ŽIVOTOPIS</i>	162
10.2.	<i>POPIS RADOVA</i>	162
11.	PRILOG.....	165
12.	DODATAK	180

1. UVOD

Piometra je kronična upalna bolest maternice spolno zrelih ženki domaćih pasa (lat. *Canis lupus familiaris*) koja je uzrokovana sekundarnom bakterijskom infekcijom. Piometra kuja je česta bolest u veterinarskoj medicini čije liječenje, zbog niza mogućih komplikacija, može predstavljati velik izazov. Karakterizirana je nakupljanjem gnojnog sadržaja u maternici koji se kod otvorene piometre očituje kao mukopurulentni iscjedak. Od ostalih simptoma često su prisutni letargija, depresija, izostanak apetita, anoreksija, povraćanje, proljev, poliurija i polidipsija.

Bolest se razvija nakon estrusa, tijekom lutealne faze kad je maternica pogodna za gravidnost, ali i za rast bakterija. Složena patogeneza piometre još nije potpuno razjašnjena, ali je poznato da hormoni (progesteron) imaju ključnu ulogu u uspostavljanju infekcije oportunističkim bakterijama. Najčešći uzročnik piometre u kuja je gram-negativna bakterija *Escherichia coli* koja u svojoj vanjskoj membrani sadrži lipopolisaharid. U organizmu domaćina lipopolisaharid može pokrenuti nekontrolirani upalni odgovor, odnosno dovesti do ozljede bubrega i ostalih organa te mogućeg fatalnog ishoda.

Upalni proces u piometri može se razviti u nekontrolirani odgovor imunosnog sustava domaćina, posredovan citokinima, dušikovim oksidom i reaktivnim vrstama kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Često se razvije u sepsu i sindrom sistemskog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS), odnosno u sindrom višestrukog zatajenja organa (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS) s fatalnim ishodom.

Jedna od mogućih komplikacija piometre je akutna ozljeda bubrega koja započinje molekularnim promjenama i može napredovati do staničnog oštećenja. Pojam akutne ozljede bubrega je uveden kako bi se obratila pozornost i na subkliničku, asimptomatsku fazu u funkciji bubrega. Trenutna osnova za procjenu funkcije bubrega u ljudi i životinja su koncentracije ureje i kreatinina u serumu. U akutnoj ozljedi bubrega oba pokazatelja progresivno rastu, a intenzitet promjene je obrnuto proporcionalan stupnju glomerularne filtracije (engl. *Glomerular Filtration Rate*, GFR). Dijagnostika akutne ozljede bubrega temelji se na mjerenju koncentracije serumskog kreatinina i volumena izlučene mokraće, ne uzimajući u obzir njihovu nedovoljnu osjetljivost i specifičnost. Zbog velike bubrežne rezerve do poremećaja u funkciji

bubrega dolazi tek kad je oštećeno oko 60 % nefrona. Prema smjernicama udruženja IRIS (engl. *International Renal Interest Society*) I. stupanj akutne ozljede bubrega pasa i mačaka obuhvaća preporučeni referentni raspon koncentracije kreatinina u serumu ($sCr < 140 \mu\text{mol/L}$). Koncentracija kreatinina u serumu je pod utjecajem različitih čimbenika kao što su mišićna masa, hidracijski status, prehrana, cirkadijalne i sezonske varijacije, fizička aktivnost i primjena lijekova.

Metaboliti su molekule male molekulske mase ($M_r < 1,5 \text{ kDa}$), koje se transformiraju tijekom metabolizma i odraz su promjena u genomu, transkriptomu i proteomu. Brojna istraživanja u veterinarskoj i humanoj medicini usredotočena su na otkrivanje i identifikaciju biomarkera bolesti. Metabolomska istraživanja za određivanje metabolita zahtijevaju primjenu suvremenih i osjetljivih analitičkih tehnika, od kojih je jedna od najčešće korištenih tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, LC-MS).

Budući da se u krvi i mokraći nalazi velik broj metabolita, a nove tehnologije omogućuju njihovo detektiranje, pojavila se potreba za istraživanjem metabolita koji bi uputili na raniju fazu ozljede bubrega, što bi omogućilo precizniju i adekvatniju dijagnostiku, prognozu i praćenje bolesti. Tijekom razvoja piometre u kuja dolazi do promjena u metabolomu seruma i mokraće koje bi mogle ukazati na razvoj akutne ozljede bubrega. Rezultati metabolomske analize također bi mogli ukazati na povezanost sa složenim molekulskim zbivanjima u piometri, kao što su oksidacijski stres, upalni odgovor organizma domaćina i promjene u metabolizmu stanične energije.

Ciljevi istraživanja su:

- procijeniti metabolički profil seruma i mokraće kuja oboljelih od piometre i povezati ga s različitim stupnjevima funkcije bubrega
- identificirati nove biomarkere s potencijalnim dijagnostičkim i/ili prognostičkim značajem za poremećaje rada bubrega kod pasa
- identificirati nove dijagnostičke i/ili prognostičke biomarkere za razumijevanje patofizioloških mehanizama kod piometre kuja

Za ostvarivanje ciljeva istraživanja primijenit će se neciljani metabolomski pristup uz analitičku tehniku tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa.

Otkrivanje novih osjetljivih biomarkera omogućilo bi rano prepoznavanje akutne ozljede bubrega, pravodobno započinjanje terapije i sprječavanje razvoja mogućih ireverzibilnih promjena u funkciji bubrega.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. METABOLOMIKA

2.1.1. METABOLOMIKA I METABOLITI

Metabolomika je najmlađa „omika“ znanost, smještena na kraju „omika“ tetralogije (genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika) i svojevrsni je nastavak proteomskih analiza. Bavi se proučavanjem metaboloma, kojeg čini kompletan skup svih metabolita u nekom biološkom sustavu, tekućinama i tkivu organizma (VAIRAKKANI i sur., 2020). Metaboliti su male molekule čija je molekulska masa manja od 1,5 kDa i u njih ubrajamo aminokiseline, organske kiseline, nukleotide, šećere, masne kiseline, lipide, steroide, male peptide i vitamine. Metaboliti endogenog podrijetla su proizvod procesa endogene transformacije i posljedica djelovanja gena, odnosno proteina. Metaboliti egzogenog podrijetla potječu izravno iz okoliša i posljedica su djelovanja vanjskih čimbenika. Skup metabolita koji potječu iz hrane, lijekova, higijenskih proizvoda i zagađivača kojima je organizam izložen nazivamo ekspozomom.

Metabolomika pruža priliku za bolje definiranje odnosa između staničnih funkcija i biokemijskih puteva. Na razini staničnog metabolizma koncentracije metabolita obično se mijenjaju kao posljedica promijenjene aktivnosti enzima ili razlika u mjerama potrošnje i izlučivanja hranjivih tvari. Promjene u koncentraciji metabolita omogućuju izravno očitavanje biokemijske aktivnosti (FERNIE i sur., 2004). Promjena u razini jednog ili više metabolita upućuje na promjenu u fenotipu (SINDELAR i PATTI, 2020).

Metabolom je odraz načina života, dobi, spola, prehrane, zdravlja ili bolesti pa je metabolomika bliža fenotipu ili endotipu bolesti nego proteomika ili transkriptomika (WU i sur., 2023). Zbog toga je metabolomika postala moćan alat za proučavanje različitih učinaka na organizam, od okolišnih podražaja do učinaka određenih lijekova, kao i za otkrivanje biomarkera bolesti (BOUATRA i sur., 2013). Metabolomika se primjenjuje u različitim područjima - biotehnologiji, poljoprivredi, nutricionizmu, kliničkoj dijagnostici, toksikologiji, ekologiji i farmaceutskoj industriji. Također se koristi u identifikaciji nepoznatih molekularnih mehanizama, klasificiranju bolesti i kao oruđe za postavljanje dijagnoze, poboljšavanje prognoze i učinkovitosti liječenja, čime pridonosi poboljšanju zdravlja i dobrobiti ljudi i

životinja (CHRISTIANS i sur., 2011). U medicini to predstavlja otkrivanje novih terapijskih ciljeva, dok u metaboličkom inženjeringu povećanje proizvodnje terapeutika i biogoriva, veće prinose usjeva, bolje strategije za obnovljivu energiju i ostala poboljšanja u sintetičkoj biologiji.

2.1.2. PRISTUPI U METABOLOMICI

U metabolomskim istraživanjima razlikujemo dva osnovna pristupa, neciljani i ciljani (KHAMIS i sur., 2017);

- a) Ciljani (*targeted*) pristup identificira i kvantificira poznate, prethodno definirane podskupove specifičnih metabolita koji imaju određene kemijske strukture, biološke aktivnosti ili doprinose specifičnim metaboličkim putevima. Ciljani pristup je koristan za preciziranje dijagnoze, validaciju biomarkera, i implementaciju u klinički sustav (JOHNSON i sur., 2016).
- b) Neciljani pristup (*non-targeted*) teži sveobuhvatnom profiliranju kompletnog metaboloma unutar biološkog sustava. Pri tome se analiziraju svi mjerljivi analiti, uključujući i nepoznate spojeve (DETTMER i sur., 2007). Neciljani pristup je posebno koristan za razumijevanje patofizioloških mehanizama (LOPEZ-LOPEZ i sur., 2018).

Važan korak u neciljanom metabolomskom pristupu je identifikacija kemijski nepoznatih spojeva. Nakon standardne obrade podataka neki će spojevi biti identificirani korištenjem specifičnih informatičkih alata. Mnogi spojevi ostaju neidentificirani jer njihova kemijska struktura još nije opisana u literaturi i ne nalazi se u bazi podataka. Metabolomske baze podataka sadrže podatke za više od pola milijuna referentnih spojeva i njihov se sadržaj svakodnevno povećava. Međutim, mnogi signali prosječnog metabolomskog istraživanja se ne mogu uvijek pouzdano pripisati određenim kemijskim strukturama zbog informatičkih artefaktata te prisustva kemijskih kontaminanata i suvišnih signala (MAHIEU i sur., 2017). Svaki neidentificirani spoj nije nužno biološki značajan, čak i ako pokazuje statistički značajnu razliku između skupina uzoraka i ima naizgled interpretativne obrasce. Često ostaje otvoreno pitanje jesu li otkriveni spojevi zaista „novi” spojevi koje tek treba biti uključiti u metabolomske baze podataka (SINDELAR i PATTI, 2020).

2.1.3. ANALITIČKE METODE U METABOLOMICI

Niti jedan pojedinačni eksperiment u metabolomici nije sveobuhvatan zbog velike fizikalno-kemijske raznolikosti metabolita. Eksperimentalne metode koje su optimalne za analizu hidrofobnih metabolita nisu prikladne za analizu hidrofilnih metabolita, i obrnuto.

Najzastupljenije analitičke metode za identifikaciju i kvantifikaciju molekula u metabolomskim istraživanjima su spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) i spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS). Spektrometrija masa je obično spregnuta s nekom metodom za razdvajanje, tekućinskom kromatografijom (engl. *Liquid Chromatography*, LC), plinskom kromatografijom (engl. *Gas Chromatography*, GC) ili kapilarnom elektroforezom (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE).

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije je brza, jednostavna, visoko ponovljiva, neinvazivna analitička metoda koja koristi magnetska svojstva odabranih atomskih jezgri (^1H , ^{13}C , ^{31}P) i ne zahtijeva prethodno kromatografsko odvajanje. Priprema uzorka je minimalna, ali je potreban relativno veliki volumen. Budući da je metoda relativno slabo osjetljiva, identificira se manji broj metabolita (KALIM i RHEE, 2017). Uvjeti za dobru izvedbu metode su potiskivanje signala vode i izbjegavanje interferencije signala makromolekula (CARLOS i sur., 2020).

Spektrometrija masa je visoko osjetljiva metoda koja je najčešće spregnuta s tekućinskom ili plinskom kromatografijom. Za razdvajanje termički labilnih, izrazito polarnih molekula prikladna je tekućinska kromatografija), dok je za termički stabilne, nepolarne i hlapljive molekule prikladna plinska kromatografija (GC–MS). Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) može analizirati više vrsta metabolita nego plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS). Navedene metode zahtijevaju opsežnu pripremu uzorka što može uzrokovati gubitke metabolita (BOUDONCK i sur., 2009).

Tradicionalna tekućinska kromatografija obrnutih faza spregnuta sa spektrometrijom masa detektira nepolarne do blago polarne molekule; fenolne kiseline, flavonoide, glikozilirane steroide, alkaloida i druge glikozilirane molekule. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrom masa (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) analizira polarne, hlapljive i nehlapljive molekule. Tekućinska

kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) spregnuta sa spektrometrijom masa analizira blago do izrazito polarne molekule; šećere, aminošećere, aminokiseline, vitamine, karboksilne kiseline i nukleotide (KALANTARI i NAFAR, 2019).

Nakon kromatografskog razdvajanja metaboliti se u spektrometru masa podvrgavaju ionizaciji, a potom razdvajaju na temelju njihovih omjera mase i naboja (m/z). Različiti spektrometri masa koriste različite metode za razlikovanje omjera mase i naboja (trostruki kvadrupol, *time-of-flight*, ionska zamka) od kojih svaka ima specifičnu primjenu, kao i prednosti i nedostatke (KALIM i RHEE, 2016).

Navedene spektroskopske metode postavljaju specifične analitičke i računalne zahtjeve, uključujući rukovanje velikim datotekama spektralnih podataka, filtriranje tzv. pozadinske buke i usklađivanje podataka kako bi se omogućila analiza rezultata. Trenutno se u različitim metabolomskim laboratorijima koriste različiti softverski paketi što otežava usporedbu i harmonizaciju rezultata (KALIM i RHEE, 2016). Ove tehnike se uvelike koriste za identifikaciju molekularnih dijagnostičkih markera i otkrivanje patoloških mehanizama za širok spektar složenih bolesti poput karcinoma, kardiovaskularnih bolesti i osobito kronične bolesti bubrega (engl. *Chronic Kidney Disease*, CKD) (BOELAERT i sur., 2017).

2.1.4. UZORCI ZA METABOLOMSKA ISTRAŽIVANJA

Uzorci u metabolomskim istraživanjima su većinom plazma, serum i mokraća, ali i puna krv, likvor, slina, žuč, sinovijalna tekućina, sjemenja tekućina te izmet. Serum i plazma preporučuju se kao uzorak izbora za metabolomska istraživanja jer pokazuju stabilnost i dobru ponovljivost izmjerenih koncentracija metabolita. Razlika između seruma i plazme je prisustvo proteina zgrušavanja (fibrinogen, protrombin) u plazmi, odnosno njihov nedostatak u serumu. Budući da se tijekom zgrušavanja krvi stimulira sinteza eikozanoida, u serumu se ne mogu naći stvarne fiziološke koncentracije metabolita eikozanoida.

Veoma vrijedan analitički uzorak za metabolomska istraživanja je mokraća jer sadrži metabolite koji su rezultat mnogih procesa za održavanje homeostaze u cijelom organizmu (VIANT i sur., 2007; EMWAS i sur., 2015). Prema bazi podataka ljudskog metaboloma (engl. *Human Metabolome Data Base*, HMDB) mokraća čovjeka sadrži više od 4000 identificiranih

tvari. Mokraća je posebno prikladan uzorak za otkrivanje biomarkera oštećenja bubrega jer potječe iz mikrokruženja bubrega te zbog neinvazivnog prikupljanja i relativne stabilnosti. Prednost mokraće kao uzorka za metabolomsko istraživanje je manji sadržaj lipida i proteinskih kompleksa nego u drugim tjelesnim tekućinama (KALANTARI i NAFAR, 2019). Uzorci mokraće mogu se pohraniti dulje vrijeme bez značajnije degradacije, što ih čini idealnima za longitudinalna istraživanja (BALHARA i sur., 2023). Poteškoću kod analiziranja mokraće u metabolomici predstavlja iznimno velik raspon razrjeđenja koja mogu biti izvan linearnog raspona detekcije.

2.1.5. METABOLOMSKA ISTRAŽIVANJA NA PSIMA

Razlikujemo sljedeća područja primjene metabolomskih istraživanja na psima:

- a) veterinarska znanost, liječenje pasa ljubimaca,
- b) poboljšavanje prehrane, razlikovanje pasmina i vrsta pasa,
- c) korištenje pasa kao životinjskih modela: u različitim bolestima, za procjenu učinka i toksičnosti lijekova.

Većina metabolomskih istraživanja na psima koristi neciljani pristup jer su u fazi traženja ranih indikacija za potencijalne biomarkere i/ili otkrivanje mehanizma bolesti.

Pas je veoma prikladna eksperimentalna životinja za proučavanje mnogih bolesti čovjeka zbog sličnosti u fiziologiji, kliničkoj slici bolesti i u učincima lijekova (HYTONEN i sur., 2016). Ljudi i psi imaju isti broj gena od kojih su većina blisko ortologni. Čak više od 400 nasljednih bolesti je zajedničko ljudima i psima. Psi i ljudi žive u mnogim kulturama, u istom okolišu i često dijele isto kućanstvo i izvore hrane (CARLOS i sur., 2020).

2.1.6. BIOMARKERI

Biomarkeri su endogene molekule koje je moguće detektirati kvalitativno i/ili kvantitativno. Prema definiciji *Biomarkers Definitions Working Group* (2000) biomarker je karakteristika koja se objektivno mjeri i procjenjuje kao pokazatelj normalnih bioloških procesa, patogenih procesa ili farmakoloških odgovora na terapiju (ZANG i sur., 2019). Biomarker je pokazatelj strukturne, biokemijske, fiziološke ili genetske promjene koji ukazuje na prisustvo, težinu ili napredak bolesti (WASUNG i sur., 2015).

Osobine koje karakteriziraju idealan biomarker su osjetljivost, specifičnost, pozitivna prediktivna i negativna prediktivna vrijednost. Međutim, u praksi niti jedan test temeljen na biomarkeru nema savršenu kliničku i analitičku osjetljivost i specifičnost. Budući da su bolesti često posljedica višestrukih procesa, panel koji se sastoji od većeg broja biomarkera može pružiti točniju, osjetljiviju i selektivniju korelaciju s bolesnim stanjem nego samo jedan biomarker. Kako se bolest razvija, grupe metabolita mijenjaju svoj specifičan „potpis“ pri čemu odražavaju zdravstveno stanje kroz blizak prikaz fenotipa (ZANG i sur., 2019).

U metabolomici trenutno postoje poteškoće povezane s razlikama u tehnikama i metodama za procesuiranje (npr. normalizacijske metode) koje mogu utjecati na detekciju metabolita i analitičke rezultate. Također je potrebno organizirati dovoljno veliku i heterogenu kohortu kako bi se validirali već identificirani biomarkeri bolesti. Potrebni su značajni zajednički naponi u stvaranju velikih baza podataka i standardizaciji postupaka u metabolomici (ZANG i sur., 2019).

2.2. *PIOMETRA*

Zbog porasta populacije pasa i produljenja njihovog životnog vijeka posljednjih je godina u porastu učestalost raznih bolesti, posebno reproduktivnih poremećaja (ZHENG i sur., 2022). Piometra je česta bolest u zemljama u kojima se elektivna sterilizacija kuja ne provodi rutinski. Osim u pasa, piometra je opisana i u drugih vrsta životinja - mačaka, zečeva, zamorčića, hrčaka, gerbila, tvorova i vjeverica (HAGMAN, 2022).

2.2.1. PIOMETRA I CISTIČNA HIPERPLAZIJA ENDOMETRIJA

Piometru karakterizira akutna ili kronična gnojna bakterijska upala maternice u spolno zrelih kuja s nakupljanjem upalnog eksudata u lumenu maternice (HAGMAN, 2022; ZHENG i sur., 2022). Smatra se da je preduvjet za razvoj piometre cistična hiperplazija endometrija (engl. *Cystic Endometrial Hyperplasia*, CEH) koja se razvija nakon subakutnog endometritisa pa se piometra definira i kao kompleks endometritis/CEH/piometra (ARORA i sur., 2006; PRETZER, 2008). Međutim, piometra i cistična hiperplazija endometrija se mogu razviti i neovisno jedna o drugoj (DEBOSSHERE i sur., 2001; HAGMAN, 2022). Zbog razlika u kliničkim i histopatološkim nalazima, postoji tendencija da se piometra i cistična hiperplazija endometrija klasificiraju odvojeno (DEBOSSHERE i sur., 2000; PRETZER, 2008).

2.2.2. ČIMBENICI RAZVOJA PIOMETRE

a) Utjecaj dobi

Prosječna dob pri postavljanju dijagnoze piometre je 7 godina, a zabilježena je kod kuja od 4 mjeseca do 18 godina starosti (HAGMAN, 2022). Učestalost piometre povećava se kod kuja starijih od 4 godine što se objašnjava rezultatom kronične, višestruko ponavljane izloženosti progesteronu u ciklusima estrusa tijekom više godina (NISKANEN i sur., 1998; PRETZER, 2008). Utvrđeno je da s godinama dolazi do funkcionalnog starenja endokrinih žlijezda zbog sve većih promjena endometrija (GUPTA i sur., 2013). Udio obolijevanja od piometre u nekastriranih kuja do 10. godine kreće se od 19-25 % (JITPEAN i sur., 2014; NG XIN HUI i sur., 2017; GASSER i sur., 2020), a 20 % u nekastriranih kuja starijih od 10 godina (JITPEAN i sur., 2014; GASSER i sur., 2020). Mlade kuje s anatomskim abnormalnostima vagine i vestibula (strikture, septumi) također su predisponirane za razvoj piometre.

b) Utjecaj pasmine

Kod obolijevanja od piometre postoje razlike vezane uz dob i pasminu kuja, tj. neke pasmine razviju bolest u mlađoj dobi i u većem omjeru nego druge pasmine (HAGMAN, 2022). U određenih visokorizičnih pasmina incidencija piometre je veća od 50 % (ZHENG i sur., 2022). To upućuje na činjenicu da u pasa postoje genetski čimbenici koji pogoduju razvoju piometre. Npr. kod pasmine zlatni retriver je identificirana značajna povezanost incidencije piometre s regijom gena ABCC4 na kromosomu 22 koji kodira sintezu prijenosnika prostaglandina (ARENDT i sur., 2021). Najveća prevalencija piometre je uočena kod njemačkih patuljastih špiceva (BAGRI, 2022). U pasmine koje su također predisponirane za obolijevanje od piometre ubrajamo rotvajlere, bernardince, *chow-chow*, zlatne retrivere, patuljaste gubičare, irske terijere, erdel terijere, *King Charles* kavalir španije, dugodlake škotske ovčare i bernske planinske pse (PRETZER, 2008). Pasmine s niskim rizikom obolijevanja od piometre uključuju švedske goniče, njemačke ovčare, jazavčare te dobermane, njemačke doge, mopsove, boksere, lhasa apse, koker španije, bernardince i engleske buldoge (JENA i sur., 2013).

Gravidnost pruža blagu zaštitu od bolesti piometre, posebno kod nekih pasmina (HAGMAN i sur., 2011; HAGMAN, 2022). Pretpostavlja se da je razlog tome uklanjanje prvotnog endometrija poslije štenjenja, pri čemu novonastali endometrij ima drugačiju osjetljivost na

estrogen i progesteron (ANTONOV i sur., 2015). Lažna gravidnost kuja ne povećava rizik obolijevanja od piometre.

c) Utjecaj hormona

Klinički znakovi piometre se najčešće očituju između 2. i 10. tjedna, prosječno nakon 7 tjedana, a ponekad i 4 mjeseca nakon estrusa ili parenja (HAGMAN, 2022). U mnogih kuja s piometrom je estrus često produljen. Piometra se obično javlja tijekom ili neposredno nakon diestrusa, ponekad se može pojaviti i za vrijeme anestrusa kada je koncentracija progesterona na početnoj razini (PRETZER, 2008; BAGRI, 2022). U spolnom ciklusu kuja diestrus je vrijeme dominacije progesterona kada se povećava proliferacija endometrija, potiče rast i sekrecija endometrijskih žlijezda, smanjuje kontraktilnost miometrija te zatvara cerviks (PRETZER, 2008; HAGMAN, 2022). Pretpostavlja se da patogenezi piometre pridonosi i estrogenska stimulacija prije dominacije progesterona (VERSTEGEN i sur., 2008; NG XIN HUI i sur., 2017). Povećana koncentracija progesterona u ranoj lutealnoj fazi moguće dovodi do supresije stanične imunosti, tj. smanjenog sazrijevanja dendritičnih stanica (PRETZER, 2008). U piometri koncentracije estrogena i progesterona u cirkulaciji obično nisu povišene, nego se pretpostavlja da je pojačani odgovor posljedica većeg broja i veće osjetljivosti hormonskih receptora (PRAPAIWAN i sur., 2017; HAGMAN, 2022). U mnogih kuja s piometrom je čest istovremeni nalaz cističnih folikula koji luče estrogen, žutog tijela, ali i folikularne ciste te neoplazije jajnika što ukazuje na sinergistički hormonski učinak (STRÖM HOLST i sur., 2001).

Primjena egzogenih hormona povećava rizik od razvoja cistične hiperplazije endometrija i piometre, što dodatno potvrđuje ulogu hormona u patogenezi bolesti (CHEN i sur., 2006; HAGMAN, 2017). Hormonske terapije progestinima za suzbijanje estrusa, estrogenima za indukciju estrusa ili za prekid trudnoće mogu biti uzrok obolijevanja mladih kuja od piometre (PRETZER, 2008). Piometra može biti uzrokovana i neravnotežom hormona zbog hormonske terapije za sprječavanje trudnoće (BIGLIARDI i sur., 2004; NG XIN HUI i sur., 2017). Tretmani steroidnim hormonima, gestagenima ili spojevima estrogena koji povećavaju odgovor na progesteron također su povezani s povećanim rizikom od nastanka piometre (HAGMAN, 2022). Izlaganje endometrija isključivo estrogenu ne uzrokuje specifične patološke promjene (PRETZER, 2008), kao ni kada su cirkulirajuće koncentracije estrogena visoke, a progesterona niske.

Uz povišene koncentracije progesterona maternica je manje sposobna suprotstaviti se infekciji bakterijama koje mogu ući u maternicu tijekom estrusa kad je cerviks otvoren. Infekcija bakterijom *Escherichia coli* tijekom lutealne faze ciklusa češće uzrokuje CEH/piometru nego u drugim fazama ciklusa estrusa (HAGMAN, 2022). Sposobnost prijanjanja bakterije *Escherichia coli* uz specifične receptore u endometriju maternice povećava se pod utjecajem progesterona (HAGMAN, 2022). Osim hormonskog čimbenika, obolijevanju od piometre pridonose povećana prijemчивost psa i virulencija bakterija (KREKELER i sur., 2012).

2.2.3. UZROČNICI PIOMETRE

Sekrecija maternice privlači rast mnogih oportunističkih bakterija koje izlučuju endotoksin i u konačnici smanjuju obrambeni mehanizam maternice (KUMAR i SAXENA, 2018). Urođeni imunitet psa reagira na djelovanje bakterijskog endotoksina pomoću receptora koji pokreću nespecifični imunološki odgovor regrutiranjem upalnih stanica, uključujući neutrofile (HORNE i sur., 2008; BAGRI i sur., 2022).

Određeni sojevi bakterija su patogeniji i njihovi faktori virulencije imaju veću sposobnost izazivanja piometre (ARORA i sur., 2006). Bakterije koje se najčešće izoliraju u slučajevima piometre su anaerobne, gram-negativne, a prevladava *Escherichia coli* (HAGMAN i GREKO, 2005; CAVALCANTI DE ANDRADE i sur., 2023) u 90 % slučajeva (GASSER i sur., 2020). *Escherichia coli* je prirodni stanovnik vaginalne flore (HAGMAN, 2022), a obično se nalazi i u izmetu oboljelih kuja (PRETZER, 2008). Smatra se da je infekcija je uzlazna ako su isti sojevi bakterija prisutni u probavnom sustavu, ali put širenja može biti i hematogen (HAGMAN, 2022). Mogući uzročnici infekcije su i druge vrste bakterija (HAGMAN i GREKO, 2005; COGGAN i sur., 2008), kao što su *Klebsiella*, *Staphylococci* i *Streptococci* (ARORA i sur., 2006). Istovremeno može biti uključeno više vrsta bakterija.

Mikrobiološka pretraga u piometri može otkriti više od jedne bakterijske vrste, a veoma rijetko nalaz može biti i negativan tj. sterilan (FRANSSON i sur., 1997). Etiologija sterilne piometre nije poznata, ali je jedna od pretpostavki da je u određenim slučajevima obrambeni mehanizam maternice sposoban eliminirati mikroorganizme (YOON i sur., 2017). Dodatni mogući razlog sterilnog nalaza piometre je neadekvatno uzorkovanje (CAVALCANTI DE ANDRADE i sur., 2023).

2.2.4. SIMPTOMI PIOMETRE

Ovisno o prohodnosti cerviksa razlikujemo tzv. otvorenu (<60 % kuja) i zatvorenu piometru (NG XIN HUI i sur., 2017). Najčešći klinički nalaz u kuja s otvorenom piometrom je vaginalni iscjedak neugodnog mirisa, koji može biti krvav do mukopurulentan. Kuje sa zatvorenom piometrom nemaju iscjedak, ali može biti prisutna nadutost trbuha. Klinički znakovi mogu biti akutni ili kronični te uključuju dehidraciju, polidipsiju, poliuriju, letargiju, bol u trbuhu, anoreksiju, povraćanje ili proljev, promijenjenu boju sluznica i tahikardiju. Često je prisutna i hipertermija, osim u kuja s toksemijom koje mogu biti hipotermične (PRETZER, 2008). Kod kuja sa zatvorenom piometrom postoji veća vjerojatnost da će se razviti teška sistemska bolest nego kod kuja s otvorenom piometrom.

U lumenu maternice može se akumulirati i sterilna tekućina, sa ili bez cistične hiperplazije endometrija pa se, ovisno o vrsti tekućine i sadržaju mucina, može razviti hidrometra, mukometra ili, rijetko, hematometra. Kada nema bakterijske infekcije maternice, klinički znakovi su blagi, subklinički ili nisu prisutni (HAGMAN, 2022).

Homeostazu vode u organizmu primarno regulira antidiuretski hormon (ADH) čije izlučivanje iz neurohipofize primarno ovisi o osmolalnosti plazme. Kada se osmolalnost plazme povisi, antidiuretski hormon djeluje na V2 receptore u bubrežnim sabirnim kanalićima tako što povećava apsorpciju vode ekspresijom receptora akvaporina 2. U piometri dolazi do pojave sekundarnog nefrogenog *diabetes insipidusa* kada bubreg postaje manje osjetljiv na antidiuretski hormon (ADH) što se klinički očituje kao polidipsija i poliurija. Pokretački čimbenik je lipopolisaharidni endotoksin iz bakterije *Escherichia coli* koji blokira V2 receptore, sprječava vezanje ADH i umanjuje sposobnost Henleove petlje da reapsorbira ione natrija i klora.

2.2.5. DIJAGNOSTIKA PIOMETRE

Kod sumnje na piometru, ultrazvuk je dijagnostička tehnika izbora jer daje detaljne podatke o veličini i debljini maternice, prisutnosti fibroze ili cista u endometriju i izgledu tekućine u maternici (BIGLIARDI i sur., 2004). Pozitivan nalaz uključuje povećanu maternicu sa zavijenim, cjevastim rogovima ispunjenim anehogenom ili hipoehogenom tekućinom. Važno

je razlikovati piometru od drugih patoloških poremećaja maternice, posebno onih koje nisu bakterijske upale, kako bi se smanjila nepotrebna primjena antibiotika.

2.2.6. LIJEČENJE PIOMETRE

Liječenje piometre se provodi kirurškim ili farmakološkim putem. Kirurška ovariohisterektomija je najčešći i najučinkovitiji način liječenja piometre (FIENI i sur., 2014; ZHENG i sur., 2022). Njome se izravno uklanja izvor infekcije i sprječava recidiv (HAGMAN, 2022). Ovariohisterektomija sprječava obolijevanje od piometre i tumora mliječnih žlijezda, ali može povećati rizik od drugih bolesti, npr. urinarne inkontinencije, pretilosti, ortopedskih bolesti te malignih bolesti (ZHENG i sur., 2022). Kod nepotpuno kastriranih kuja može se razviti tzv. *stump* piometra u zaostalom tkivu maternice, najčešće zbog ostataka jajnika koji proizvode hormone (HAGMAN, 2022).

Farmakološki način liječenja se primjenjuje isključivo kod mlađih i rasplodnih životinja (FIENI i sur., 2014) s otvorenom piometrom i bez dodatnih patoloških stanja maternice i/ili jajnika (HAGMAN, 2022). Također postoji mogućnost imunizacije protiv bakterijskih čimbenika virulencije koji su ključni u uspostavljanju infekcije. Imunizacija protiv bakterije *Escherichia coli* podrazumijeva blokiranje sva tri adhezina koji su ključni u pričvršćivanju za endometrij maternice (KREKELER i sur., 2013).

2.2.7. KOMPLIKACIJE PIOMETRE

Piometra pasa je bolest s nizom mogućih teških komplikacija koje uključuju sepsu, septički šok, peritonitis, diseminiranu bakterijsku infekciju, poremećaj funkcije većeg broja organa i smrt (HEIENE i sur., 2007; JITPEAN i sur., 2014). U više od 50 % kuja oboljelih od piometre razvija se sindrom sistemskog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) (HAGMAN, 2017). U slučaju sepse može doći do razvoja sindroma višestrukog zatajenja organa (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*, MODS) (RAMACHANDRAN, 2014; DEMIREL i sur., 2018), dok je mjera smrtnosti uzrokovana piometrom 4-26 % (KUPLULU i sur., 2009; DEMIREL i sur., 2018), odnosno 10 % (JITPEAN i sur., 2014).

U piometri može doći do akutnog ili subakutnog oštećenja glomerula i/ili tubula u bubrezima. Bakterijski uzročnik stimulira imunološki sustav i stvaraju se cirkulirajući imunološki kompleksi koji se talože u glomerulima (MADDENS i sur., 2010; GASSER i sur., 2020).

2.3. AKUTNA OZLJEDA BUBREGA

2.3.1. DEFINICIJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA

Pojam akutne ozljede bubrega (engl. *Acute Kidney Injury*, AKI) je tijekom godina prolazio kroz značajne promjene (MAKRIS i SPANOU, 2016) što je uglavnom bilo posljedica promjena u definiciji bolesti. Sredinom prošlog stoljeća u humanu medicinu je uveden pojam akutnog zatajenja bubrega (engl. *Acute Renal Failure*, ARF) koji se odnosio na jaki akutni poremećaj u funkciji bubrega (EKNOYAN, 2002). Klinički je podrazumijevao jaku azotemiju, 25 % porast koncentracije kreatinina u serumu, često oliguriju ili anuriju te potrebu za transplantacijom bubrega. Kasnija istraživanja su pokazala da čak i blaga oštećenja ili blage promjene u funkciji bubrega mogu imati ozbiljne kliničke posljedice (HOSTE i sur., 2006). Kako bi se identificirala i populacija pacijenata s blažim promjenama u funkciji bubrega, uveden je novi pojam akutna ozljeda bubrega (engl. *Acute Kidney Injury*, AKI).

Istraživanje iz 2002. godine je utvrdilo čak 35 definicija AKI u literaturi (KELLUM i sur., 2002). Zbog potrebe za uniformnom definicijom AKI koja bi uključila sve stupnjeve oštećenja bubrega, u humanoj medicini su razvijeni sustavi klasifikacije KDIGO (engl. *Kidney Disease/Improving Global Outcomes*), RIFLE (engl. *Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage*) i AKIN (engl. *Acute Kidney Injury Network*) (GAMEIRO i sur., 2018). Doneseno je nekoliko konsenzusa u vezi definicije AKI koji su razvijeni isključivo na osnovu koncentracije kreatinina u serumu i izlučivanja mokraće te su uvedeni u epidemiološke studije u svrhu identificiranja pacijenata.

2.3.2. KLINIČKA SLIKA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA

Akutna ozljeda bubrega je karakterizirana smanjenjem bubrežne funkcije kroz kratko vremensko razdoblje (dane, tjedne) (GONSALEZ i sur., 2019). Uključuje naglo smanjenje GFR i gubitak funkcije bubrega, kao i strukturna oštećenja (MAKRIS i SPANOU, 2016). Klinički

se očituje promjenama u volumenu mokraće i izlučivanju otopljenih tvari putem bubrega, odnosno porastom koncentracije kreatinina u serumu i proteina u mokraći. Najčešći simptomi nisu specifični i ovise o uzroku te uključuju letargiju, anoreksiju, povraćanje, slabost, proljev, anuriju, oliguriju, poliuriju i polidipsiju. Navedeni klinički znakovi su posljedica nakupljanja uremijskih toksina pa su u korelaciji sa stupnjem azotemije.

Kod životinja se AKI obično očituje kao akutna uremija nakon koje se utvrđuje uzrok (prerenalni, renalni, postrenalni). U životinja se AKI razvija naglo i najčešće izvan bolničkog okruženja pa su podaci o postojanju azotemije, promjeni GFR-a i/ili proizvodnji mokraće rijetko poznati. Zbog toga kriteriji definirani za ljude nisu sasvim primjenjivi na životinje sa spontano nastalim bolestima bubrega. Dijagnoza AKI u pasa (i mačaka) se postavlja na osnovu kliničkih znakova koji su u skladu s AKI i smjernicama IRIS za dijagnosticiranje i stupnjevanje AKI.

U pasa su kao mogući čimbenici rizika za uginuće prepoznati smanjena proizvodnja mokraće, stupanj azotemije, proteinurija, anemija, abnormalnosti elektrolita, povećani anionski procjep i uključenost drugih organskih sustava (THOEN i KERL, 2011; RIMER, 2022). Izostanak proizvodnje mokraće, anurija, je relativno konzistentan negativan prognostički pokazatelj smrti kod ljudi i životinja (KEIR i KELLUM, 2015; RIMER, 2022).

Tijek AKI-a ima četiri faze. Prva, inicijalna faza, događa se tijekom i odmah nakon ozljede bubrega. Za vrijeme druge, ekstenzijske faze, razvija se ishemija, hipoksija, upala i oštećenje stanica koje dovodi do apoptoze i/ili nekroze. Za vrijeme prve dvije faze često se ne primjećuju kliničke i laboratorijske abnormalnosti. Do azotemije i/ili uremije dolazi u trećoj, tzv. fazi održavanja, koja može trajati danima ili tjednima. Pritom mogu biti prisutne oligurija (stvaranje mokraće manje od 0,5 mL/kg/sat) ili anurija (nema stvaranja mokraće). Tijekom četvrte, faze oporavka dolazi do ublažavanja azotemije i obnavljanja bubrežnih tubula pa se može pojaviti značajna poliurija (ROSS, 2011).

2.3.3. KLASIFIKACIJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA

Bolesti bubrega su česte u malih životinja i za njihovo uspješno liječenje je potrebno odrediti prirodu oštećenja (CIANCOLO, 2016). Međutim, u veterinarskoj medicini također ne postoji precizna definicija AKI. Zbog toga je, analogno kriterijima u humanoj medicini, udruženje IRIS

(engl. *International Renal Interest Society*) razvilo smjernice za kliničko razlučivanje i stupnjevanje AKI i CKD u pasa i mačaka (www.iris-kidney.com/guidelines/grading) (LEE i sur., 2011; THOEN i KERL, 2011). Smjernice se primjenjuju u kliničkoj praksi od 2003. godine za CKD, odnosno od 2012. godine za AKI te pomažu u identificiranju reverzibilnih slučajeva koje je moguće izliječiti.

Udruženje IRIS je primijenilo isti pristup u klasificiranju i stupnjevanju CKD-a i AKI-a u pasa i mačaka. Za razliku od stupnjeva CKD-a koji su postojani, stupnjevi AKI-a su podložni promjenama ako se stanje pogoršava, poboljšava ili prelazi u kroničnu bolest bubrega. Stupnjevi se temelje na koncentraciji kreatinina u serumu, volumenu izlučene mokraće i potrebi za nadomjesnom terapijom za bubrege (COBRIN i sur., 2013). Ovim pokazateljima nedostaje osjetljivost i specifičnost te očituju porast uz značajnu vremensku odgodu, posebno kad je sepsa uzrok AKI (DELLEPIANE i sur., 2016).

Prema smjernicama IRIS-a u I stupanj AKI-a ubrajamo pse u kojih se nije razvila azotemija, tj. koncentracija kreatinina u serumu je unutar referentnih vrijednosti ($sCr < 140 \mu\text{mol/L}$). Pritom anamnestički, klinički, dijagnostički slikovni i laboratorijski dokazi, kao npr. povišena serumska koncentracija simetričnog dimetil-arginina (engl. *symmetrical dimethylarginine*, SDMA), glukozurija, cilindurija, proteinurija, mikroalbuminurija, upalni sediment mokraće govore u prilog AKI-u. Porast koncentracije serumskog kreatinina od najmanje $26,4 \mu\text{mol/L}$ tijekom 48 sati je kriterij za identifikaciju I i II stupnja AKI (HOKAMP i NABITY, 2016). U II stupanj ubrajamo pse u kojih je prisutna blaga azotemija uz povišenu serumsku koncentraciju kreatinina ($sCr 141\text{--}220 \mu\text{mol/L}$). U oba stupnja je prisutna oligurija ili anurija, ali oboljeli psi dobro reagiraju na terapiju tekućinom, što se očituje kao porast u proizvedenom volumenu mokraće od 1 mL/kg/h unutar 6 sati i/ili pad koncentracije kreatinina u serumu na bazalnu vrijednost tijekom 48 sati. IRIS stupnjevi III ($sCr 221\text{--}439 \mu\text{mol/L}$), IV ($sCr 440\text{--}880 \mu\text{mol/L}$) i V ($sCr > 880 \mu\text{mol/L}$) predstavljaju srednje tešku do tešku akutnu ozljedu bubrega i odnose se na pse s progresivno većim stupnjevima oštećenja bubrežnog parenhima i funkcionalnog zatajenja bubrega tj. na uremiju. Svaki od navedenih stupnjeva AKI-a se prema IRIS smjernicama dalje razlikuje prema stvaranju i izlučivanju mokraće tijekom 6 sati kao oligoanurični ($0\text{--}1 \text{ mL/kg/sat}$) ili neoligurični ($>1 \text{ mL/kg/sat}$) te prema potrebi za nadomjesnom bubrežnom terapijom.

2.3.4. UKUPNI PROTEINI I KREATININ U MOKRAĆI

U pasa s azotemijom prognostičku vrijednost ima omjer ukupnih proteina i kreatinina u mokraći (engl. *Urine Protein to Creatinine Ratio*, UPCR). Vrijednost UPCR-a ne razlučuje pouzdano glomerularne od tubularnih proteinurija, ali njegova procjena i praćenje predstavljaju važan korak u utvrđivanju prisustva i jačine oštećenja glomerula. Vrijednosti UPCR-a od 0,2-0,5 klasificiraju se kao granična proteinurija, dok se UPCR $\geq 0,5$ smatra pozitivnim nalazom proteinurije. Ako su u barem 3 uzastopna uzorka u razmaku od 2 ili više tjedana vrijednosti UPCR $\geq 0,5$, postavlja se dijagnoza perzistirajuće renalne proteinurije koja može biti glomerularna i/ili tubularna. Vrijednosti UPCR < 2 su pretežno znak tubularne proteinurije (LEES i sur., 2005), a mogućeg primarnog oštećenja glomerula (HOKAMP i sur., 2016). Vrijednosti UPCR ≥ 2 ukazuju na glomerularnu proteinuriju. Ako je kod inicijalne procjene UPCR ≥ 1 , povećan je rizik od uremične krize. Relativni rizik od uremije ili uginuća je oko 1,5 puta veći za svako jedinično povećanje UPCR-a (JACOB i sur., 2005; CIANCOLO i sur., 2016).

2.3.4.1. Proteinurija

U zdravom bubregu glomerularna filtracijska barijera omogućuje slobodnu filtraciju proteina male molekulske mase (< 40 kDa) koji se potom reapsorbiraju u proksimalnim tubulima. Proteinurija se odnosi na izlučivanje proteina mokraćom u količini koja je veća od fiziološke, tj. u pasa većoj od 30 mg/kg/dan. S obzirom na podrijetlo proteina u mokraći proteinurija može biti prerenalna, renalna i postrenalna.

Renalna proteinurija može biti glomerularna, tubularna ili glomerularno-tubularna. Glomerularna selektivna proteinurija se očituje malim porastom albumina u mokraći. Kod glomerularne neselektivne proteinurije je povećana propusnost glomerularne filtracijske barijere pa se u mokraćnom filtratu pojavljuju i proteini srednje i velike (> 100 kDa) molekulske mase. Tubularna proteinurija je uzrokovana smanjenom tubularnom reapsorpcijom proteina plazme koji se normalno filtriraju, proteina niske molekulske mase od 10-70 kDa, npr. $\alpha 1$ -mikroglobulin, $\beta 2$ -mikroglobulin. Proteini se u mokraći mogu pojaviti i zbog istjecanja proteina iz tubularnih epitelnih stanica i/ili povećane sinteze proteina koji su uključeni u ozljedu i popravak (D'AMICO i BAZZI, 2003). Često je uzrokovana nefrotoksinima ili teškim metalima,

ali i kompetitivnim relativnim nedostatkom tubularne reapsorpcije drugih proteina koji se slobodno filtriraju. Smatra se da je kod primarnog oštećenja tubula proteinurija blaga uz nalaz proteina pretežno niske molekulske mase (D'AMICO i BAZZI, 2003; GIORI i sur., 2011). U glomerularno-tubularnoj proteinuriji se u mokraći mogu naći sve vrste proteina plazme, osim proteina velike molekulske mase, npr. α 2-makroglobulina. Budući da se oštećenje glomerula i tubula obično događa istovremeno, u proteinuriji pasa su najčešće prisutni miješani obrasci s proteinima niske te srednje i visoke molekulske mase (ZINI i sur., 2004).

Prerenalna proteinurija je posljedica visokih serumskih koncentracija proteina niske molekulske mase koji se u ultrafiltratu mogu naći i u fiziološkim uvjetima. Pritom funkcije glomerula i tubula mogu biti očuvane. Postrenalna proteinurija se događa kada postoji izravan prijelaz proteina plazme velike molekulske mase, npr. α 2-makroglobulina, u mokraću.

2.3.4.2. Kreatinin

Koncentracija kreatinina u serumu se koristi klinički i eksperimentalno kao marker stupnja glomerularne filtracije više od 50 godina i najčešći je pokazatelj bubrežne funkcije u humanoj i veterinarskoj medicini (COBRIN i sur., 2013). Koncentracija kreatinina u serumu je određena ravnotežom između dnevne endogene proizvodnje i dnevnog izlučivanja kreatinina. Ekstrarenalni čimbenici koji utječu na koncentraciju kreatinina u serumu uključuju mišićnu masu i različite uzroke pre- i postrenalne azotemije. Na koncentraciju kreatinina u serumu mogu utjecati stanje hidracije (COBRIN i sur., 2013) i volumen krvi u organizmu te opstrukcija ili ruptura u mokraćnom sustavu (HOKAMP i NABITY, 2016). Budući da su dnevne varijacije u mišićnoj masi relativno male, dnevna proizvodnja i izlučivanje kreatinina mokraćom su kod zdravih pasa gotovo konstantne (BRAUN i sur., 2003). Ako je prisutno propadanje mišića, praćenje koncentracije kreatinina u serumu tijekom vremena nije pouzdan pokazatelj smanjenja glomerularne filtracije (HOKAMP i NABITY, 2016).

Kreatinin se slobodno i gotovo potpuno filtrira u glomerulima pa je njegova koncentracija u glomerularnom filtratu jednaka onoj u plazmi. Ne apsorbira se u bubrežnim tubulima i izlučuje se bez značajnih metaboličkih promjena (MARX i sur., 2018). Kreatinin se slabo izlučuje proksimalnim bubrežnim tubulima pasa (muški psi). Interindividualne varijacije koncentracije kreatinina u mokraći su vrlo velike, čak i u mokraći prikupljenoj tijekom 24 sata. Prema nekim

istraživanjima koncentracija kreatinina u mokraći je nakon obroka povećana, dok prema drugim istraživanjima nije povećana (BRAUN i sur., 2003).

Budući da je dnevna proizvodnja kreatinina gotovo konstantna, glavni čimbenik koji uzrokuje promjenu koncentracije kreatinina u serumu je glomerularna filtracija (LEES, 2004). Odnos koncentracije kreatinina u serumu i stupnja glomerularne filtracije je obrnuto proporcionalan i nelinearan. U ranoj fazi bolesti bubrega velika smanjenja glomerularne filtracije rezultiraju relativno malim povećanjem koncentracije kreatinina u serumu, a obrnuto je kod uznapredovale bubrežne bolesti (BRAUN i sur., 2003; COBRIN i sur., 2013). Koncentracija kreatinina u serumu nije osjetljiv pokazatelj rane insuficijencije bubrega jer raste iznad referentnog raspona tek kad se dogodi gubitak od najmanje 75 % mase funkcionalnih nefrona (COBRIN i sur., 2013). Funkcija bubrega opada sporije nego masa nefrona zbog kompenzacijskih promjena u preostalim nefronima, tzv. kompenzacijske hipertrofije bubrega. U istraživanjima s djelomičnom nefrektomijom prema klirensu inulina gubitak bubrežne mase od 75 % odgovara smanjenju bubrežne funkcije od približno 50-60 % nakon mjesec dana (HOKAMP i NABITY, 2016).

Nedovoljna osjetljivost serumske koncentracije kreatinina za otkrivanje pogoršanja funkcije bubrega manjeg od 50 % je djelomično posljedica preširokih referentnih raspona u pasa (HOKAMP i NABITY, 2016). Koncentracija kreatinina u serumu ima u pasa relativno visoku individualnost (RUAUX i sur., 2012), tj. njegova je varijabilnost između jedinki mnogo veća nego varijabilnosti unutar iste životinje (HOKAMP i NABITY, 2016). Na vrijednost koncentracije kreatinina u serumu pasa utječu dob, spol, pasmina (MISBACH i sur., 2015), ali i laboratorij u kojem se mjeri (CONCORDET i sur., 2008; HOKAMP i NABITY, 2016) te metoda mjerenja. Prosječne koncentracije kreatinina u serumu hrtova su više nego kod drugih pasmina. Primjena koncentracije kreatinina u serumu kao testa probira za ranu bolest bubrega mogla bi se poboljšati snižavanjem gornje granice referentne vrijednosti (LEES, 2004). U istraživanju na psima oboljelim od nasljedne nefropatije je primijenjena niža gornja referentna granica za koncentraciju kreatinina u serumu ($sCr < 106 \mu\text{mol/L}$) pa je porast koncentracije kreatinina u serumu otkrio smanjenje GFR-a za 48% (HOKAMP i NABITY, 2016).

Rasponi koncentracije kreatinina u serumu se kod zdravih životinja i kod životinja s ranom bubrežnom bolesti, tj. smanjenim GFR-om, značajno preklapaju (LEES, 2004). Koncentracija kreatinina u serumu može precijeniti bubrežnu funkciju u kahektičnih, starijih i vrlo mladih

pacijenata te u malih pasmina (HOKAMP i NABITY, 2016). Kod ljudi se GFR relativno točno izračunava različitim formulama koje, osim koncentracija kreatinina u serumu, uključuju i dob, spol, etničku pripadnost i tjelesnu masu (LEES, 2004). Slične jednadžbe za izračun GFR u pasa i mačaka nisu opisane iako na vrijednosti utječu isti čimbenici (dob, spol, tjelesna masa, pasmina) (COBRIN i sur., 2013; BEXFIELD i sur., 2008).

Osjetljivost pokazatelja kreatinina za otkrivanje rane bolesti bubrega se može povećati uzastopnim mjerenjima koncentracije kreatinina u serumu natašte kod iste životinje (HOKAMP i NABITY, 2016; LEES, 2004). Tijekom ranih faza progresivne bolesti bubrega uzastopna mjerenja koncentracije kreatinina u serumu pasa s opadajućim GFR-om često pokazuju blago rastući trend koji je unutar referentnog raspona (LEES, 2004). Ovaj koncept otkrivanja malih, ali klinički relevantnih povećanja koncentracije kreatinina u serumu je prihvatljiv u slučaju AKI-a (HOKAMP i NABITY, 2016). Dijagnostički zaključci o životinjama s graničnom ili blago povišenom koncentracijom kreatinina u serumu su potpuniji uz istodobne procjene proteinurije (mikroalbuminurije) i sposobnosti koncentriranja mokraće (LEES, 2004).

2.3.5. ETIOLOGIJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA

Prema tradicionalnoj klasifikaciji AKI može biti prerenalna, renalna (parenhimna) i postrenalna (opstruktivna) nefropatija. Samo renalna predstavlja pravu bolest bubrega, dok su prerenalni i postrenalni AKI posljedice drugih ekstrarenalnih bolesti koje dovode do smanjenja GFR-a. Ako prerenalna i/ili postrenalna stanja potraju, ona mogu dovesti do oštećenja stanica bubrega, tj. do intrinzične renalne bolesti. AKI je u mnogih pacijenata bolest miješane etiologije u kojoj sepsa, ishemija i nefrotoksičnost često koegzistiraju i kompliciraju prepoznavanje i liječenje bolesti (MAKRIS i SPANOU, 2016). Budući da je AKI komplikacija različitih medicinskih stanja, prognoza i ishod bolesti ovise o uzroku (ROSS, 2011). AKI u pasa oboljelih od zarazne bolesti može imati povoljan ishod zbog reverzibilne prirode bolesti i dostupnosti specifičnog tretmana za uklanjanje uzroka. Posljednjih godina su u veterinarskoj medicini dostupni napredniji načini liječenja, npr. mehanička ventilacijska potpora u jedinicama intenzivnog liječenja pa se povećao udio pasa sa uspješnim ishodom liječenja AKI-a (THOEN i KERL, 2011; RIMER i sur., 2022). U novije vrijeme AKI se opisuje kao sindrom u koji ubrajamo hepatorenalni, kardioresnalni, nefrotoksični, perioperativni AKI, AKI povezan sa sepsom i ostale (RONCO i sur., 2019; EL-KHOURY, 2021).

2.3.5.1. Sepsa

Sepsa je heterogen i složen klinički sindrom u sklopu kojeg se može razviti po život opasan poremećaj rada većeg broja organa (HE i sur., 2022). Karakterizira je nekontrolirani odgovor imunosnog sustava domaćina na patogen zbog čega se često razvija generalizirana upala.

Trenutno važeći klinički kriteriji za dijagnozu sepse u humanoj medicini su sadržani u dokumentu konsenzusa *Sepsis-3* iz 2016. godine. U njemu se predlaže primjena sustava probira SOFA (engl. *Sequential Organ Failure Assessment*) koja podrazumijeva kvantitativnu procjenu funkcije, odnosno disfunkcije jetre, sustava zgrušavanja krvi te respiratornog, kardiovaskularnog, bubrežnog i neurološkog sustava koja je posebno namijenjena pacijentima smještenim u jedinice intenzivnog liječenja (SINGER i sur., 2016). Kriteriji koje predlaže konsenzus *Sepsis-3* nisu potpuno primjenjivi u veterinarskoj medicini jer nedostaje standardizacija kliničkih kriterija i validacija sustava probira SOFA. Zbog navedenih razloga prevalencija i učestalost sepse u veterinarskoj medicini nisu objektivno dokumentirani. Prema dostupnim podacima mjera smrtnosti pasa povezana s npr. septičkim peritonitisom je 21-68 % (BENTLEY i sur., 2007). Prema drugim izvješćima mjera smrtnosti pasa zbog zatajenja organa je 70 % (KENNEY i sur., 2010).

Sepsa se u veterinarskoj medicini definira analogno smjernicama iz humane medicine koje su utvrđene konsenzusima iz 1991. i 2001. godine. Prema stupnju težine razlikujemo sepsu, tešku sepsu i septički šok (LEVY i sur., 2003). Dijagnoza sepse se postavlja ako se klinički očituje SIRS uz dokumentiranu infekciju ili sumnju na infekciju (SUMMERS i sur., 2021). Kod teške sepse se razvija SIRS i disfunkcija organa. Septički šok je, osim navedenim, karakteriziran i dugotrajnom hipotenzijom (POSTON i KOYNER, 2019). U veterinarskoj medicini postoji nekoliko kriterija za postavljanje dijagnoze SIRS-a (Hauptmann, 1997; de Laforcade, 2003; Okano, 2002), ali ne postoji konsenzus koji bi kriterij trebalo primijeniti. Predloženo je da se dijagnoza SIRS-a u pasa postavi ako su promijenjena barem dva od sljedećih nekoliko parametara; temperatura $<37,8^{\circ}\text{C}$ ili $>38,9^{\circ}\text{C}$, >120 otkucaja srca/min, >20 udisaja/min, broj leukocita u perifernoj krvi $<6 \times 10^9/\text{L}$ ili $>16 \times 10^9/\text{L}$, $>3\%$ nezrelih neutrofilnih granulocita u perifernoj krvi (CORTELLINI i sur., 2024).

Uzročnici sepse mogu biti infektivni, bakterije, virusi, gljivice i paraziti, ali i neinfektivni, kao npr. akutni pankreatitis ili trauma (HE i sur., 2022). U sepsi se na mjestu ozljede tkiva u

domaćinu aktiviraju urođeni stanični i humoralni imunološki odgovori. U stanici se aktiviraju molekularne kaskade koje se manifestiraju kao upalni odgovor na infekciju (FRY, 2012). Patofiziološki mehanizmi koji se odvijaju u sepsi uključuju prekomjernu proizvodnju proupalnih citokina, povećanje oksidativnog stresa, aktivaciju simpatičkog živčanog sustava, ozljedu endotela, otpuštanje vazoaktivnih tvari, aktivaciju kaskade zgrušavanja krvi, preraspodjelu krvotoka i poremećaje mikrocirkulacije (HE i sur., 2022).

Na početku sepse iz ozlijeđenih stanica se otpuštaju tzv. molekularne čestice povezane s patogenom (engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*, PAMP) i molekularne čestice povezane s oštećenjem (engl. *Damage Associated Molecular Patterns*, DAMP) (KEIR i KELLUM, 2015). Organizam domaćina ih prepoznaje kao uzročnike (VAN DER POLL i sur., 2017) koji se kao ligandi vezuju na TLR (engl. *Toll-like Receptor*), receptore na površini imunskih stanica, ili na NLR (engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptor*), receptore u citosolu stanica. Najčešći uzrok bakterijske sepse je lipopolisaharid, element stanične stijenke gram-negativnih bakterija, koji ubrajamo u PAMP (HE i sur., 2022). Otpuštanje DAMP aktivira proupalni odgovor, tj. imunosne stanice, T-limfocite i dendritične stanice u udaljenim organima (HUMPHREYS i sur., 2008). Aktivirani upalni citokini regrutiraju imunosne stanice na mjesto ozljede radi uklanjanja bakterija. Cirkulirajući upalni citokini stimuliraju u stanicama endotela proizvodnju dušikovog oksida (NO), a pojačano se otpuštaju i druge vazoaktivne tvari, npr. endotelin, vazopresin, angiotenzin II. Dolazi do generalizirane arterijske vazodilatacije, odnosno smanjenog sistemskog vaskularnog otpora zbog čega se smanjuje i efektivni cirkulirajući volumen krvi (HE i sur., 2022). Posljedica je neujednačen protok krvi i nedovoljna perfuzija organa u uvjetima povećanih metaboličkih potreba (KAUKONEN i sur., 2015). Sepsa uzrokuje poremećaje mikrocirkulacije u svakom vitalnom organu koje su neovisne o promjenama makrohemodinamskih parametara (SEELY i sur., 2011). Ključnim mehanizmom u razvoju sepse smatra se poremećaj mikrocirkulacije jer uzrokuje disfunkciju organa i potencijalno smrtni ishod (POST i sur., 2017).

2.3.6. AKUTNA OZLJEDA BUBREGA POVEZANA SA SEPSOM

Jedna od najtežih i najčešćih komplikacija sepse je AKI koji je, unatoč primjeni antibiotika, povezan s lošim ishodima i visokom smrtnošću (HE i sur., 2022). Kliničke značajke akutne ozljede bubrega povezane sa sepsom (engl. *Sepsis Associated Acute Kidney Injury*, SA-AKI) su također naglo pogoršanje bubrežne funkcije, tj. smanjenje GFR i izlučivanja mokraće,

povišenje koncentracije kreatinina u serumu (BELLOMO i sur., 2017) što je praćeno sindromima disfunkcije ostalih organa. Prema trenutnim spoznajama patogeneza SA-AKI uključuje nekontrolirani odgovor imunosnog sustava domaćina, sistemsku upalu, nakupljanje citokina u bubrežima, promjene u hemodinamici, disfunkciju mikrovaskularnih endotelnih stanica u bubrežima i oštećenje epitelnih stanica bubrežnih tubula (FANI i sur., 2018).

Proupalni odgovor se odvija kroz aktivaciju imunskih stanica, T-limfocita i dendritičnih stanica bubrega. Aktivacijom nuklearnog čimbenika κB (engl. *Nuclear Factor-kappa B*, NF- κB) oslobađaju se proupalni citokini, prekomjerno proizvode ROS i oštećuju mitohondriji (KALAKECHE i sur., 2011) što pojačava ozljedu epitelnih stanica bubrežnih tubula (FRY, 2012; DELLEPIANE i sur., 2016). U AKI-u u tubulima kore bubrega može doći do nastajanja superoksida, odnosno peroksinitrita, pri čemu nastali nitrozativni stres utječe na proteine ili DNK i dovodi do stanične smrti ili apoptoze (ZHAO i sur., 2022). U mišjem modelu endotoksemije ozljedu bubrežnih tubula je ublažila superoksid-dismutaza (SOD) koja sudjeluje u uklanjanju ROS-a (WANG i sur., 2003; HIMMELFARB i sur., 2004).

PAMP i DAMP prepoznaju TLR koji su izraženi na površini imunskih stanica, ali i epitelnih stanica bubrežnih tubula (JANG i RABB, 2015). PAMP i DAMP se mogu filtrirati kroz glomerul nakon čega ih prepoznaju TLR na membrani apikalne strane epitelnih stanica bubrežnih tubula. Kao posljedica promijenjenog peritubularnog kapilarnog protoka PAMP i DAMP se mogu osloboditi u intersticijski prostor, tj. u blizinu bazolateralne membrane, te izazvati dodatnu, izravnu ozljedu epitelnih stanica bubrežnih tubula. Zbog navedenog mehanizma tzv. dvostrukog udara su epitelne stanice proksimalnih tubula bubrega posebno podložne ozljedi (MANRIQUE-CABALLERO i sur., 2022).

Krvožilni sustav bubrega sastoji se od bubrežnih arterija, mikrovaskulature glomerula i peritubularnih kapilara. Protok krvi kroz bubrege ovisi o minutnom volumenu srca i efektivnom cirkulirajućem volumenu krvi. Kod SA-AKI je protok krvi kroz bubrege očuvan ili čak povećan (MAIDEN i sur., 2016). Kod eksperimentalnih modela velikih životinja protok krvi kroz bubrege je povećan u ranoj fazi sepse (DI GIANTOMASO i sur., 2003; LANGENBERG i sur., 2007). Šest sati nakon postupka podvezivanja i punkcije cekuma (engl. *Cecal Ligation and Puncture*, CLP) protok krvi kroz bubrege se udvostručio, a renovaskularni otpor smanjio (LEISMAN i sur., 2021);

Povećana sinteza citokinima induciranog NO i otpuštanje vazoaktivnih tvari uzrokuju generaliziranu arterijsku vazodilataciju što dovodi do makrohemodinamske nestabilnosti, smanjenog sistemskog vaskularnog otpora i oslabljene perfuzije bubrega (PEERAPORN RATANA i sur., 2019; OLIVEIRA i sur., 2022). Hipoperfuzija bubrega se dugo smatrala primarnim uzrokom akutne ozljede bubrega. Prema novijim istraživanjima SA-AKI se može razviti i uz mikrohemodinamsku nestabilnost (POST i sur., 2017) koja se može odraziti i na glomerul pa dolazi do opadanja glomerularne filtracije.

Glomerularna filtracija je u fiziološkim uvjetima strogo regulirana te održava konstantnu brzinu filtracije pri različitim vrijednostima krvnog tlaka putem usklađenog širenja i stezanja aferentnih i eferentnih arteriola. Tijekom sepse je narušena kontrola glomerularne filtracije. Zbog istovremenog stezanja aferentne i širenja eferentne arteriole smanjuje se hidrostatski tlak u glomerulu, a time i glomerularna filtracija. Stezanje aferentne arteriole dodatno potiče protok kroz ekstraglomerularne kapilare koje potpuno zaobilaze glomerul i doprinose smanjenju glomerularne filtracije (CALZAVACCA i sur., 2015; MARTENSSON i BELLOMO, 2015).

Promjene u međustaničnim vezama u endotelu dovode do povećane mikrovaskularne propusnosti. Oštećenje endotela i gubitak glikokaliksa potiču izlaženje leukocita i adheziju trombocita te aktivaciju koagulacijske kaskade i razvoj mikrotromboze (MOLEMA i sur., 2022). Uz smanjenje brzine protoka krvi i okluziju kapilara može doći do prekida mikrovaskularnog protoka (VERMA i MOLITORIS, 2015; PEERAPORN RATANA i sur., 2019). Zbog neujednačenog protoka krvi u bubregu se mijenja mikrocirkulacija (POST i sur., 2017). Promjene u distribuciji krvi mogu dovesti do razvoja nepravilnih područja ishemije i gubitka autoregulacije što dodatno pojačava ozljedu i funkciju epitelnih stanica bubrežnih tubula (DYSON i sur., 2011; POST i sur., 2017). Do vaskularnog istjecanja mogu dovesti i promjene tzv. fenestracija u endotelu (ESCOBAR i sur., 2015). Lipopolisaharid može uzrokovati povećanje broja i veličine fenestra u endotelu glomerula što je posredovano aktivacijom TNF- α (XU i sur., 2014).

Nekontrolirani upalni odgovor unutar bubrega rezultira raširenom disfunkcijom epitela bubrežnih tubula. U proksimalnim tubulima ne reapsorbira se natrij-klorid (NaCl) pa povišene koncentracije Na⁺ i Cl⁻ dolaze do distalnih tubula i stanice *macula densa*. Aktivira se tubulo-glomerularna povratna sprega i dolazi do opsežne vazokonstrikcije aferentne arteriole i posljedičnog smanjenja glomerularne filtracije (SINGH i OKUSA, 2011). Disfunkcija epitela

očituje se također i prekidom veza između epitelnih stanica bubrežnih tubula što rezultira istjecanjem tubularne tekućine.

Dolazi do promjena u morfologiji stanica proksimalnih tubula, povlačenja tzv. četkaste membrane (engl. *brush border*), nastajanja mjehurića na membrani, izbacivanja staničnih ostataka u lumen tubula. Nastaje tzv. spljošteni epitel koji je histološko obilježje AKI-a. Neke promjene u strukturi stanice se mogu dogoditi i zbog povišene koncentracije unutarstaničnog kalcija (Ca) (WEINBER i sur., 1997; MARTINS i sur., 2020) što utječe na građu aktinskog citoskeleta. Ozljede epitelnih stanica mogu rezultirati slabljenjem adhezije na bazalnu membranu i njihovim gubitkom u lumen tubula. Ostaci epitelnih stanica mogu sprječavati protok tekućine kroz bubrežne tubule pri čemu se u mokraći pojavljuju cilindri (KEIR i KELLUM, 2015). Ozljeda epitelnih stanica bubrežnih tubula kod SA-AKI patohistološki nije ekvivalentna akutnoj tubularnoj nekrozi (MANRIQUE-CABARELLO i sur., 2021). U SA-AKI se rijetko javlja tubularna nekroza jer epitelne stanice bubrežnih tubula ograničavaju signalizacijske puteve apoptoze i nekroze (ROSEN i SAMUEL, 2000).

U početku sepse se u epitelnim stanicama proksimalnih tubula bubrega aktivira prolazna autofagija (LEVENTHAL i sur., 2016). U kasnijoj fazi sepse se autofagija smanjuje što doprinosi disfunkciji epitelnih stanica proksimalnih tubula bubrega i može dovesti do patološkog i funkcionalnog oštećenja bubrega (HSIAO i sur., 2012).

2.4. METABOLIZAM BUBREGA I AKUTNA OZLJEDA BUBREGA

2.4.1. PROKSIMALNI TUBULI BUBREGA

Bubrezi sisavaca uklanjaju otpadne produkte, ali i održavaju i recikliraju važne nutrijente (CRYSOPOULOU i RINSCHEN, 2024). Osnovne filtracijske jedinice bubrega su nefroni koji su sastavljeni od glomerula, proksimalnih i distalnih tubula, i kojih u bubregu psa ima oko 1 milijun. Filtracija tekućine se odvija u glomerulima nakon čega slijedi reapsorpcija otopljenih tvari u tubulima koja sprječava njihov gubitak mokraćom. Najveći dio proksimalnih tubula je smješten u kori bubrega, tj. proksimalni tubuli čine oko 65 % cijelog bubrega i više od 80 % kore bubrega (CLARK i sur., 2019). Osnovne karakteristike epitelnih stanica bubrežnih tubula su velika potrošnja energije i visoki stupanj metaboličke aktivnosti potrebni za kontinuirano

reapsorbiranje hranjivih tvari, kao što su glukoza i aminokiseline (LI i sur., 2021). Tekućina se najvećim dijelom reapsorbira u proksimalnim tubulima, ali i propusnim paracelularnim putem (HALL i DE SEIGNEUX, 2022).

Prijenos otopljenih tvari duž proksimalnih tubula je specifično organiziran što se očituje u razlikama u staničnoj morfologiji. Kod glodavaca, pasa i primata su elektronskom mikroskopijom vidljiva tri segmenta proksimalnih tubula, S1, S2 i S3. U štakora je npr. reapsorpcija filtriranih otopljenih tvari najveća u početnom dijelu proksimalnih tubula (MADDOX i GENNARI, 1987). Isto tako su kod različitih vrsta životinja zastupljenosti transportera, enzima koji metaboliziraju lijekove, npr. citokroma P450, i antioksidativnih obrana, npr. glutaciona, različite u različitim podsegmentima proksimalnih tubula. Segmenti proksimalnih tubula u sepsi međusobno „komuniciraju“ putem izvanstaničnih vezikula egzosoma (OH i KWON, 2021).

S1 segment je početni dio proksimalnih tubula koji sadrži najveću gustoću mitohondrija i najveću količinu NaK-ATPaze. Iz filtrata pomoću transportera s apikalne strane uzima hranjive tvari, tj. laktat, piruvat i aminokiseline. Potencijalni izvor hranjivih tvari su također makromolekule, filtrirani proteini plazme i masne kiseline vezane na albumin koji u stanice S1 segmenta ulaze endocitozom uz posredovanje receptora (NIELSEN i sur., 2016). Zbog toga je segment S1 veoma izložen utjecaju proteinskih toksina, mioglobulinu (GBUREK i sur., 2003) i lakim lancima imunoglobulina (LUCIANI i sur., 2016). Daljnji dijelovi S2 segmenta uzimaju metabolite izravno iz krvotoka preko bazolateralne membrane gdje je velika zastupljenost transportera koji prenose masne kiseline (GRANADOS i sur., 2021). Stanice S2 segmenta su gušće ispunjene peroksisomima (BUGARSKI i sur., 2018). S3 segment je ravni dio proksimalnih tubula koji je smješten u srži bubrega i proteže se do sredine kore bubrega. Prima dotok krvi pretežno iz postglomerularnih kapilara što ga čini osjetljivim na ishemijsko-reperfuzijske ozljede.

Važna zadaća proksimalnih tubula je i izlučivanje otopljenih organskih tvari koje se zbog vezanosti na albumin nisu mogle filtrirati kroz glomerule. Pri tome su aktivni različiti prijenosnici organskih aniona (engl. *Organic Anion Transporter*; OAT) i kationa (engl. *Organic Cation Transporter*; OCT) (WRIGHT i DANTZLER, 2004). Tubularnom sekrecijom se eliminiraju lijekovi, npr. antibiotici, ali i uremijski toksini, npr. indoksil-sulfat, indoksil-acetat, kinurenin, kinureninska kiselina, p-krezil-sulfat, od kojih mnoge stvara crijevni

mikrobiom (WANG i KESTENBAUM, 2018). Poremećaj bubrežne funkcije uzrokuje nakupljanje otopljenih organskih tvari u krvi. Promet mnogih otopljenih tvari, npr. glukoze, aminokiselina, fosfata i bikarbonata, je izravno ili neizravno povezan s prometom Na^+ . U tom procesu sudjeluju i NaK-ATPazni transporter i na bazolateralnoj strani membrane proksimalnih tubula, glavni potrošači ATP-a koji su odgovorni za vektorski transport (CHRISTENSEN i sur., 2012).

Većina spoznaja o metaboličkim promjenama u stanicama proksimalnih tubula tijekom AKI proizašla su iz istraživanja na glodavcima po modelu ishemije-reperfuzije, a u manjoj mjeri po modelu toksičnosti cisplatina. U podlozi AKI-a je najčešće ozljeda proksimalnih tubula koju mogu izazvati ishemija/hipoksija, sepsa, ksenobiotici (lijekovi, teški metali) ili endogeni proteini (mioglobin, laki lanci imunoglobulina). Poznavanje stanične patogeneze u sepsi je ograničeno jer ju je teško modelirati u istraživanjima. Nefrotoksini mogu ući u stanice proksimalnih tubula izravno iz krvi putem bazolateralnih prijenosnika organskih aniona i kationa (WRIGHT i DANTZLER, 2004; LAUNAY-VACHER i sur., 2006).

Metaboličke promjene u tubulima bubrega tijekom AKI-a su povezane s promjenama u homeostazi cijelog tijela, npr. regulaciji glukoze i otopljenih organskih tvari. Gubitak metaboličkih funkcija proksimalnih tubula koje su relevantne za homeostazu cijelog tijela, npr. glukoneogeneze ili tubularne reapsorpcije glukoze, može biti razlog visokog morbiditeta i mortaliteta. Točni poremećaji homeostaze koji dovode do loših ishoda kod AKI-a nisu potpuno razjašnjeni. Proksimalni tubuli mogu metabolizirati širok raspon supstrata u koje ubrajamo ketone, aminokiseline, piruvat, laktat i međuprodukte ciklusa limunske kiseline (WIRTHENSON i GUDER, 1986). Osnovni energetske supstrat proksimalnih tubula nije reapsorbirana glukoza, već masne kiseline jer daju najveći prinos ATP-a (KANG i sur., 2015; GEWIN, 2021). Bubrezi su, osim jetre, glavno mjesto glukoneogeneze koja se odvija uglavnom putem metabolizma laktata u proksimalnim tubulima. U proksimalnim tubulima se odvija također katabolizam proteina plazme, metabolizam arginina, sinteza amonijaka, ciklus ureje, detoksikacija i konjugacija ksenobiotika (HALL i SEIGNEUX, 2022).

Kao što poremećaji u funkciji bubrega remete tjelesnu homeostazu, tako se i promjene u krvi mogu štetno odraziti na bubrege. Istraživanja kore bubrega miševa su pokazala da acidoza izaziva metaboličke promjene u proksimalnim tubulima koje su karakteristične za AKI, tj.

poremećaje mitohondrijskog redoks-stanja, funkcije respiratornog lanca i sadržaja unutarstaničnih lipida (BUGARSKI i sur., 2021).

Mnoga su istraživanja pokazala da se tijekom AKI u epitelnim stanicama bubrežnih tubula odvija autofagija. Na početku AKI-a autofagiju može inducirati opadanje razine aminokiselina u stanicama bubrežnih tubula (ELEFTHERIADIS i sur., 2017). Energetska kriza stanica proksimalnih tubula u AKI pokreće autofagiju vlastitih staničnih organela. Promjene u metabolizmu energije tijekom AKI u epitelnim stanicama bubrežnih tubula imaju složene učinke na autofagiju, ali i autofagija može utjecati na metabolizam. Kod SA-AKI pojačana glikoliza, tj. smanjena oksidativna fosforilacija u epitelnim stanicama bubrežnih tubula inhibira autofagiju (GATTICCHI i sur., 2015).

2.4.1.1. Mitohondriji epitelnih stanica bubrežnih tubula

Glavni izvor energije u aerobnih organizama je oksidativna fosforilacija, proces u kojem nastaje ATP i koja se odvija na unutrašnjoj strani mitohondrija. Budući da su mitohondriji ključni dio metabolizma energije, njihova zastupljenost značajno varira između različitih organa, tkiva i stanica. Bubrezi, koji nakon srčanog mišića sadrže najveću količinu mitohondrija u tijelu, koriste oko 7 % od dnevne tjelesne količine ATP-a pri čemu 95–99 % te energije potječe iz oksidativnog metabolizma. Zbog različitih potreba za energijom različita je gustoća i raspodjela mitohondrija unutar nefrona. Najveća količina mitohondrija se nalazi u stanicama proksimalnih tubula i širokog uzlaznog kraka Henleove petlje koje su uključene u aktivni transport iona.

Približno 70 % ukupne bubrežne potrošnje energije je povezano s procesom reapsorpcije (BHARGAVA i SCHNELLMANN, 2017). Proces izmjene otopljenih tvari zahtijeva neprekidnu opskrbu energijom pa su stanice proksimalnih tubula tijesno ispunjene međusobno povezanim mitohondrijima (EMMA i sur, 2016; LI i SUSZTAK, 2018; SUN i sur., 2019; JIANG i sur., 2020; LI i sur., 2021). Budući da proksimalni tubuli gotovo potpuno ovise o aerobnom metabolizmu, veoma su osjetljivi na ozljede mitohondrija (MARTIN-HERNANDEZ i sur., 2005). Akutni prekid aerobnog disanja uzrokuje fragmentaciju mitohondrijske mreže pa se privremeno smanjuje mitohondrijska biogeneza. Ozljede mitohondrija, kao npr. oticanje, često dovode do razvoja oksidativnog stresa.

ATP je potreban za uspostavljanje ionskih gradijenata pa se u epitelnim stanicama bubrežnih tubula uglavnom odvija energetske učinkovita β -oksidacija masnih kiselina i oksidativna fosforilacija (HARZANDI i sur., 2021). Epitelne stanice bubrežnih tubula putem transportnih proteina apsorbiraju dugolančane masne kiseline koje se oksidiraju unutar mitohondrija. Pritom nastaje acetyl-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline (HOUTEN i sur., 2016) i pokreće se transportni lanac elektrona u kojem nastaje ATP (GAO i CHEN, 2022). Ciklus limunske kiseline i β -oksidacija masnih kiselina odvijaju se u matriksu mitohondrija.

Osim mitohondrija, u održavanju opskrbe energijom važnu ulogu imaju i peroksisomi u kojima se također odvija β -oksidacija masnih kiselina. Obiluju katalazom i drugim enzimima za uklanjanje ROS-a koji nastaju u mitohondrijima. Peroksisomi metaboliziraju dugolančane masne kiseline u kraće lance čime štite epitelne stanice bubrežnih tubula od nakupljanja toksičnih produkata dugolančanih masnih kiselina (CHIBA i sur., 2019). Pojačana oksidacija masnih kiselina u peroksisomima može zaštititi bubrege od akutne ozljede (ZHAO i sur., 2023).

U fiziološkim uvjetima je moguće spajanje zdravih mitohondrija s disfunkcionalnim mitohondrijima radi ublažavanja štete (SUN i sur., 2019). Tijekom SA-AKI taj proces tzv. mitohondrijske fisije i fuzije postaje ugrožen (LIU i sur., 2019). U epitelnim stanicama bubrežnih tubula pogođenih SA-AKI primijećen je porast oštećenja mitohondrijske DNK i smanjenje broja mitohondrija (VAN DER SLIKKE i sur., 2021). Primjena endotoksina u stanicama proksimalnih tubula miševa izaziva oticanje i supresiju mitohondrija (TRAN i sur., 2011). Smanjena masa mitohondrija, fragmentacija i različiti stupnjevi bubrenja mitohondrija kulminiraju smanjenjem oksidativne fosforilacije i sinteze ATP-a (BROOKS i sur., 2009).

Nastajanje ROS-a u SA-AKI izaziva mitofagiju, tj. uklanjanje oštećenih mitohondrija, (HOTCHKISS i sur., 2009) što posljedično može ograničiti oksidativni stres u stanicama (PARIKH i sur., 2015). Međutim, disfunkcija mitohondrija tijekom sepse može ubrzati porast ROS-a što doprinosi nestabilnosti stanice i kasnijoj disfunkciji bubrega (BREALEY i sur., 2002). Prekomjerno aktivirana mitofagija smanjuje broj mitohondrija što može usporiti povratak staničnog metabolizma s glikolize na oksidativnu fosforilaciju i dovesti do slabije funkcije bubrega (HSIAO i sur., 2012). U eksperimentalnom modelu peritonitisa štakora je primjena antioksidansa korisnog za mitohondrije u stanicama bubrežnih tubula dovela do poboljšanja cjelokupne funkcije bubrega (ARULKUMARAN i sur., 2021).

Oštećenje i disfunkcija mitohondrija epitelnih stanica bubrežnih tubula je usko povezana s metaboličkim reprogramiranjem kod SA-AKI. Teške ozljede dovode do prekida u oksidativnoj fosforilaciji i poremećaja u metabolizmu energije (BHARGAVA i SCHNELLMANN, 2017). U SA-AKI metabolizam epitelnih stanica bubrežnih tubula prelazi s oksidativne fosforilacije ovisne o oksidaciji masnih kiselina na glikolizu. Piruvat koji nastaje tijekom glikolize ne ulazi u mitohondrije već se uz djelovanje LDH pretvara u laktat, a sprječava se i pretvorba laktata u acetyl-CoA (DELLEPIANE i sur., 2016). Ovom metaboličkom prilagodbom se zadovoljavaju povećani energetske zahtjevi u sepsi i povezanoj AKI. Također se smanjuje potrošnja lipida pa se mijenja i sadržaj lipida u stanici. Na početku SA-AKI metaboličko reprogramiranje u epitelnim stanicama bubrežnih tubula dovodi do smanjenog korištenja slobodnih masnih kiselina. Istraživanja su pokazala da je u svim vrstama AKI oksidacija masnih kiselina značajno smanjena, prvenstveno zbog smanjenog ulaska srednjelančanih i dugolančanih masnih kiselina u matriks mitohondrija (IDROVO i sur., 2012). Nakupljanje lipida u epitelnim stanicama bubrežnih tubula (JANG i sur., 2020) može dovesti do razvoja glomeruloskleroze i fibroze bubrežnih tubula (GAI i sur., 2019). Posljedica produljene glikolize je prekomjerno stvaranje izvanstaničnog matriksa i prijelaz epitelnih stanica u mezenhimalne.

2.4.2. METABOLIČKO REPROGRAMIRANJE

Pojam metaboličkog reprogramiranja podrazumijeva procese kojima stanice prilagođavaju svoj metabolizam kako bi zadovoljile potrebe za energijom i hranjivim tvarima nastale zbog promjene vanjskih čimbenika (LIU i sur., 2024). Pojavu metaboličkog reprogramiranja je prvi puta zabilježio Otto Warburg proučavajući maligne stanice koje postižu neograničenu proliferaciju i rast (VAUPEL i sur., 2019; HU i sur., 2021). Naime, u tzv. Warburgovom učinku maligne stanice mijenjaju svoj metabolički obrazac iz oksidativne fosforilacije u anaerobnu glikolizu usprkos prisutnosti dovoljne količine kisika. Metaboličko reprogramiranje uključuje i druge promjene metabolizma u stanicama koje zahvaćaju metabolizam glukoze, lipida i aminokiselina (LI i sur., 2021).

Metabolički najzahtjevnije stanice u kori bubrega su epitelne stanice segmenata S1 i S2 proksimalnih tubula koje se energijom opskrbljuju uglavnom putem oksidativne fosforilacije. U ranom metaboličkom odgovoru u stanicama dolazi do poremećaja ciklusa limunske kiseline, slabi oksidativna fosforilacija i s njom povezani metabolički procesi te se aktivira anaerobna

glikoliza (DELLEPIANE i sur., 2016). Početnim zakrivljenim dijelovima proksimalnih tubula nedostaje aerobni kapacitet pa u slučaju poremećaja respiratornog lanca može doći do velikog oštećenja. Iako u procesu oksidativne fosforilacije nastaje više molekula ATP-a po molekuli glukoze (PATRA i HAY, 2014; NISHIMURA i sur., 2019), u glikolizi se ATP brže stvara pa je od većeg značaja za preživljavanje stanica. Zbog toga je glikoliza dominantan metabolički put kad se organizam prilagođava novonastalim uvjetima, kao npr. u teškim infekcijama (O'NEILL i sur., 2016).

U podlozi AKI-a je najčešće ozljeda proksimalnih tubula koju mogu izazvati ishemija/hipoksija, sepsa, ksenobiotici (lijekovi, teški metali) ili endogeni proteini (mioglobin, laki lanci imunoglobulina). Nefrotoksini mogu ući u stanice proksimalnih tubula izravno iz krvi putem bazolateralnih prijenosnika organskih aniona i kationa (WRIGHT i DANTZLER, 2004; LAUNAY-VACHER i sur., 2006). Metaboličke promjene u tubulima bubrega tijekom AKI-a su povezane s promjenama u homeostazi cijelog tijela, npr. regulaciji glukoze i otopljenih organskih tvari. Metaboličko reprogramiranje koje se događa u imunom sustavu organizma domaćina (imunometabolizam) zahvaća makrofage, neutrofile, dendritične stanice i T-limfocite (O'NEILL i sur., 2016).

Sepsu je teško modelirati u istraživanjima pa je poznavanje patogeneze stanica u sepsi ograničeno. Dosadašnje spoznaje o metaboličkom reprogramiranju za vrijeme SA-AKI se temelje uglavnom na istraživanjima na životinjama (LIU i sur., 2024) te su uglavnom proizašle iz istraživanja na glodavcima po modelu ishemije-reperfuzije, a u manjoj mjeri po modelu toksičnosti cisplatina. Sepsa pokreće metaboličko reprogramiranje u gotovo svim vrstama stanica (EVERTS i sur., 2014; SOTO-HEREDERO i sur., 2020; LIU i sur., 2024). U ranoj fazi sepse metabolizam epitelnih stanica bubrežnih tubula također prelazi s oksidativne fosforilacije na aerobnu glikolizu (GÓMEZ i sur., 2017) zajedno s aktivacijom pentozna-fosfatnog puta. Pritom se smanjuje nastajanje ROS-a i osigurava brza sinteza ATP za rano uklanjanje patogena te preživljavanje stanica unatoč ograničavanju nekih specijaliziranih funkcija bubrega (JIN i ZHOU, 2019). Produljena glikoliza oštećuje stanice pa povratak metabolizma na oksidativnu fosforilaciju postaje imperativ. Potiču se protuupalne reakcije i oksidativna fosforilacija koja omogućuje obnovu staničnih funkcija. Na povratak staničnog metabolizma na oksidativnu fosforilaciju je ukazalo i istraživanje modela mišje sepse gdje je 24 sata poslije drastičnog pada došlo do normalizacije renalne tubularne potrošnje kisika (HAN i sur., 2015).

2.4.2.1. Metabolizam glukoze

Kod aerobnih organizama glikoliza je uvod u ciklus limunske kiseline i povezani lanac prijenosa elektrona. Veza glikolize i ciklusa limunske kiseline je piruvat koji se u aerobnim uvjetima oksidira u mitohondrijima. U anaerobnim uvjetima, kad brzina glikolize postane veća od brzine ciklusa limunske kiseline i respiracijskog lanca, piruvat prelazi u laktat. Ciklus limunske kiseline je zajednički metabolički put oksidacije ugljikohidrata, aminokiselina i masnih kiselina koji osigurava međuprodukte za procese biosinteze u organizmu. Većina molekula ulazi u ciklus kao acetyl-CoA koji nastaje iz piruvata u mitohondrijima u aerobnim uvjetima. Oksidativna fosforilacija je visoko učinkoviti put proizvodnje energije i zadani metabolički obrazac većine vrsta stanica, posebno stanica čije funkcije trebaju mnogo energije, npr. stanica miokarda, skeletnih mišićnih stanica i epitelnih stanica proksimalnih tubula bubrega (LIU i sur., 2024).

Glukoneogeneza je sinteza glukoze iz neugljikohidratnih izvora, laktata, piruvata, glukogenih aminokiselina, propionata i glicerola, pod regulacijom inzulina. Glukoneogeneza se zbiva u jetri, kori bubrega i vrlo maloj mjeri u mozgu, skeletnim mišićima i u srčanom mišiću. Proksimalni tubuli bubrega u fiziološkim uvjetima imaju veći kapacitet za izvođenje glukoneogeneze nego glikolize. Glukoneogeneza i glikoliza podliježu recipročnoj regulaciji, tj. kad je jedan od ovih puteva gotovo neaktivan, drugi je vrlo aktivan. Glukoza koja je produkt glukoneogeneze u stanicama proksimalnih tubula je izvor energije za „nizvodne“ segmente tubula (MEYER i sur., 2002). U uvjetima gladovanja je količina glukoze koja nastaje glukoneogenezom u bubrezima veća nego što je potrebno segmentima bubrega.

Akutna ozljeda bubrega je često praćena oslabljenim inzulinskim odgovorom. Poboľjšani odgovor na inzulin može regulirati glukoneogenezu i popraviti funkciju bubrega u AKI (ZHAO i sur., 2023). Smanjena glukoneogeneza ima za rezultat povišen laktat što je kod AKI i CKD povezano s lošom prognozom (LEGOUIS i sur., 2020; VERISSIMO i sur., 2022). U patološkim uvjetima bolji izvor energije za stanice proksimalnih tubula postaju glikoliza i put pentoza-fosfata, dok se glukoneogeneza odvija u manjoj mjeri (CHRYSOPOULOU i RINSCHEN, 2024).

Ključni mehanizam za uspostavu stećenog imuniteta tijekom rane faze AKI uzrokovane lipopolisaharidom je metaboličko reprogramiranje usmjereno ka glikolizi (CHENG i sur., 2014). Metaboličko reprogramiranje se kod SA-AKI odvija dvosmjerno između oksidativne

fosforilacije i glikolize što je vjerojatno povezano s regulacijom odgovora domaćina na upalu (KUWABARA i sur., 2022). U metabolomskom istraživanju su 8 sati nakon postupka CLP-a u epitelnim stanicama bubrežnih tubula bili povišeni međuprodukti glikolize, a sniženi međuprodukti ciklusa limunske kiseline (WALTZ i sur., 2016). Laktat, krajnji produkt glikolize, kod SA-AKI postaje signalna molekula i pomaže u očuvanju imunološke homeostaze. Preaktivna glikoliza uz povišenu koncentraciju laktata može dovesti do supresije imuniteta i poremećaja imunološke ravnoteže. Ograničavanje glikolize može također smanjiti upalni odgovor (GAUTHIER i CHEN, 2022).

Ulaskom u citosol stanice glukoza se fosforilira u glukoza-6-fosfat čijom dehidrogenacijom započinje put pentoza-fosfata u kojem nastaju NADPH i aldoza (riboza-5-fosfat). Kad stanice trebaju više NADPH (za reduktivnu biosintezu), riboza-5-fosfat se prevodi u piruvat. Zajedničko djelovanje glikolize i puta pentoza-fosfata omogućuje podešavanje potrebama stanice. U AKI-u je pojačan put pentoza-fosfata čime se održava redoks-homeostaza i smanjuje oksidativno oštećenje. U AKI-u endotoksin aktivira posebno važan put pentoza-fosfata budući da se razine laktata i piruvata ne mijenjaju (SMITH i sur., 2014). Egzogen primjena piruvata može povećati sadržaj glukoze u kori bubrega kod AKI, ali ne i u zdravih bubrega (ZAGER i sur., 2014). Rezultati sugeriraju da su u AKI pojačani i glikoliza i put pentoza-fosfata (ZHAO i sur., 2023). Metabolomska istraživanja AKI i CKD također ukazuju na aktivaciju puta pentoza-fosfata (LAN i sur., 2016; HARZANDI i sur., 2021). Kod AKI miša inducirane lipopolisaharidom je izrazito pojačana aktivnost heksokinaze, enzima ključnog za glikolizu. Porast heksokinaze olakšava aktiviranje pentoza-fosfatnog puta koji je bitan za održavanje glutaciona u reduciranom stanju i održavanje mehanizama antioksidativne obrane bubrega (SMITH i sur., 2014).

Suvišak glukoze može se također metabolizirati u poliole u tzv. poliolnom putu. Pritom se glukoza reducira u sorbitol iz kojeg može nastati fruktoza. U fiziološkim uvjetima u proksimalnim tubulima gotovo nema aktivnosti aldoza-reduktaze (LANASPA i sur., 2014) koja se u AKI unutar 24 sata može značajno pojačati što se očituje povišenim razinama fruktoze u mokraći (ANDRES-HERNANDO i sur., 2017). Istraživanja pokazuju da inhibicija poliolnog puta i glikolize uz promicanje pentoza-fosfatnog puta imaju zaštitni učinak na bubrege pogođene akutnom ozljedom.

U fiziološkim uvjetima S1 stanice imaju visoku glukoneogenu aktivnost što bi moglo biti posljedica prilagodbe glomerularnom filtratu koji obiluje ugljikovim spojevima (YAMADA i sur., 1986). U S2 segmentu je glukoza važna za održavanje redoks-ravnoteže putem pentoza-fosfatnog puta. Tijekom AKI-a dolazi do dramatične promjene funkcije glukoneogeneze (HALL i SEIGNEUX, 2022). Epitelne stanice segmenta S3 proksimalnih tubula u vanjskoj srži bubrega imaju veći kapacitet za glikolizu (ISAKA i sur., 2011). Stanice bubrega kao što su podociti, endotelne i mezangijske stanice dobivaju energiju uglavnom iz glikolize.

2.4.2.2. Metabolizam lipida

Masne kiseline služe kao metaboličko gorivo i sastavni su dio fosfolipida i glikolipida. Uskladištuju se u obliku triglicerida u masnome tkivu iz kojeg se mobiliziraju djelovanjem lipaza koje su pod hormonalnom kontrolom. Većina lipida u proksimalne tubule ulazi s bazolateralne strane (BOBULESCU, 2010) uz posredovanje CD 36 (engl. *Cluster of Differentiation 36*) ili FABP (engl. *Fatty Acid Binding Protein*, FABP). Veći dio slobodnih masnih kiselina bubrezi uzimaju iz arterijske krvi. Masne kiseline reapsorbirane iz proksimalnih tubula se uglavnom vraćaju u cirkulaciju. Masne kiseline, posebno kratkolančane, ulaze u epitelne stanice bubrežnih tubula uz pomoć apikalnih transportera. Manji dio masnih kiselina se esterificira u acilgliceride, prolazi β -oksidaciju ili sudjeluje kao supstrat u ciklusu limunske kiseline.

Prema istraživanjima proksimalni tubuli bubrega kao supstrat koriste gotovo isključivo slobodne masne kiseline. β -oksidacija masnih kiselina se odvija u mitohondrijima i u peroksisomima. Masne kiseline se aktiviraju u acil-CoA na vanjskoj membrani mitohondrija, a oksidiraju u matriksu mitohondrija. Za prolaz aktiviranih dugolančanih acil-CoA kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu služi karnitin. Citrat prenosi acetil-CoA za sintezu masnih kiselina iz mitohondrija u citosol. Sinteza masnih kiselina započinje u citosolu karboksilacijom acetil-CoA u malonil-CoA uz ATP. U životinjskom organizmu nema razvijenih enzimskih puteva za pretvaranje masnih kiselina u glukozu, tj. acetil-CoA se ne može pretvoriti u piruvat ili u oksaloacetat. Prema drugim istraživanjima slobodne masne kiseline su preferirani supstrat za ciklus limunske kiseline više u srži nego u kori bubrega (WANG i sur., 2022). Pretpostavlja se da je laktat izvor energije u segmentima proksimalnih tubula bubrega, jednako kao i slobodne masne kiseline. Zajedno sa slobodnim masnim kiselinama ketonska

tijela se mogu izravno natjecati za β -oksidaciju, posebno u uvjetima manjka kisika. Ketonska tijela, kao npr. acetoacetat, β -hidroksibutirat i aceton, mogu poslužiti kao izvori energije u proksimalnim tubulima.

Kod AKI promjene u metabolizmu lipida obuhvaćaju smanjenu β -oksidaciju slobodnih masnih kiselina, ali i promjene u metabolizmu lipida i triglicerida stanične membrane. Nedostatak enzima β -oksidacije u proksimalnim tubulima izravno dovodi do razvoja bolesti bubrega (KANG i sur., 2015). Pritom epitelne stanice bubrežnih tubula manje koriste masne kiseline pa u njima dolazi do značajnog nakupljanja masnih kiselina i triglicerida. Vrlo visoke koncentracije slobodnih masnih kiselina u stanici su toksične, tj. lipotoksične. Na staničnom nivou disfunkcija proksimalnih tubula će se prije razviti s povišenim zasićenim, nego nezasićenim masnim kiselinama (YAMAMOTO i sur., 2021). Kod ishemijske, toksične, opstruktivne ili imunološki uzrokovane ozljede bubrega u proksimalnim tubulima bubrega nakon 18–24 h značajno rastu razine slobodnog kolesterola, estera kolesterola i triglicerida (ZAGER i sur., 1999). Nakupljeni trigliceridi i kolesterol mogu u stanicama proksimalnih tubula bubrega izazvati autofagiju, ali pretjerano nakupljanje može zaustaviti autofagiju. Skladištenje slobodnih lipida u kapljice lipida može spriječiti štetne učinke peroksidacije lipida i ozljede mitohondrijske membrane.

2.4.2.3. Metabolizam aminokiselina

Za razliku od masnih kiselina i glukoze, višak aminokiselina se ne može skladištiti, već se upotrebljava kao metaboličko gorivo. α -Amino-skupine se odstranjuju i većina njih prelazi u α -ketoglutarat dajući glutamat iz kojeg nastaju amonij-ion (NH_4^+) i α -ketoglutarat. U kopnenih kralježnjaka dio NH_4^+ se koristi u biosintezi dušikovih spojeva, a višak se pretvara u ureju u ciklusu ureje. α -Ketoglutarat je ulazno mjesto glutamata i ugljikovih atoma glukogenih aminokiselina koje se mogu prevesti u glutamat - glutamina, histidina, prolina, arginina. Osnovni supstrat proksimalnih tubula bubrega je glutamin jer iz njega nastaje amonijak, glavni ekvivalent za sekreciju suvišnih protona (CURTHOYS i MOE, 2014). U fiziološkim uvjetima bubreg koristi malu količinu glutamina, ali kod metaboličke acidoze preuzima i metabolizira oko 1/3 glutamina iz plazme (ZHAO i sur., 2022). Istraživanja procjenjuju da oko 20 % fiziološke aktivnosti ciklusa limunske kiseline potječe od puta glutamina (HUI i sur., 2020). Ugljikove okosnice aminokiselina se pretvaraju u acetil-CoA, acetoacetyl-CoA, piruvat

ili u neke međuprodukte ciklusa limunske kiseline. Na taj način iz aminokiselina nastaju masne kiseline, ketonska tijela i glukoza. Većina aminokiselina je isključivo glukogena. Alanin, serin, cistein, glicin i treonin se razgrađuju u piruvat. Asparagin i aspartat se prevode u oksaloacetat. Sukcetil-CoA je ulazno mjesto za dio ugljikovih atoma metionina i valina te izoleucina i treonina. Leucin i lizin su ketogene kiseline, tj. njihovom razgradnjom nastaje acetoacetat. Razgradnjom aromatskih prstenova tirozina i fenilalanina se neki ugljikovi atomi prevode u fumarat, dok se drugi pojavljuju kao acetoacetat. Citokini pojačavaju metabolizam arginina što dovodi do pojačane sinteze ureje, kreatina i prolina.

Promjene u metabolizmu energije tijekom AKI se odražavaju na metabolizam aminokiselina, npr. glutamina, arginina, triptofana i aminokiselina razgranatog lanca. Na početku AKI-a razine aminokiselina u epitelnim stanicama bubrežnih tubula značajno opadaju. Aminokiseline razgranatog lanca ne doprinose metabolizmu energije (ciklusu limunske kiseline) u fiziološkim uvjetima već daju značajan doprinos u ketogenim uvjetima (HUI i sur., 2020). Kod AKI u epitelnim stanicama bubrežnih tubula dolazi do veće razgradnje u putu kinurenina (KRUPA i sur., 2022). Čak 95 % triptofana se metabolizira u putu kinurenina u kojem su ključni enzimi indoleamin-2,3-dioksigenaza te triptofan-2,3-dioksigenaza koja je aktivna uglavnom u fiziološkim uvjetima.

2.4.2.4. Metabolizam nukleotida

Akutna ozljeda bubrega pokreće promjene u metabolizmu nukleotida u epitelnim stanicama bubrežnih tubula. U ishemijskim i upalnim stanjima iz ATP-a nastaje adenozin za koji se pokazalo da ima zaštitni učinak na stanice (MODIS i sur., 2009). U AKI su također značajno povišeni produkti razgradnje purina (KOSAKI i sur., 2022).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Piometra je upalna bolest maternice spolno zrelih kuja koja je uzrokovana sekundarnom bakterijskom infekcijom. Bolest karakterizira nakupljanje gnoja u maternici s nizom mogućih komplikacija. Jedno od najvažnijih komplikacija je akutna ozljeda bubrega koja se zbog nedovoljno osjetljivih konvencionalnih bubrežnih pokazatelja često ne otkrije na vrijeme pa može doći do uginuća životinje. Razvoj infekcije maternice uzrokuje endotoksemiju koja naposljetku dovodi do sindroma sistemskog upalnog odgovora (SIRS). Sindrom je karakteriziran teškom infekcijom i upalnim odgovorom koji dovodi do stvaranja i otpuštanja upalnih medijatora koji utječu na cijeli organizam. Razvoj ovih promjena može dovesti do zatajenja bubrega. Stoga bi otkrivanje novih osjetljivih biomarkera omogućilo rano prepoznavanje akutne ozljede bubrega i sprečavanje ireverzibilnih promjena u funkciji bubrega.

Temeljem navedenog hipoteza istraživanja je:

- Tijekom piometre kuja s razvojem akutne ozljede bubrega dolazi do promjene u metabolomu seruma i mokraće oboljelih kuja.
- U kuja oboljelih od piometre postoje razlike u metabolomu seruma i mokraće između različitih stupnjeva akutne ozljede bubrega.

Iz hipoteze proizlaze sljedeći ciljevi istraživanja:

- Istražiti povezanost različitih stupnjeva funkcije bubrega i metaboloma seruma i mokraće u kuja oboljelih od piometre.
- Usporediti metabolome seruma i mokraće klinički zdravih kuja s metabolomima seruma i mokraće kuja oboljelih od piometre primjenom neciljane metabolomske analize.
- Otkriti nove biomarkere s potencijalnim dijagnostičkim i/ili prognostičkim značajem za poremećaje u funkciji bubrega.
- Analizirati promjene mreža metabolita tijekom akutne ozljede bubrega u kuja oboljelih od piometre.
- Analizirati biološke puteve uključene u molekularna zbivanja tijekom piometre kuja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. ISTRAŽIVANE SKUPINE KUJA

Istraživanje je uključilo klinički zdrave kuje i kuje spontano oboljele od piometre. Obje skupine čine kuje različite dobi i različitih pasmina. Kuje su klinički pregledane i zaprimljene na Kliniku za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zdravlje kuja je procijenjeno prema kliničkom statusu i pretragama kompletne krvne slike, biokemijskim parametrima seruma, analizi mokraće te uspoređeno s referentnim vrijednostima. Klinički pregled je uključio mjerenje temperature, bila i disanja, auskultaciju pluća i srca, pregled vidljivih sluznica, limfnih čvorova i palpaciju abdomena te neurološki pregled prilikom prijema. Uzorci krvi i mokraće su bili prikupljeni tijekom operacije kastracije, odnosno ovariohisterektomije kuja. Krv za rutinske hematološke i biokemijske pretrage te metabolomsko istraživanje je uzorkovana iz cefalične vene (*v. cephalica antebrachii*), a mokraća je bila uzeta cistocentezom. Uzorci za istraživanje su puna krv izvađena u epruvetu s EDTA antikoagulansom, serum pune krvi izvađene u epruvetu bez antikoagulansa i mokraća uzeta u sterilnu brizgalicu bez dodataka.

a) Kontrolna skupina kuja

Kontrolnu skupinu čine klinički zdrave kuje (N=18), od šest mjeseci do četiri godine starosti, koje su bile podvrgnute elektivnom zahvatu laparoskopske kastracije na Klinici za porodništvo i reprodukciju. Uzorci su se prikupljali između 8 sati i 16 sati te su kuje bile natašte. Dio uzorka mokraće je unutar jednog sata nakon uzorkovanja bio upućen na opću bakteriološku pretragu (urinokulturu).

b) Skupina kuja oboljelih od piometre

Skupinu oboljelih kuja čine kuje spontano oboljelih od piometre (N=19), od tri godine do trinaest godina starosti, koje su bile podvrgnute zahvatu ovariohisterektomije zbog dijagnoze piometre. Postavljanje dijagnoze piometre je provedeno kliničkim pregledom i ultrazvučnom pretragom abdomena pri čemu je nalaz proširenog roga/rogova maternice ispunjenog anehogenim sadržajem bio pozitivan nalaz piometre. Vrijeme prikupljanja uzoraka je ovisilo o hitnosti zdravstvenog stanja (od 0-24 sata). Vrijednosti rutinskih pretraga kompletne krvne

slike, biokemijskih pretraga i mokraće ukazuju na upalu (povišeni ukupni leukociti i/ili nesegmentirani neutrofili, povišena koncentracija CRP-a u serumu). Na opću bakteriološku pretragu su u unutar jednog sata nakon uzorkovanja bili upućeni uzorak mokraće radi urinokulture i obrisak maternice radi utvrđivanja bakterijskog uzročnika piometre. Uzorci tkiva maternice nekoliko kuja s piometrom su upućene na patohistološku dijagnostiku radi dodatne potvrde dijagnoze piometre.

Kompletne krvne slike obje skupine kuja su napravljene na automatskom hematološkom analizatoru (Horiba ABX, Diagnostics, Montpellier, Francuska). Razmasci krvi su obojani May-Grünwald-Giemsa metodom i diferencirani mikroskopskim pregledom uz pomoć imerzije. Za pretrage u serumu krv se nakon vađenja zgrušala na sobnoj temperaturi tijekom 10-30 min i centrifugirala 10 min na 3500 okr/min na temperaturi od 18°C. Izdvojeni serum se nakon biokemijskih pretraga alikvotirao i pohranio na -80°C do metabolomskog istraživanja.

Biokemijske pretrage u serumu i supernatantu mokraće mjerene su na automatskom analizatoru Abbott Architect 4000c standardnim preporučenim metodama pomoću komercijalnih Abbott (*Abbott Ireland Diagnostics Division Lisnamuck, Irska*) i Gentian (*Gentian, Norveška*) reagenasa.

Rutinske pretrage mokraće provedene su semikvantitativno test-trakicom (Multistix 10SG, Siemens) na automatiziranom analizatoru mokraće (Clinitek Status, Bayer). Mokraća je analizirana odmah nakon uzorkovanja ili tijekom jednog sata (pohranjena na temperaturi od +4 °C) te potom centrifugirana 5 min na 400g na temperaturi +4 °C. Nakon izdvajanja supernatanta mikroskopski je pregledan nativni sediment mokraće (povećanje x640). Specifična težina mokraće (engl. *Urine Specific Gravity*, USG) je mjerena ručno na refraktometra (Reichert Inc., NY 14043, SAD) u supernatantu mokraće. Uzorci supernatanta mokraće su zatim alikvotirani i pohranjeni na -80 °C do biokemijskih i metabolomskih mjerenja. Uzorcima supernatanta mokraće mjerena je osmolalnost krioskopskom metodom na osmometru OSMOMAT 030-d GONOTEC.

4.2. MJERNI INSTRUMENTI I REAGENSI

a) Mjerni instrumenti

Istraživanje piometre kuja je provedeno na sljedećim mjernim instrumentima:

- biokemijski analizator Abbott Architect 4000c
- hematološki analizator Horiba ABX (*Diagnostics, Montpellier, Francuska*),
- analizator mokraće (Clinitek Status, Bayer)
- osmometar OSMOMAT 030-d (Gonotec)
- kolona BPX-5 (duljina 30 m, unutarnji promjer kapilare 0,25 mm, debljina filma 0,25 μm , *SGE, Austin, TX, SAD*),
- kolona ZIC-pHILIC (duljina 150 mm, unutarnji promjer kapilare 4,6 m, veličina čestice 5 μm , *Merck Sequant, Darmstadt, Njemačka*),
- tekućinski kromatograf Dionex Ultimate 3000 UHPLC (*Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, Ujedinjeno Kraljevstvo*) spregnut sa spektrometrom masa Thermo Scientific™ Q Exactive Plus (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka*)

b) Reagensi

U metabolomskom istraživanju piometre kuja su korištene sljedeće otopine i potrošni materijal:

- acetonitril (*Honeywell, Charlotte, NC, SAD*),
- amonijev acetat (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*),
- amonijev karbonat (*Honeywell, Charlotte, NC, SAD*),
- etanol (*Honeywell, Charlotte, SAD*),
- fenilizotiocijanat (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*),
- fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*),
- izopropanol (*Honeywell, Charlotte, NC, SAD*),
- kloroform (*Honeywell, Charlotte, NC, SAD*),
- metanol (*Honeywell, Charlotte, NC, SAD*),
- metoksiamin-hidroklorid (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*),
- mravlja kiselina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD*),
- *N*-metil-*N*-trimetilsilitrifluoracetamid (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, SAD*),

- voda (*Merck, Darmstadt, Njemačka*),
- 148 referentnih spojeva (*Glasgow Polyomics, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Ujedinjeno Kraljevstvo*),
- uzorci za kontrolu kvalitete (metaboliti ekstrahirani iz uzoraka piva i ljudske mokraće, *Glasgow Polyomics, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Ujedinjeno Kraljevstvo*).

4.3. ANALIZA METABOLITA NECILJANOM METABOLOMSKOM METODOM

Uzorci mokraće su analizirani neciljanom hidrofilnom interakcijskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (HILIC-MS).

Ekstrakcija metabolita iz uzoraka seruma se provela na isti način kao i iz uzoraka mokraće. Priprava uzoraka seruma i mokraće kuja za metabolomsku analizu uključivala je taloženje proteina, centrifugiranje te odvajanje i filtraciju supernatanta. Metaboliti su ekstrahirani u otapalu za ekstrakciju metabolita koje se sastojalo od smjese kloroform:metanol:voda, ψ ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 1:3:1$). Kontrolni uzorak je bio skupni uzorak (*pool*), smjesa pripravljena od po 10 μL uzorka seruma, odnosno mokraće, svake kuje uključene u istraživanje. Kao kontrolni uzorci služili su i tzv. slijepi uzorci koji su sadržavali samo ekstrakcijsko otapalo. U 25 μL svakog uzorka seruma, mokraće, skupnog i slijepog uzorka dodano je 1000 μL ohlađenog ekstrakcijskog otapala i izmiješano na *Vortex* miješalici 5 minuta na temperaturi od $+4^\circ\text{C}$. Svi su uzorci centrifugirani 5 minuta na 13000 g na temperaturi od $+4^\circ\text{C}$. Metaboliti su odijeljeni primjenom hidrofilne interakcijske tekućinske kromatografije (HILIC) uz ZIC-pHILIC kolonu na temperaturi od $+25^\circ\text{C}$. Metaboliti su se odjeljivali linearnim gradijentnim eluiranjem uz temperaturu kolone $+30^\circ\text{C}$. Pokretna faza A bio je 20 mmol/L amonijev karbonat, a pokretna faza B bila je 100 % otopina acetonitrila. Protok pokretne faze bio je 0,3 mL/min, a ukupno vrijeme analize bilo je 17 min. Uzorci su bili eluirani uz linearni gradijent (A: 20 mM amonij-karbonat u vodi; B: 100 % acetonitril) od 80 % A i 20 % B prema 95 % A i 5 % B. Po 10 μL svakog uzorka injektiralo se na kolonu, a uzorci su tijekom analize održavani na temperaturi od $+5^\circ\text{C}$ u sustavu za injektiranje automatskog uzorkivača. Svaki uzorak je injektiran randomiziranim redoslijedom, a poslije svaka četiri uzorka injektiran je skupni uzorak. Spektrometar masa snimao je cjelokupne spektre mase (engl. *full scan*) uz primjenu ionizacije elektroraspršenjem u pozitivnom i negativnom načinu rada (engl. *polarity switching*).

Analize su provedene u rasponu omjera mase i naboja (m/z) od 70 do 1050 uz rezoluciju mase 70000. Postavke masenog spektrometra bile su sljedeće: napon izvora +3,8 kV za pozitivan, odnosno -3,8 kV za negativan način rada. Protok plina za nebulizaciju u pozitivnom i negativnom načinu rada bio je 40 A.U. (engl. *Arbitrary Units*, relativne jedinice), a pomoćnog plina za desolvataciju i elektroraspršenje bio je 5 A.U. Upotrijebljeni plin je bio dušik visoke čistoće. U oba načina rada, pozitivnom i negativnom, temperatura kapilare za prijenos iona bila je 320°C.

4.4. OBRADA PODATAKA

4.4.1. OBRADA REZULTATA OPĆIH LABORATORIJSKIH PRETRAGA

Uspoređivanje pokazatelja kompletne krvne slike, biokemijskih pokazatelja i fizikalno-kemijskih pokazatelja u mokraći je između zdravih kuja i kuja s piometrom provedeno primjenom statističkog softvera *MedCalc*. Ovisno o normalnosti raspodjele podataka razlike između dviju skupina su utvrđene Studentovim *t*-testom, odnosno Mann-Whitney testom, a razlike između tri skupine su utvrđene ANOVA analizom, odnosno Kruskal-Wallis testom. Promjena je smatrana statistički značajnom uz parametra $p < 0,05$.

4.4.2. OBRADA REZULTATA METABOLOMSKIH ANALIZA

Rezultati analize na spektrometru masa su prikazani kao pozitivni i negativni način rada, pri čemu su kombinirani podatci prikazani kao tablica intenziteta pikova dobivena bioinformatičkom obradom. Neobrađeni podatci dobiveni za svaki uzorak analizirani su primjenom MSconvert (ProteoWizard Software Foundation, San Diego, CA) i softvera za bioinformatičku obradu podataka kreiranim u laboratoriju Glasgow Polyomics (Polyomics integrated Metabolomics Pipeline, PiMP) koji je dostupan na stranici www.polyomics.mvls.gla.ac.uk uz upotrebu standardiziranih protokola. Kako bi se mogli bioinformatički obraditi u softveru PiMP, tzv. sirovi podatci su se konvertirali iz formata Thermo Scientific 'RAW' u format 'mzXML'. Identifikacija metabolita provedena je pomoću PiMP-a uspoređivanjem točne molekulske mase i vremena zadržavanja detektiranih analita s autentičnim standardnim analitima. Pretraživala se vlastita baza podataka kreirana prema 148 referentnih spojeva (*Glasgow Polyomics, College of Medical, Veterinary and Life Sciences*,

University of Glasgow, United Kingdom) koji su aplicirani na početku i na kraju mjerenja. Metaboliti označeni kao *annotated* se sa spojevima u bazi podataka podudaraju samo prema molekulskoj masi unutar softvera PiMP. Metaboliti su identificirani i prema Bazi podataka o metabolomu čovjeka (engl. *The Human Metabolome Database*, HMDB) i/ili zbirci baza podataka koje se bave genomima, biološkim putevima, bolestima, lijekovima i kemijskim tvarima (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG).

Statistička analiza metabolomskih podataka provedena je pomoću *online* statističkog alata za obradu metabolomskih podataka *MetaboAnalyst 6.0* pomoću univarijatnog i multivarijatnog statističkog pristupa (CHONG i sur., 2019). Metode univarijatne analize preliminarno izdvajaju varijable koje su potencijalno značajne u razlikovanju skupina. Pritom procjenjuju statističku značajnost intenziteta svakog pojedinog pika, odnosno metabolita. Multivarijatne metode uzimaju u obzir međusobni utjecaj intenziteta većeg broja statistički značajnih pikova, odnosno metabolita.

Prije statističke analize podataka je izvršena provjera cjelovitosti podataka. Prema uobičajenom postupku koji omogućuje program *MetaboAnalyst* vrijednosti koje nedostaju, odgovaraju nuli ili su negativne zamijenjene su s 1/5 najmanje pozitivne vrijednosti koja je izračunata za određenu varijablu. Kod statističke obrade podataka koji se odnose na mokraću vrijednosti koje nedostaju su zamijenjene najmanjom pozitivnom vrijednosti koja je izračunata za određenu varijablu. Radi dobivanja točnih rezultata proveden je postupak normalizacije koji ispravlja heteroskedastičnost, smanjuje asimetriju podataka i tzv. efekte maske. Normalizacija s obzirom na uzorak omogućuje prilagođavanje razlika između uzoraka pa su podatci koji se odnose na uzorke mokraćne normalizirani pomoću osmolalnosti mokraćne. Normalizacija s obzirom na intenzitet pikova je izvršena logaritmiranjem i auto-skaliranjem podataka.

Cilj statističke analize metabolomskih podataka je otkriti pikove, odnosno metabolite, čiji se relativni intenziteti značajno razlikuju između dviju ili više skupina. Za uspoređivanje dviju skupina primijenjene su univarijatne metode *fold change* (FC) analiza, Studentov *t*-test i *volcano plot* koji je njihova kombinacija. *Fold change* analiza utvrđuje koliko je puta apsolutna vrijednost aritmetičkih sredina dviju skupina veća ili manja. Pritom se utvrđuju omjeri izvornih vrijednosti intenziteta pikova. Rezultati Studentovog *t*-testa su izraženi kao Vrijednosti *p* transformirane uz $-\log_{10}$. Za univarijatnu analizu tri skupine primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *One-way Analysis of Variance*; ANOVA). Budući da ANOVA utvrđuje

ukupnu značajnost usporedbe, primijenjena je i tzv. *post-hoc* analiza koja utvrđuje značajnost promjene pojedinačnih varijabli, tj. Fisherova LSD metoda (engl. *Fisher's least significant difference method*; Fisherov LSD). Osim parametra statističke značajnosti $p < 0,05$ primijenjena je i sistemska korekcija uz tzv. mjeru lažno otkrivenih rezultata (engl. *False Discovery Rate*, FDR) $< 0,05$.

Od multivarijatnih metoda je primijenjena analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) i djelomična diskriminantna analiza najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least-Squares Discriminant Analysis*, PLS-DA). Analiza PCA identificira maksimalnu varijancu u skupu podataka pri čemu se dimenzionalnost podataka prikazuje kao skup ortogonalnih osi nazvanih glavne komponente. PLS-DA metoda koristi multivarijatni regresijski pristup u predviđanju pripadnosti skupini. Za identifikaciju važnih metabolita određuje se redoslijed važnosti metabolita u razlikovanju skupina, tzv. projekcija važnosti varijable (engl. *Variable Importance In Projection*; VIP). Što je vrijednost VIP veća, to je kapacitet metabolita za razlikovanje skupina veći. Značajnima se smatraju metaboliti s vrijednošću $VIP > 1$, dok su metaboliti $VIP > 2$ visoko značajni.

Od statističkih metoda primijenjena je analiza grupiranja (engl. *cluster*). Hijerarhijsko grupiranje pomoću tzv. toplinske karte (engl. *heatmap*) je omogućilo bolju vizualizaciju grupa podataka i brže identificiranje uzoraka ili pikova čiji su intenziteti neuobičajeno visoki ili niski. U hijerarhijskom grupiranju je primijenjena euklidska udaljenost kao mjera sličnosti i Wardovo povezivanje kao algoritam grupiranja.

Analize metaboličkih puteva (engl. *pathway analysis*) i metode obogaćivanja (engl. *enrichment analysis*) provedene su na temelju identificiranih, statistički značajno promijenjenih metabolita. U metodi obogaćivanja je korišten hipergeometrijski test, za analizu topologije relativna centralnost i baza podataka o metaboličkim putevima specifičnim za psa (lat. *Canis lupus familiaris*). Statistički značajno promijenjenim metaboličkim putevima su ocijenjeni oni s vrijednošću $p < 0,05$ i utjecajem na put $> 0,1$ (engl. *pathway impact*).

Dijagnostička učinkovitost statistički značajno promijenjenih metabolita procijenjena je uz pomoć tzv. krivulja odnosa specifičnosti i osjetljivosti klasifikatora (engl. *Receiver Operating Characteristic Curve*, *ROC curve*). Dijagnostička točnost je izvedena na temelju površine ispod

krivulje (engl. *Area Under Curve*; AUC) pri čemu je test osjetljiviji i specifičniji što je vrijednost AUC bliža 1,0.

5. REZULTATI

5.1. ISTRAŽIVANE SKUPINE KUJA

5.1.1. KONTROLNA SKUPINA KUJA

U metabolomsko istraživanje uključena je kontrolna skupina sastavljena od klinički zdravih kuja (N=18) koje su zaprimljene radi postupka kastracije na Klinici za porodništvo i reprodukciju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Pasminski sastav kontrolne skupine kuja je sljedeći: lagotto romagnolo (N=3), argentinski pas (N=1), maltezer (N=1), shi-tzu (N=1), shiba-inu (N=1), mađarska vižla (N=1), labrador retriever (N=1), tornjak (N=1), križanac (N=4), mješanac (N=4). Prosječna dob kontrolne skupine kuja je 1,0 godina, a prosječna tjelesna masa 14,0 kg (Tablica I, Dodatak). Sve kuje iz kontrolne skupine su u trenutku uzimanja uzoraka za istraživanje bile uredno uhranjene i hidrirane. Opći mikrobiološki nalaz mokraće (urinokultura) svake pojedine kuje iz kontrolne skupine je negativan na prisustvo bakterija. Kontrolnoj skupini kuja su učinjene pretrage kompletne krvne slike (Tablica II, Dodatak), biokemijske pretrage seruma (Tablica III, Dodatak) i mokraće (Tablica IV, Dodatak), fizikalno-kemijske pretrage mokraće i pretrage sedimenta mokraće (Tablica V, Dodatak).

Referentni intervali obuhvaćaju vrijednosti 95 % zdrave populacije jedinki što znači da oko 5 % zdravih životinja može imati vrijednosti analita koje su blago snižene ili povišene u odnosu na referentni interval (GEFFRE i sur., 2009). Zbog toga su u kontrolnu skupinu uvrštene kuje kojima su izmjerene koncentracije pojedinih biokemijskih, hematoloških ili mokraćnih pokazatelja izvan granica referentnog raspona. Budući da navedene vrijednosti nisu bile praćene kliničkim znakovima koji bi u kuja ukazivali na prisutan patološki proces, nije bilo dokaza bolesti koji bi bio razlog za isključivanjem iz kontrolne skupine. Istraživanja o utjecaju anestezijskog protokola također navode moguće promjene vrijednosti hematoloških i biokemijskih pokazatelja, npr. povišenu koncentraciju glukoze u serumu kuja za vrijeme ovariohisterektomije (MOLDAL i sur., 2018; RUBIO i sur., 2022; PUSP i sur., 2023).

5.1.2. SKUPINA KUJA OBOLJELIH OD PIOMETRE

U metabološko istraživanje uvrštene su kuje spontano oboljele od piometre (N=19) koje su zaprimljene na Kliniku za porodništvo i reprodukciju radi liječenja, odnosno operacije ovariohisterektomije. Kriteriji za ulazak u istraživanu skupinu kuja s piometrom su potvrđena bolest piometre te izostanak komorbiditeta akutnog ili kroničnog, upalnog ili neoplastičnog tipa. Pasminski sastav skupine kuja s piometrom je sljedeći: maltezer (N=2), njemački ovčar (N=1), američki staford (N=2), francuski buldog (N=2), američki buldog (N=1), zlatni retriver (N=2), irski seter (N=1), šarplaninac (N=1), bobtail (N=1), planinski krvosljednik (N=1), njemačka doga (N=1), križanac (N=2), mješanac (N=2). Prosječna dob skupine kuja s piometrom je 8,7 godina, a prosječna tjelesna masa 25,8 kg (Tablica VI, Dodatak). Prema anamnezama je veći broj kuja s piometrom (N=15) prethodnih 2-5 dana imao slab ili gotovo nikakav apetit uz pojačanu žeđ, dok je manji broj kuja s piometrom (N=4) imao uredan apetit. Neke kuje s piometrom su imale simptome probavnih smetnji (povraćanje, proljev). Većina kuja s piometrom je imala otvoreni tip piometre (N=17), dok su ostale kuje imale zatvoreni tip piometre (N=2). Jedna kuja s piometrom nije preživjela operaciju ovariohisterektomije, dok su preostale kuje (N=18) imale uredan tijek oporavka nakon operacije.

Jednom dijelu kuja s piometrom (N=14) je učinjen patohistološki nalaz maternice te im je dijagnosticiran endometritis, gnojni, kronični, difuzni, u rasponu od slabijeg do težeg stupnja. U nekoliko kuja s piometrom (N=4) je dodatno dijagnosticirana i cistična hiperplazija endometrija. Prema mikrobiološkim nalazima obriska maternice kuja s piometrom najzastupljeniji (N=10) je pozitivan nalaz bakterije *Escherichia coli*. U obriscima maternice ostalih kuja potvrđeni su pojedinačni pozitivni nalazi hemolitične *Escherichia coli* (N=2), β -hemolitičnog *Streptococcus sp.* (N=1), *Staphylococcus sp.* (N=1), *Pseudomonas sp.* (N=1), *Klebsiella sp.* (N=1), *Pasteurella sp.* (N=1) i *Citrobacter koseri* (N=1) te istovremeni pozitivni nalaz β -hemolitičnog *Streptococcus sp.* i *Escherichia coli* (N=1) (Tablica VII, Dodatak). U skupini kuja s piometrom većina kuja (N=12) ima negativan nalaz urinokulture. Preostale kuje s piometrom u urinokulturi imaju pojedinačne pozitivne nalaze *Escherichia coli* (N=4), hemolitične *Escherichia coli* (N=1), *Enterococcus sp.* (N=1) i *Citrobacter koseri* (N=1) (Tablica VII, Dodatak). Skupini kuja s piometrom su učinjene pretrage kompletne krvne slike (Tablica VIII, Dodatak), biokemijske pretrage seruma (Tablica IX, Dodatak) i mokraće (Tablica X, Dodatak), fizikalno-kemijske pretrage mokraće i pretrage sedimenta mokraće (Tablica XI, Dodatak).

5.2. ISTRAŽIVANJE PIOMETRE KUJA

5.2.1. ANALIZA PUNE KRVI

U istraživanju piometre kuja uspoređene su kompletne krvne slike kuja s piometrom (N=19) i kontrolne skupine kuja (N=18) (Tablica 1). Značajne razlike ($p < 0,05$) u vrijednostima pokazatelja kompletne krvne slike između kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja su utvrđene za ukupni broj leukocita i eritrocita, hematokrit, hemoglobin i prosječni volumen trombocita (engl. *Mean Platelet Volume*, MPV) te apsolutni broj segmentiranih i nesegmentiranih neutrofila, monocita i eozinofila. Pritom su u kuja s piometrom ukupan broj leukocita, MPV i apsolutni udjeli monocita, nesegmentiranih i segmentiranih neutrofila povišeni, a broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit i apsolutni broj eozinofila sniženi u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Značajno povišeni ukupni broj leukocita i broj nesegmentiranih neutrofila u kuja s piometrom specifični su za upalne bolesti, posebno one uzrokovane bakterijama kao što je piometra.

Tablica 1.

Tablični prikaz usporedbe pokazatelja kompletne krvne slike kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra (N=19)	Vrijednost p
Nesegmentirani neutrofil	Apsolutni broj	0,0 (0,00-0,11)	2,42 (0,06-27,46)	$<0,0001$
Leukociti	$\times 10^9/L$	7,80 (5,4-10,6)	20,0 (6,2-60,8)	$<0,0001$
Monociti	Apsolutni broj	0,22 (0,07-0,67)	1,58 (0,43-10,29)	$<0,0001$
Segmentirani neutrofil	Apsolutni broj	4,94 (2,75-7,43)	9,98 (2,82-38,3)	$0,0003$
Hematokrit	%	44,5 (37-54)	36,0 (11-56)	$0,0030$
Hemoglobin	g/L	153,5 (127-186)	124,0 (41-205)	$0,0030$

MPV	fL	9,0 (8-12)	11,0 (8-12)	0,0045
Eritrociti	x 10 ¹² /L	6,65 (5,3-7,8)	5,40 (1,7-8,1)	0,0047
Eozinofili	Apsolutni broj	0,36 (0-1,27)	0,06 (0-2,49)	0,0185
Bazofili	Apsolutni broj	0,0 (0-0,11)	0,0 (0-0)	0,3042
Trombociti	x 10 ⁹ /L	266,0 (124-422)	201,0 (119-698)	0,3427
MCV	fL	69,0 (62-75)	67,0 (63-73)	0,3895
Limfociti	Apsolutni broj	2,02 (0,99-3,27)	1,80 (0,57-5,57)	0,9391

(Hematološki pokazatelji su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini; Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom.) MPV, *Mean Platelet Volume* – prosječan volumen trombocita; MCV, *Mean Corpuscular Volume* – prosječan volumen eritrocita.

5.2.2. ANALIZE SERUMA

5.2.2.1. Biokemijska analiza seruma

U istraživanju piometre kuja su analizirani biokemijski pokazatelji kuja s piometrom (N=19) i kontrolne skupine kuja (N=18) (Tablica 2). Značajne razlike ($p < 0,05$) u vrijednostima biokemijskih pokazatelja između kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja su utvrđene za koncentracije CRP-a, albumina, triglicerida, glukoze i ureje te katalitičke koncentracije ALP, lipaze DGGR, ALT, LDH i γ -GT. Niske aktivnosti ALT i γ -GT nemaju dijagnostički značaj, ali mogu ukazivati na malnutriciju. Pritom su u kuja s piometrom koncentracije CRP-a, triglicerida, ALP, lipaze DGGR i LDH povišene, a koncentracije albumina, glukoze, ureje, ALT i γ -GT snižene u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Aktivnost ALP i LDH je u kuja s piometrom također povišena, no u okviru referentnog raspona. S obzirom da su u kuja s piometrom aktivnosti γ -GT i ALT značajno snižene, porast ALP vjerojatno nije posljedica

porasta jetrenog izoenzima ALP. Povišene koncentracije triglicerida i ukupnog kolesterola (unutar referentnog raspona) vjerojatno nisu posljedica povećanog unosa prehranom, već pojačane endogene proizvodnje ili mobilizacija lipida (lipoproteina).

Tablica 2.

Tablični prikaz usporedbe biokemijskih pokazatelja u kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra (N=19)	Vrijednost p
CRP	mg/L	1,00 (1,0-4,3)	126,20 (3,4-355,2)	<i><0,0001</i>
Albumin	g/L	30,0 (25-31)	24,0 (11-31)	<i><0,0001</i>
Trigliceridi	mmol/L	0,50 (0,3-1,3)	0,80 (0,5-1,6)	<i>0,0003</i>
Glukoza	mmol/L	6,45 (4,6-9,6)	4,90 (2,9-6,3)	<i>0,0003</i>
ALP	U/L	34,0 (10-68)	81,0 (20-282)	<i>0,0006</i>
Lipaza DGGR	U/L	36,0 (21-125)	68,0 (28-498)	<i>0,0019</i>
ALT	U/L	34,5 (16-58)	20,0 (9-60)	<i>0,0020</i>
Ureja	mmol/L	6,05 (3,5-8,7)	3,70 (2,2-19,6)	<i>0,0037</i>
LDH	U/L	62,5 (24-231)	120,0 (41-467)	<i>0,0132</i>
γ -GT	U/L	5,0 (2-8)	3,0 (1-18)	<i>0,0287</i>
Željezo	μ mol/L	30,2 (13,9-50,7)	19,90 (9,8-57,6)	0,0536
Kolesterol ukupni	mmol/L	4,90 (3,3-8,1)	6,00 (2,5-11,4)	0,0824

Magnezij ukupni	mmol/L	0,75 (0,6-1,0)	0,80 (0,5-1,2)	0,0853
Bilirubin ukupni	μmol/L	1,85 (1,1-2,9)	1,40 (0,9-13,7)	0,1201
Proteini ukupni	g/L	60,5 (50-68)	68,0 (40-85)	0,1664
Kalcij ukupni	mmol/L	2,50 (2,0-2,8)	2,40 (1,8-2,8)	0,2119
AST	U/L	26,5 (18-58)	34,0 (14-180)	0,2803
Fosfat anorganski	mmol/L	1,60 (1,0-2,3)	1,30 (1,0-4,1)	0,2849
Klorid	mmol/L	116,0 (110-124)	117,0 (98-122)	0,3844
Kreatinin	μmol/L	73,5 (44-109)	70,0 (49-292)	0,5531
Kalij	mmol/L	4,45 (3,5-5,0)	4,40 (3,5-5,0)	0,6126
CK	U/L	110,5 (62-233)	136,0 (23-3351)	0,6267
Natrij	mmol/L	146,0 (143-149)	147,0 (126-158)	0,8186

(Biokemijski pokazatelji su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom.) CRP, C-reaktivni protein; ALP, alkalna fosfataza; ALT, alanin-aminotransferaza; LDH, laktat-dehidrogenaza; γ-GT, γ-glutamil-transferaza; AST, aspartat-aminotransferaza; CK, kreatinkinaza

5.2.2.2. Neciljana metabolomska analiza seruma

Radi uvida u metabolom seruma kuja s piometrom, neciljanom LC-MS metodom su analizirani uzorci seruma skupine kuja s piometrom (N=19) i kontrolne skupine kuja (N=18). U svim uzorcima seruma (N=37) su detektirani relativni intenziteti (*mz/rt*) 1358 pikova koji se odnose

na 2968 mogućih metabolita. Provjerom cjelovitosti podataka utvrđen je izostanak 504 (1 %) vrijednosti. Od 1358 pikova su identificirani sljedeći metaboliti (N=35): L-karnitin, kreatinin, L-prolin, L-glutamin, L-valin, L-leucin, β -alanin, L-alanin, L-fenilalanin, L-citrulin, kolin, L-arginin, L-metionin, L-glutamat, L-serin, L-asparagin, citozin, citidin, L-kinurenin, glicin, *trans*-4-hidroksi-L-prolin, pantotenat, N-acetil-neuraminat, taurin, (S)-malat, L-triptofan, *cis*-akoničat, betain, inozin, metil-malonat, sukcinat, malonat, N-acetil-L-glutamat te L-homoserin i/ili L-treonin.

a) *Fold change* analiza

Fold change analizom su utvrđeni omjeri izvornih vrijednosti intenziteta pikova detektiranih u serumu između kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja. Značajno ($FC \geq 2,0$) su povišeni intenziteti 28 pikova, a sniženi intenziteti 64 pika, dok intenziteti preostalih 1265 pikova nisu značajno promijenjeni.

b) Studentov *t*-test

Prema Studentovom *t*-testu su u serumu kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja značajno ($p \leq 0,05$) promijenjeni intenziteti 580 pikova (Tablica XII, Dodatak), dok intenziteti preostalih 778 pikova nisu značajno promijenjeni. Pritom su u serumu kuja s piometrom intenziteti pantotenata, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-citrulina, L-triptofana, glicina, citozina, *trans*-4-hidroksi-L-prolina, citidina i L-serina sniženi, dok je intenzitet L-karnitina povišen u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (Tablica 3, Slika 1).

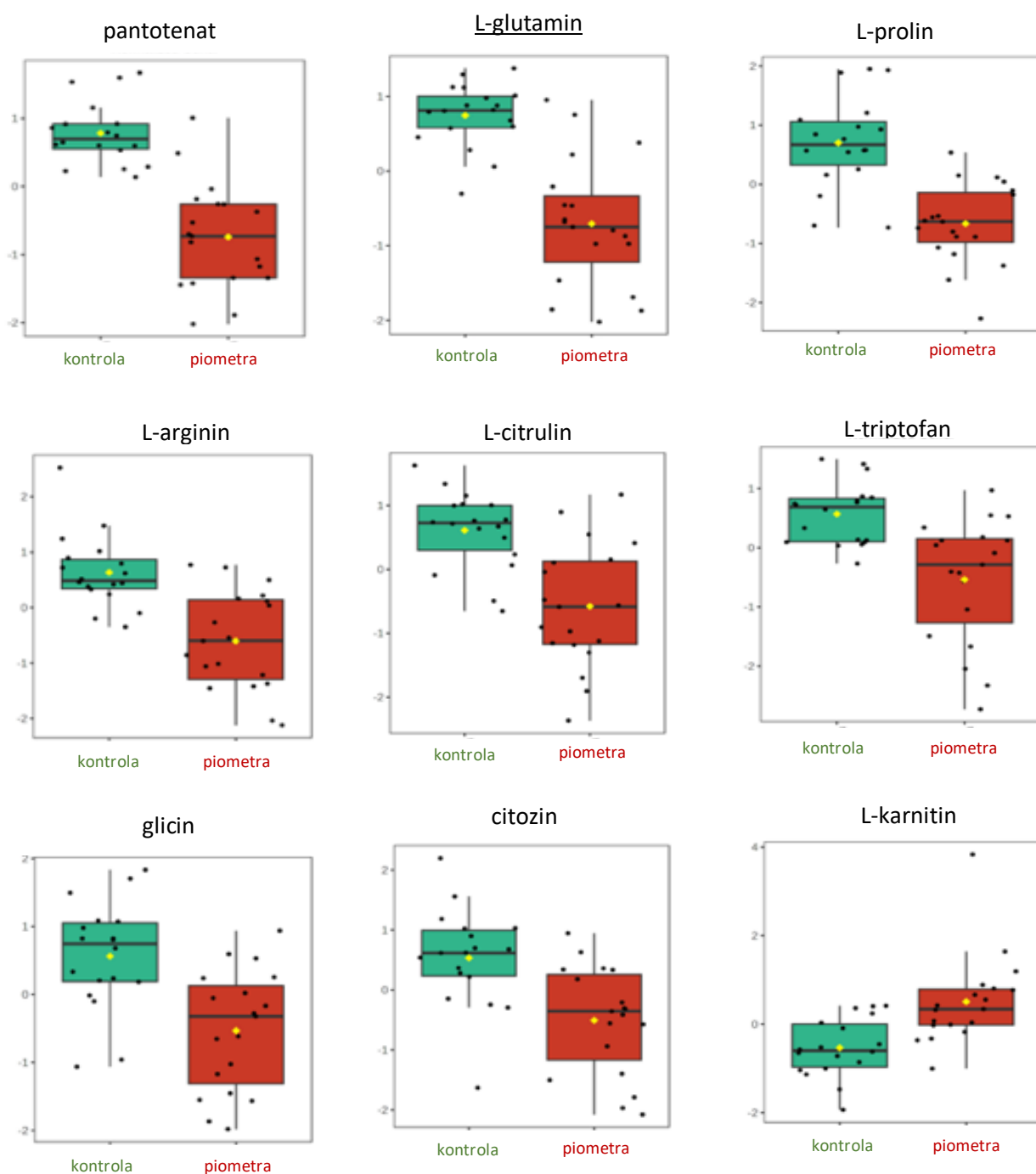
Tablica 3.

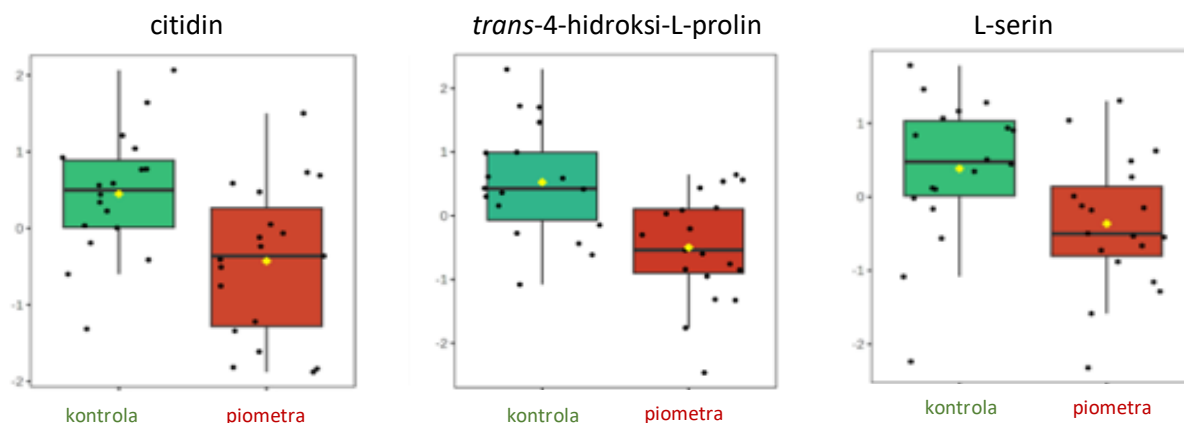
Tablični prikaz metabolita (N=12) identificiranih u serumu čiji su intenziteti prema *t*-testu značajno promijenjeni ($p < 0,05$) u kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja.

Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Log ₂ (FC)	Vrijednost p	FDR
pantotenat	220,118	444,38	-1,45	2,23E-08	1,38E-06
L-glutamin	147,0763	679,88	-0,62	2,12E-07	7,39E-06
L-prolin	116,0706	601,02	-0,77	2,12E-06	3,79E-05
L-arginin	175,1189	1201,58	-0,66	3,35E-05	3,42E-04

L- citrulin	176,1029	706,05	-0,83	7,96E-05	6,84E-04
L-triptofan	203,0831	595,34	-0,54	3,11E-04	1,90E-03
glicin	76,0393	713,37	-0,59	3,65E-04	2,09E-03
L-karnitin	162,1125	599,58	1,33	7,77E-04	3,81E-03
citozin	112,0505	586,79	-0,80	8,19E-04	3,99E-03
<i>trans</i> -4-hidroksi-L-prolin	132,0655	691,74	-0,85	9,78E-04	4,52E-03
citidin	244,0928	587,35	-0,60	5,83E-03	1,80E-02
L-serin	106,0499	718,06	-0,43	2,08E-02	4,88E-02

FDR, *False Discovery Rate* – mjera lažno otkrivenih rezultata



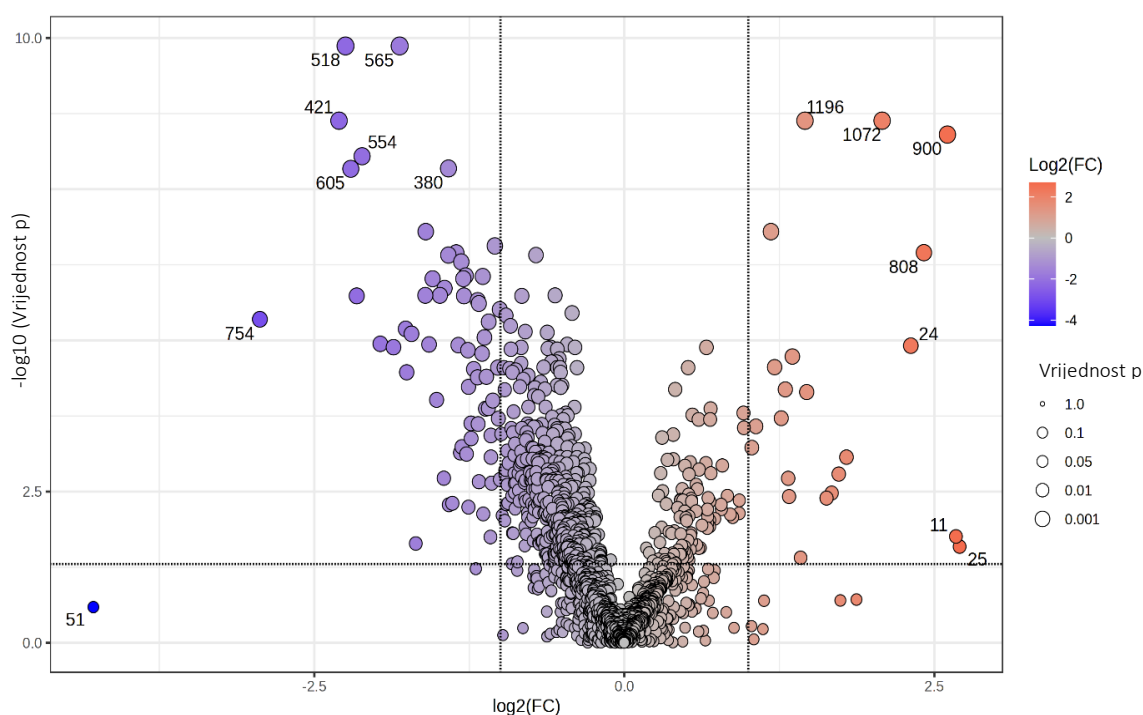


Slika 1.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita (N=12) identificiranih u serumu čiji su intenziteti prema Studentovom *t*-testu značajno promijenjeni ($p < 0,05$) u kuja s piometrom (crveni pravokutnik) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (zeleni pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Crna vodoravna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)

c) *Volcano* analiza

Volcano analizom su u serumu kuja s piometrom utvrđeni značajno ($FC \geq 2,0$; $t\text{-test} \leq 0,05$) povišeni intenziteti 22 pika i značajno sniženi intenziteti 63 pika u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenziteti preostala 1273 pika nisu statistički značajno promijenjeni (Slika 2).

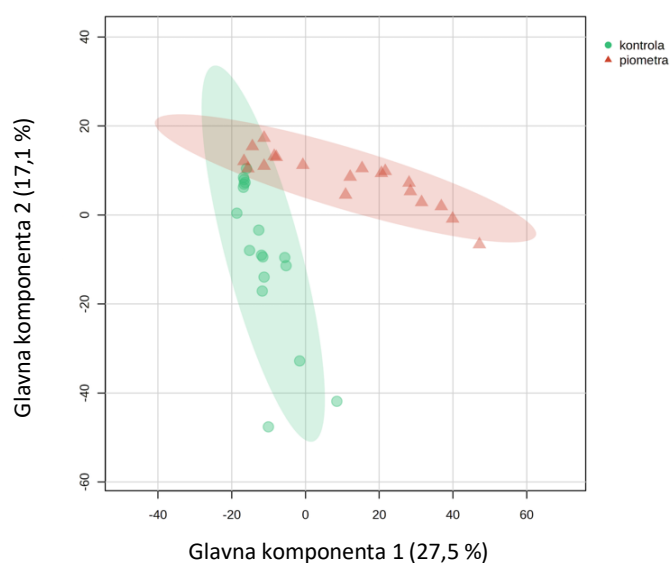


Slika 2.

Grafički prikaz *Volcano* analize intenziteta svih pikova detektiranih u serumu kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenzitet pika je statistički značajnije promijenjen, što je udaljeniji od sjecišta (0,0). Najznačajnije promijenjeni intenziteti pikova (N=15) su obilježeni brojem pika iz kromatograma (Tablica XIII, Dodatak).

d) Analiza glavnih komponenti (*engl. Principal Component Analysis; PCA*)

PCA analizom intenziteta pikova u serumu ispitane su unutarnje varijacije u skupini kuja s piometrom i u kontrolnoj skupini kuja (Slika 3).



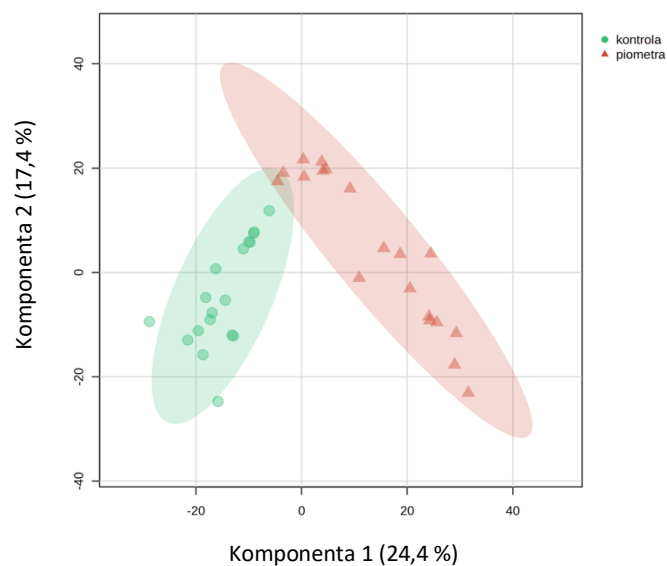
Slika 3.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u serumu skupine kuja s piometrom (crveni trokutići) i kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

e) Djelomična diferencijalna analiza najmanjih kvadrata

(*engl. Partial Least Squares – Discriminant Analysis; PLS-DA*)

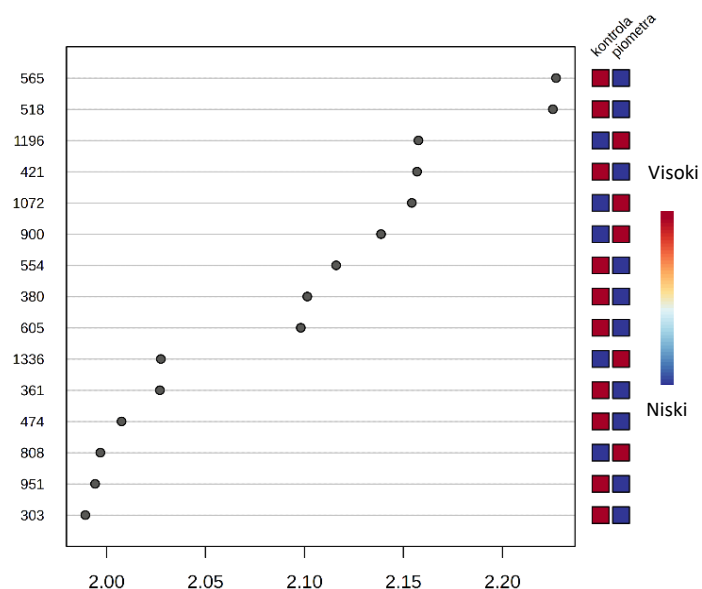
PLS-DA analiza seruma pokazuje vrlo dobro razdvajanje skupine kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja (Slika 4).



Slika 4.

Grafički prikaz PLS-DA analize intenziteta pikova detektiranih u serumu skupine kuja s piometrom (crveni trokutići) i kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

Rezultati VIP (engl. *Variable Importance in Projection* – projekcija važnosti varijable) analize upućuju na pikove čiji značajno ($p < 0,05$) promijenjeni intenziteti najviše doprinose razlikovanju metaboloma seruma kuja s piometrom od metaboloma seruma kontrolne skupine kuja (Slika 5).



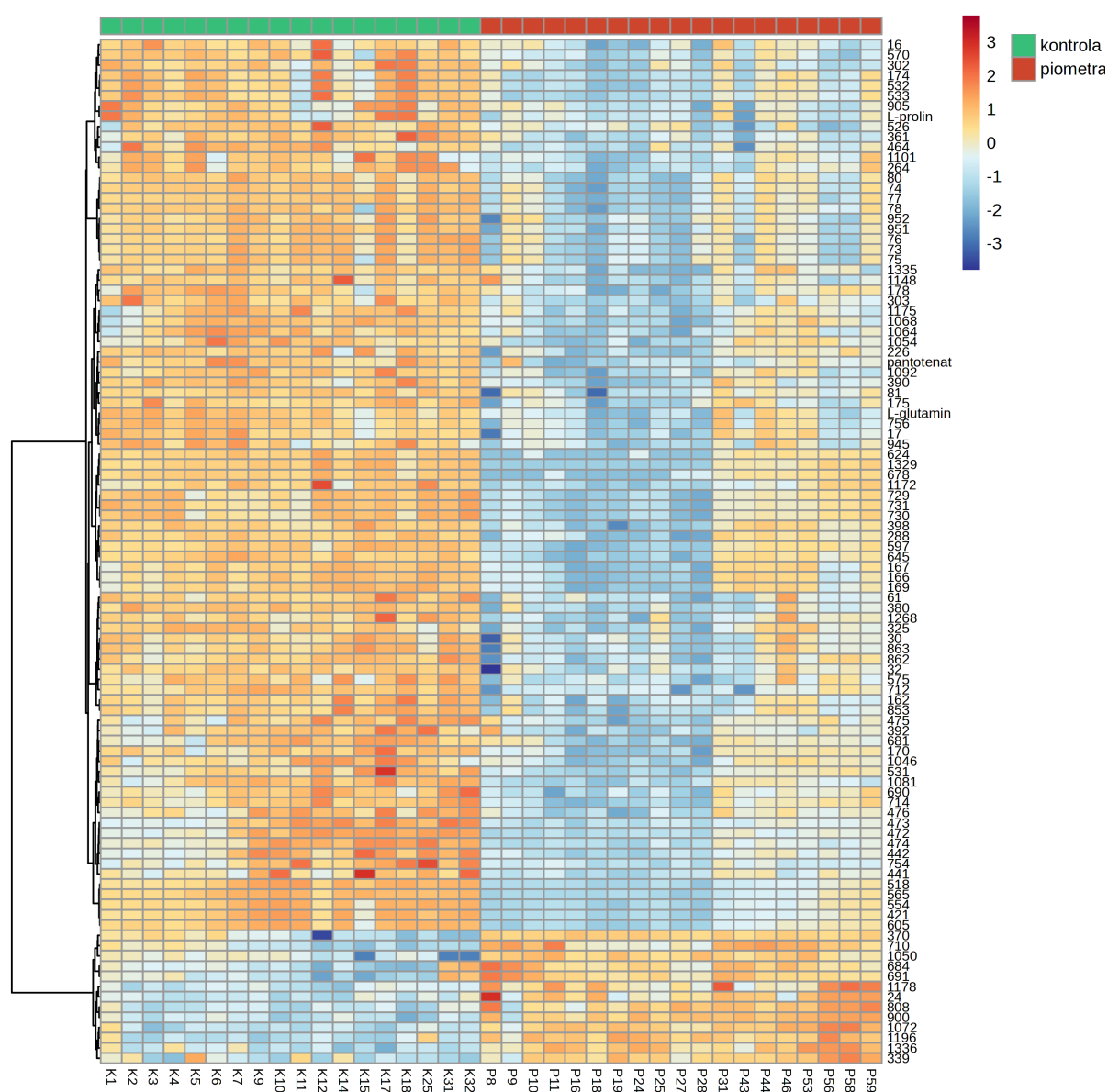
Slika 5.

Grafički prikaz VIP analize intenziteta pikova seruma kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja. Prikazani su pikovi (N=15) čiji intenziteti najviše doprinose razlikovanju navedenih

skupina (Tablica XIV, Dodatak). (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)

f) Analiza hijerarhijskog grupiranja

Hijerarhijskim grupiranjem su analizirani odnosi između intenziteta pikova detektiranih u serumu kuja s piometrom i serumu kontrolne skupine kuja (Slika 6). Analiza hijerarhijskog grupiranja pokazuje vrlo dobru razliku između skupine kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja.

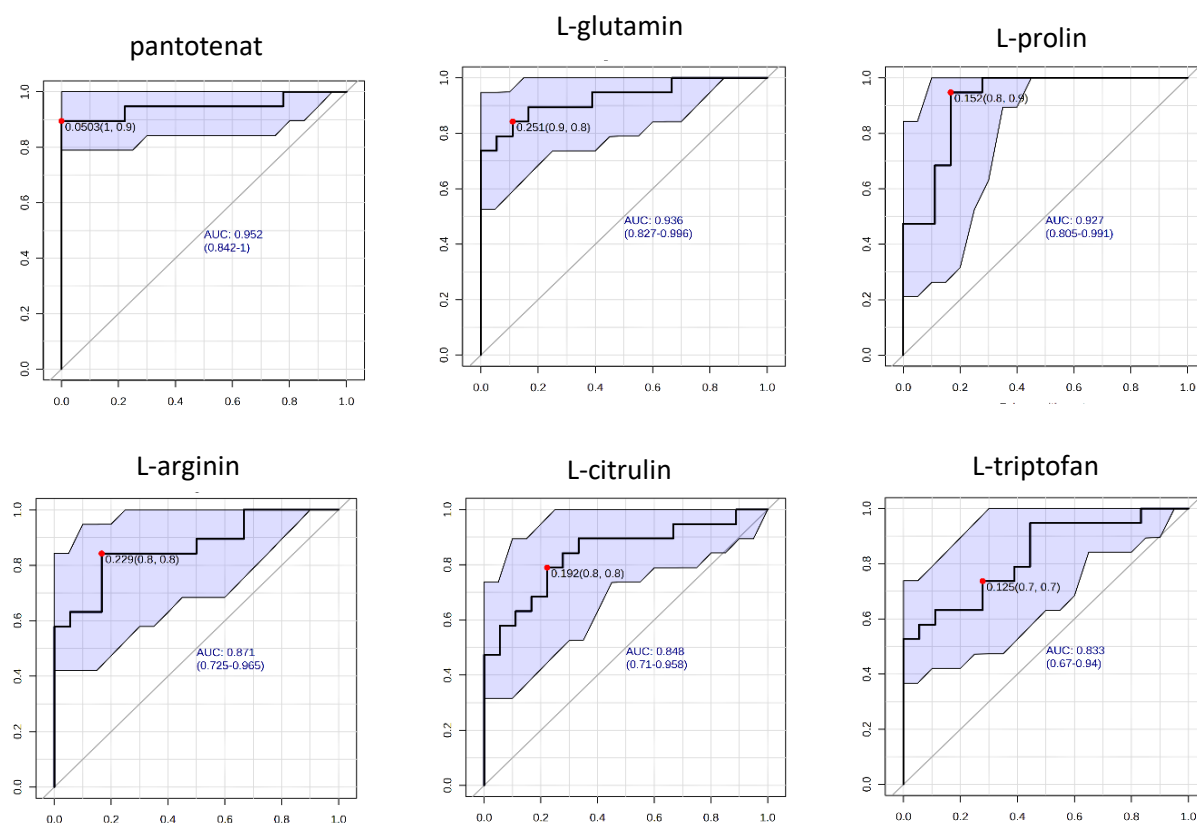


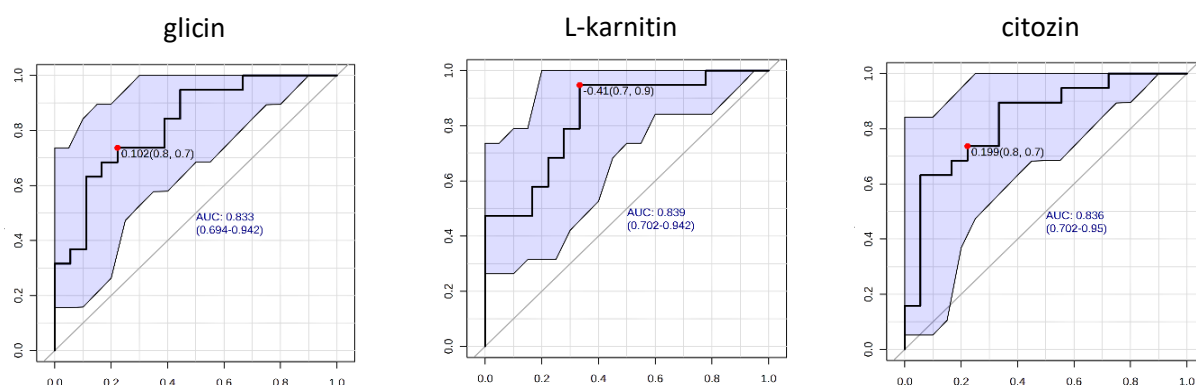
Slika 6.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja prema Studentovom *t*-testu između najznačajnije promijenjenih intenziteta pikova (N=100) u serumu kuja s piometrom (crveni panel) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazani tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)

g) Analiza biomarkera

Grafički prikaz pojedinačnih ROC krivulja s 95 % intervalima pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*, CI) i AUC za identificirane i značajno ($p < 0,05$) promijenjene metabolite (Slika 7). L-Arginin, L-citrulin, L-triptofan, glicin, L-karnitin i citozin pokazuju osobine vrlo dobrog biomarkera s $AUC > 0,8$, dok pantotenat, L-glutamin i L-prolin pokazuju osobine odličnog biomarkera s $AUC > 0,9$.





Slika 7.

Grafički prikaz ROC krivulja metabolita identificiranih u serumu kuja s piometrom čiji su intenziteti značajno promijenjeni ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. (Os apscisa predstavlja lažno pozitivne vrijednosti, tj. specifičnost, a os ordinata prave pozitivne vrijednosti, tj. osjetljivost.)

h) Analiza bioloških puteva

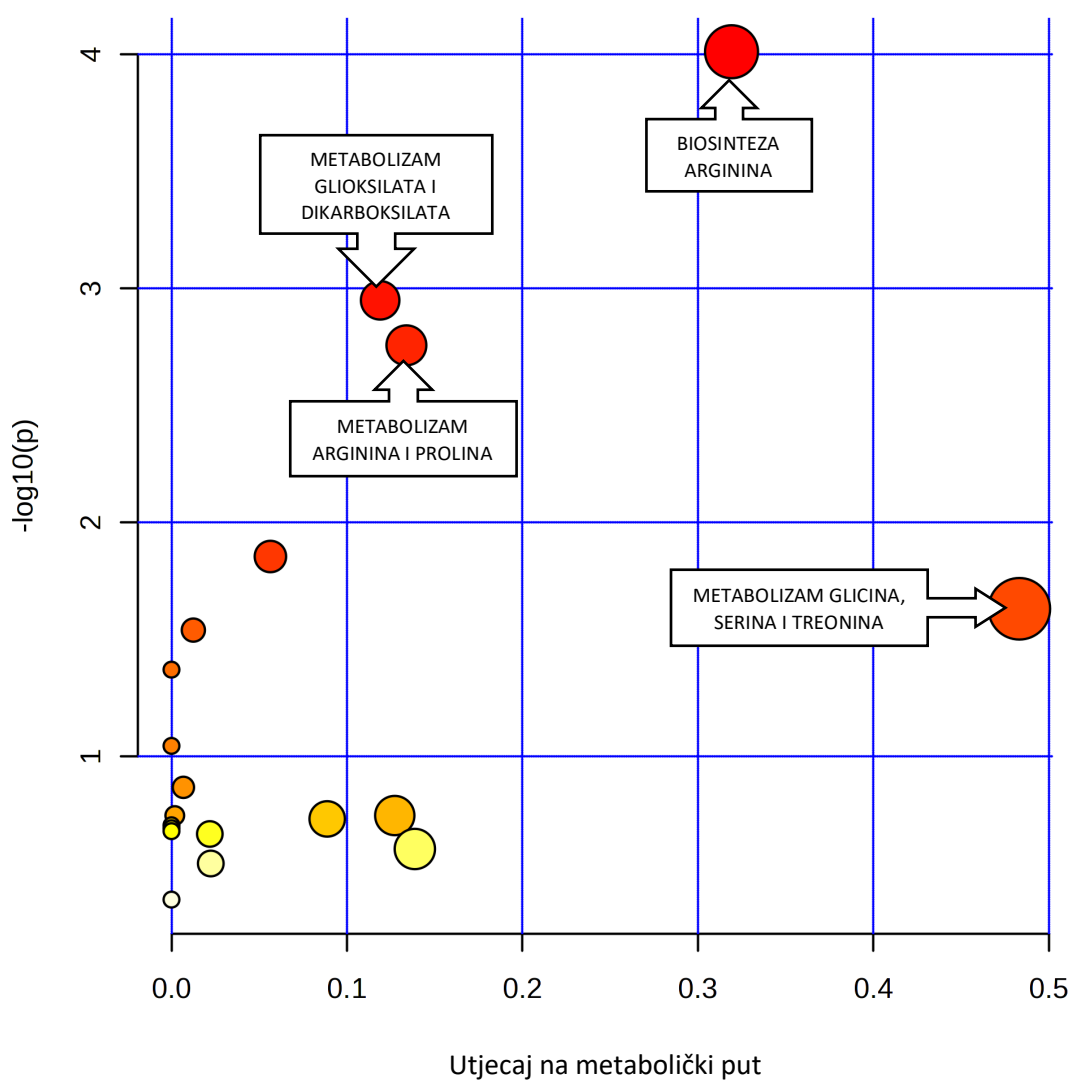
U otkrivanje statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva u piometri kuja su uključeni metaboliti identificirani u serumu kuja s piometrom čiji su intenziteti značajno promijenjeni ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Najznačajnije promijenjeni metabolički putevi u piometri kuja su biosinteza arginina, metabolizam gliksilata i dikarboksilata, metabolizam arginina i prolina te metabolizam glicina, serina i treonina (Tablica 4, Slika 8).

Tablica 4.

Tablični prikaz značajno promijenjenih ($p < 0,05$) metaboličkih puteva u piometri kuja koji su utvrđeni prema značajno promijenjenim intenzitetima metabolita identificiranih u serumu kuja s piometrom. Istaknuti su metabolički putevi s utjecajem na put $> 0,1$.

Metabolički put	Metabolit	Vrijednost p	Utjecaj na metabolički put
Biosinteza arginina	L-arginin	9,73E-05	0,32
	L-citrulin		
	L-glutamin		
Metabolizam gliksilata i dikarboksilata	L-serin	1,12E-03	0,12
	glicin		
	L-glutamin		

Metabolizam arginina i prolina	L-arginin hidroksi-prolin L-prolin	1,75E-03	0,13
Metabolizam glicina, serina i treonina	L-serin glicin	2,34E-02	0,48



Slika 8.

Grafički prikaz statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva u serumu kuja s piometrom. (Promjer kruga je proporcionalan broju metabolita identificiranih u metaboličkom putu. Tonovima od bijele do crvene boje je predložena kumulativna statistička značajnost puta i utjecaj na metabolički put.)

5.2.3. ANALIZE MOKRAĆE

5.2.3.1. Fizikalna i biokemijska analiza mokraće

U istraživanju piometre kuja su analizirani fizikalni i biokemijski pokazatelji mokraće skupine kuja s piometrom (N=19) i kontrolne skupine kuja (N=18) (Tablica 5). U mokraći kuja s piometrom su značajno promijenjene ($p < 0,05$) koncentracija ukupnih proteina, UPCR i osmolalnost u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Pritom su koncentracija ukupnih proteina i UPCR značajno povišeni, a osmolalnost značajno snižena.

Tablica 5.

Tablični prikaz usporedbe fizikalnih i biokemijskih pokazatelja mokraće kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra (N=19)	Vrijednost p
Proteini ukupni	mg/L	0,153 (0,039-0,918)	0,710 (1,11-1,76)	<i><0,0001</i>
UPCR	/	0,060 (0,04-0,20)	0,460 (0,07-4,12)	<i><0,0001</i>
Natrij	mmol/L	104,1 (30,2-311,2)	23,9 (14,1-320,5)	<i>0,0082</i>
Osmolalnost	mOsmol/kg	1,359 (0,484-2,455)	0,8250 (0,246-1,886)	<i>0,0227</i>
Ureja	mmol/L	800,85 (242,8-1598,1)	497,00 (56,2-1416,9)	0,0982
USG	/	1,034 (1,013-1,064)	1,023 (1,009-1,052)	0,1247
Kreatinin	mmol/L	23,175 (5,32-39,83)	13,700 (2,20-37,90)	0,2709
Glukoza	mmol/L	0,469 (0,110-1,367)	0,5030 (0,018-1,211)	0,8434

(Fizikalni i biokemijski pokazatelji mokraće su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute

kurzivom.) UPCR, engl. *Urine Protein to Creatinine Ratio*, omjer proteina i kreatinina u mokraći; USG, engl. *Urine Specific Gravity*, specifična težina mokraće

5.2.3.2. Neciljana metabolomska analiza mokraće

Radi uvida u metabolom mokraće kuja s piometrom, neciljanom LC-MS metodom su analizirani uzorci mokraće skupine kuja s piometrom (N=19) i kontrolne skupine kuja (N=18). U svim uzorcima mokraće (N=37) su detektirani relativni intenziteti ukupno 1088 pikova (*mz/rt*) koji se odnose na 1838 mogućih metabolita. Od 1088 pikova su identificirani sljedeći metaboliti (N=12): kreatinin, betain, N(*pi*)-metil-L-histidin, N-acetil-glutamin, L-glutamat, D-glukonska kiselina, alantoin, D-galaktarat, L-glutamin, L-fenilalanin te L-homoserin i/ili L-treonin.

Bioinformatičkom obradom podataka vidljivo se izdvajao uzorak mokraće jedne kuje (engl. *outlier*) koji je isključen iz daljnje analize radi dobivanja točnih rezultata. Prvotnom provjerom cjelovitosti podataka (N=37) je utvrđen izostanak 380 (0,9 %) vrijednosti, a nakon isključivanja *outliera* (N=36) utvrđen je izostanak 192 (0,5 %) vrijednosti. (Tablični i grafički prikazi bioinformatičke obrade podataka mokraće kuja s *outlierom* (N=37) su prikazani u Prilogu.)

a) *Fold change* analiza

Fold change analizom su utvrđeni omjeri intenziteta pikova u mokraći između skupine kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja. Značajno ($p < 0,05$) su povišeni intenziteti 163 pika, a sniženi intenziteti 4 pika. Intenziteti preostala 922 pika nisu značajno promijenjeni.

b) Studentov *t*-test

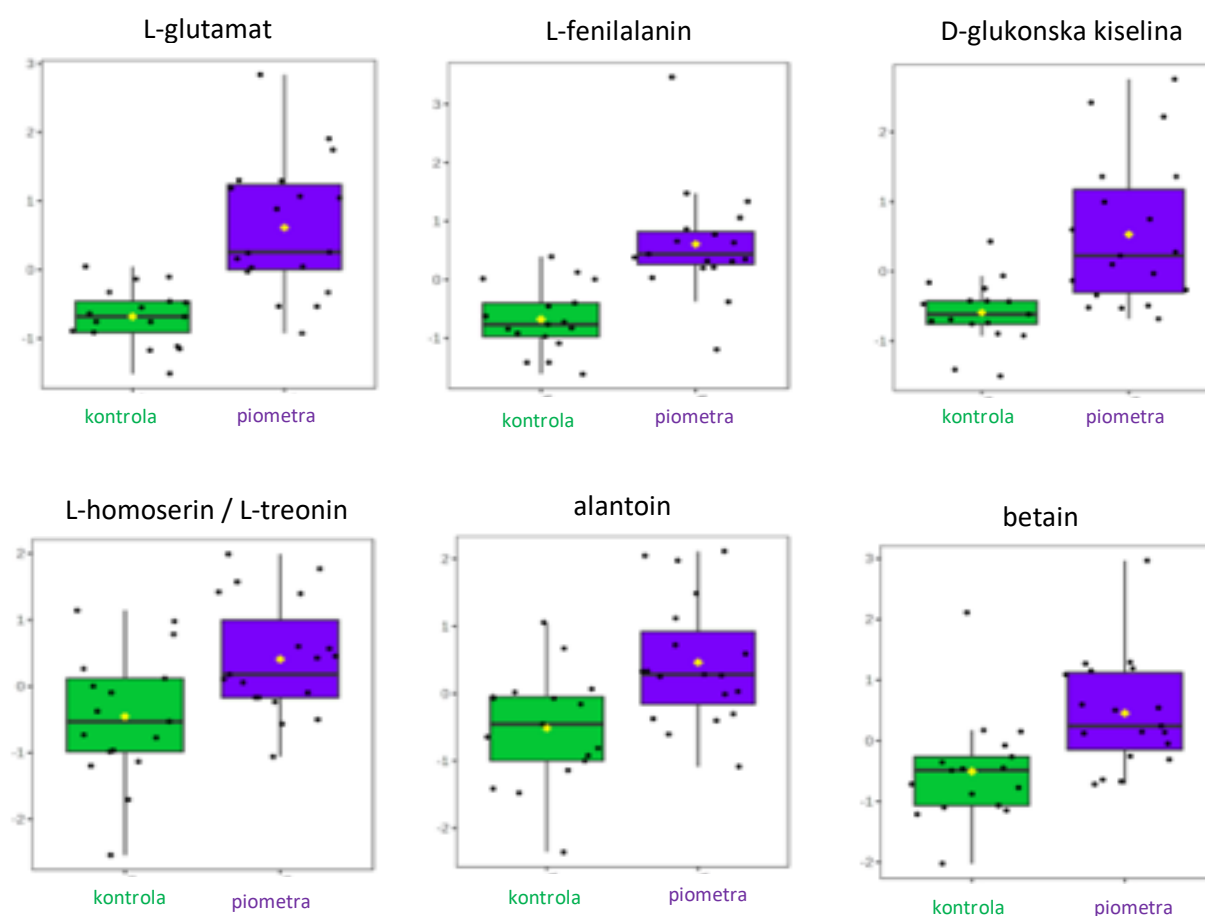
Studentovim *t*-testom je u mokraći kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja utvrđena značajna promjena ($t\text{-test} \leq 0,05$) intenziteta 304 pika (Tablica XV, Dodatak). Pritom su povišeni intenziteti L-glutamata, L-fenilalanina, D-glukonske kiseline, alantoina, betaina te L-homoserina i/ili L-treonina (Tablica 6, Slika 9). Intenziteti preostalih 785 pikova nisu značajno promijenjeni.

Tablica 6.

Tablični prikaz metabolita identificiranih u mokraći (N=6) koji su prema *t*-testu značajno (t -test $\leq 0,05$) promijenjeni u kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja.

Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	$\log_2$ (FC)	Vrijednost p	FDR
L-glutamat	148,0604	660,68	2,20	1,39E-05	2,78E-04
L-fenilalanin	164,0719	515,77	1,19	1,69E-05	3,29E-04
D-glukonska kiselina	195,0513	648,4	2,28	3,09E-04	2,90E-03
alantoin	157,037	732,05	0,54	2,19E-03	1,36E-02
betain	118,0862	555,05	0,74	2,75E-03	1,66E-02
L-homoserin / L-treonin	118,0513	675,9	0,58	7,67E-03	3,49E-02

(FDR, *False Discovery Rate* – mjera lažno otkrivenih rezultata)

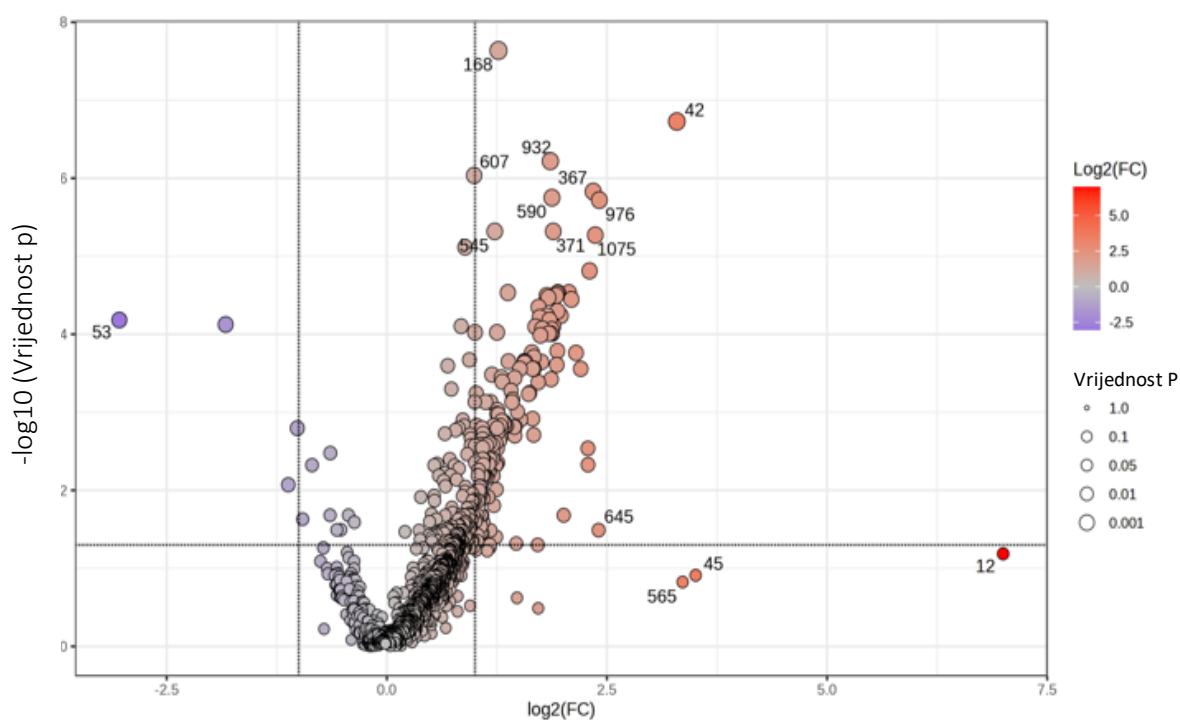


Slika 9.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita identificiranih u mokraći čiji su intenziteti prema *t*-testu značajno ($p < 0,05$) promijenjeni u kuja s piometrom (ljubičasti pravokutnik) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (zeleni pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Crna vodoravna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)

c) *Volcano* analiza

Volcano analizom su u mokraći kuja s piometrom utvrđeni značajno ($FC \geq 2,0$; $t\text{-test} \leq 0,05$) sniženi intenziteti 4 pika i značajno povišeni intenziteti 155 pikova u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenziteti preostalih 930 pikova nisu statistički značajno promijenjeni (Slika 10).

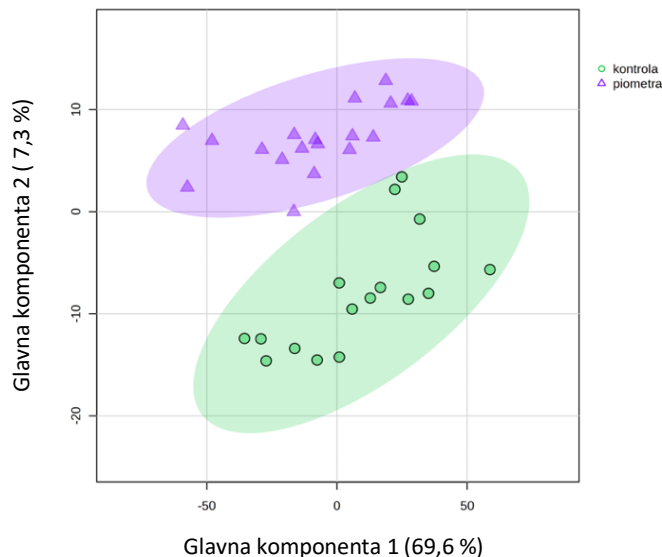


Slika 10.

Grafički prikaz *Volcano* analize intenziteta svih pikova detektiranih u mokraći kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenzitet pika je statistički značajnije promijenjen, što je udaljeniji od sjecišta (0,0). Najznačajnije promijenjeni intenziteti pikova ($N=15$) su obilježeni brojem pika iz kromatograma (Tablica XVI, Dodatak).

d) Analiza glavnih komponenti (*engl. Principal component analysis; PCA*)

PCA analizom intenziteta pikova u mokraći ispitane su unutarnje varijacije u skupini kuja s piometrom i u kontrolnoj skupini kuja (Slika 11).

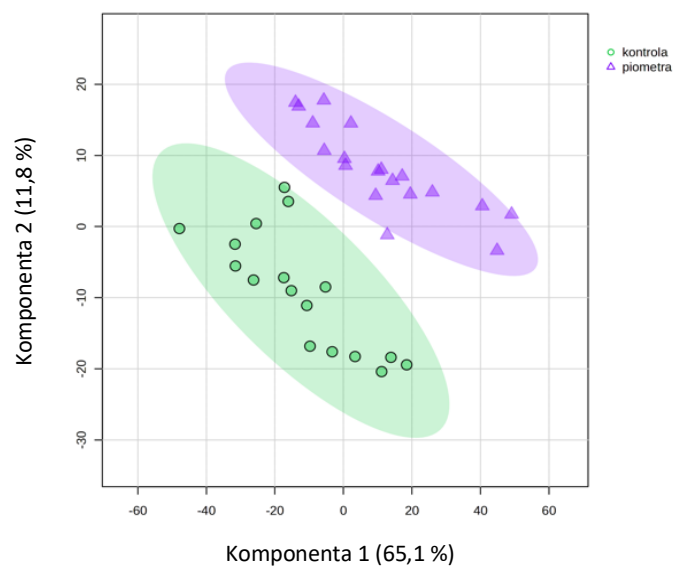


Slika 11.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u mokraći skupine s kuja s piometrom (ljubičasti trokutići) i kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

e) Djelomična diferencijalna analiza najmanjih kvadrata
(*engl. Partial Least Squares – Discriminant Analysis; PLS-DA*)

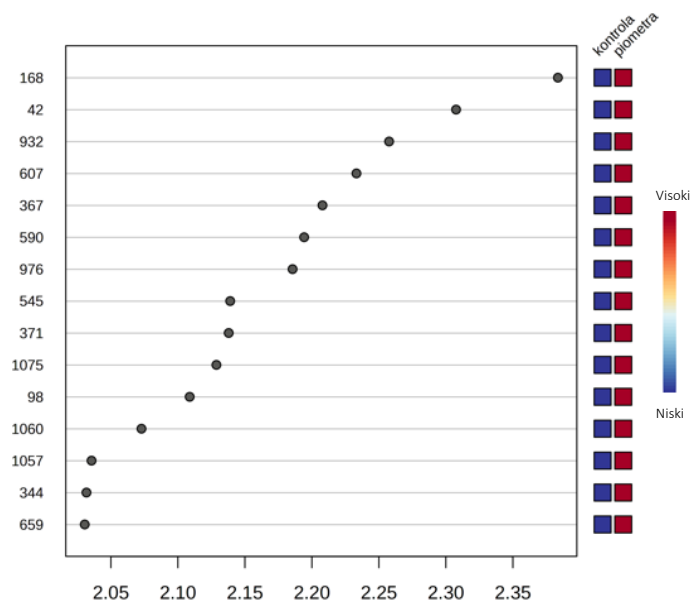
PLS-DA analiza mokraće pokazuje vrlo dobro odvajanje skupine kuja s piometrom od kontrolne skupine kuja.



Slika 12.

Grafički prikaz PLS-DA analize intenziteta pikova detektiranih u mokraći skupine kuja s piometrom (ljubičasti trokutići) i kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

Rezultati VIP (engl. *Variable Importance in Projection*, projekcija važnosti varijable) analize upućuju na značajno ($p < 0,05$) promijenjene intenzitete pikova koji najviše doprinose razlikovanju metaboloma mokraće skupine kuja s piometrom od metaboloma mokraće kontrolne skupine kuja (Slika 13).



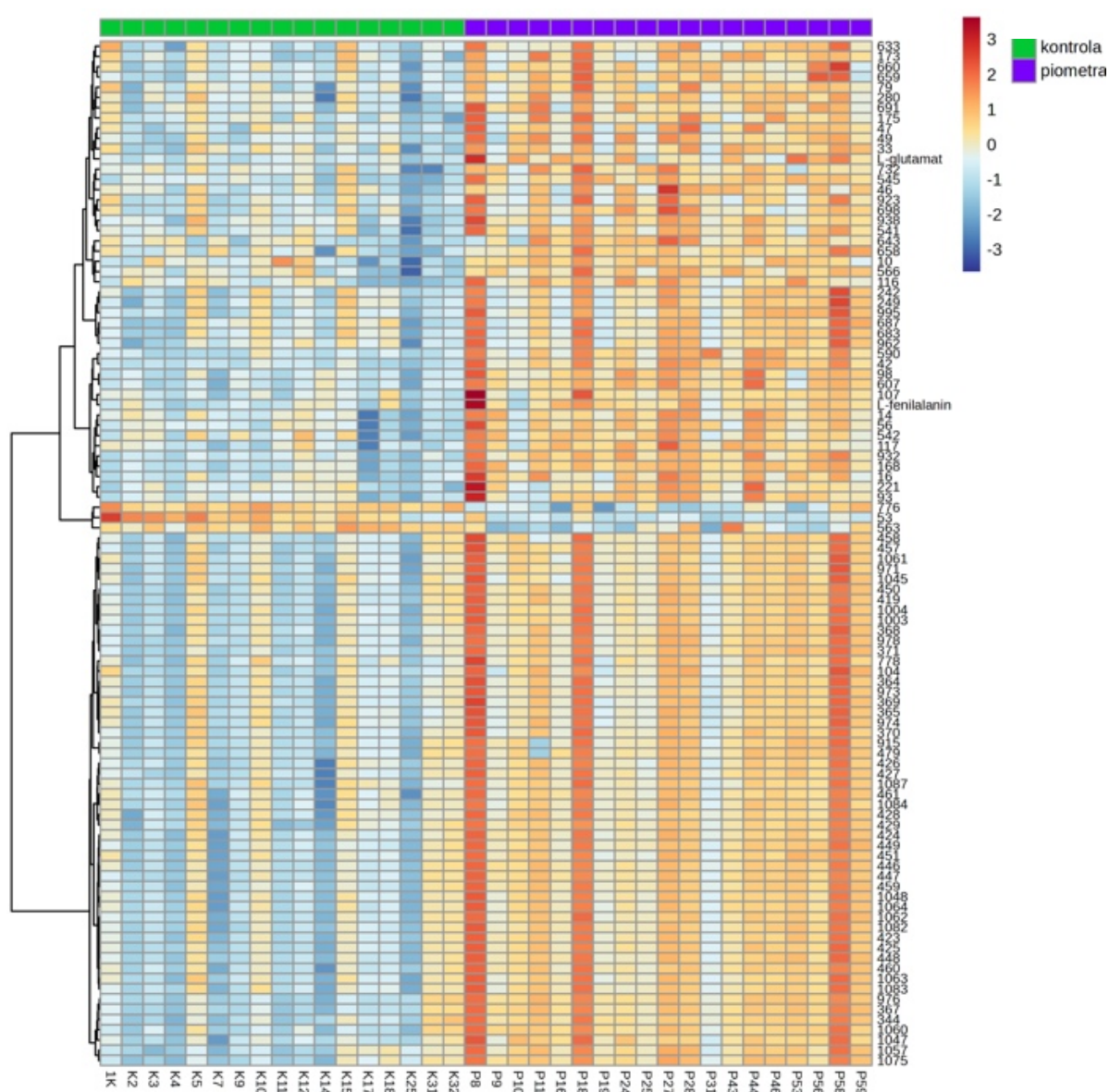
Slika 13.

Grafički prikaz VIP analize intenziteta pikova detektiranih u mokraći kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja. Prikazani su pikovi (N=15) čiji intenziteti najviše doprinose

razlikovanju skupina (Tablica XVII, Dodatak). (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)

f) Analiza hijerarhijskog grupiranja

Hijerarhijskim grupiranjem su analizirani odnosi između intenziteta najznačajnijih pikova detektiranih u mokraći kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja (Slika 14). Analiza hijerarhijskog grupiranja pokazuje vrlo dobro razlikovanje skupine kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja.

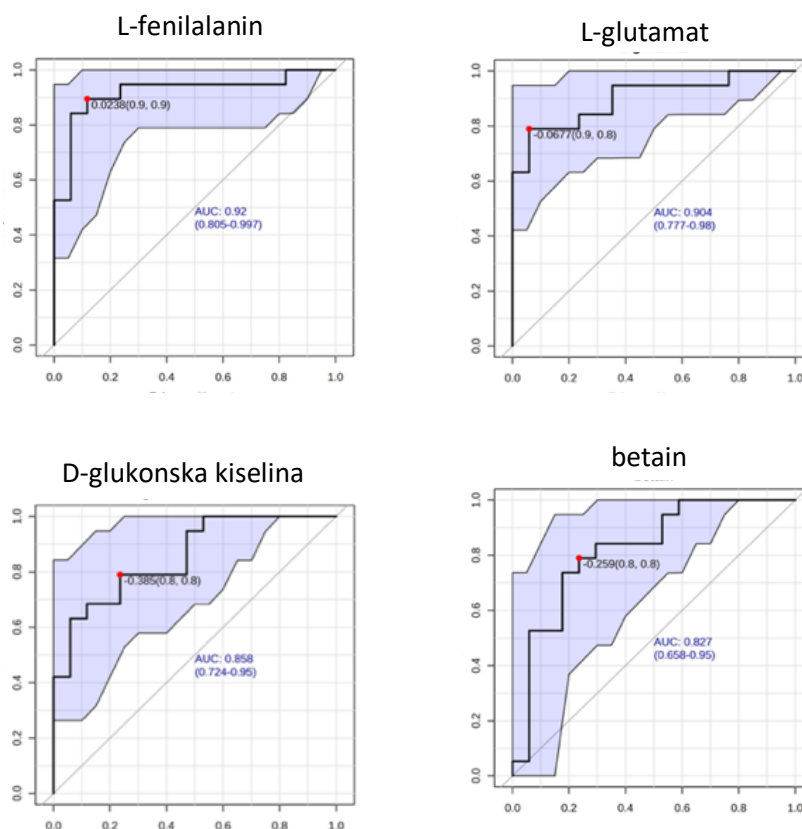


Slika 14.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja prema Studentovom t -testu između najznačajnije promijenjenih intenziteta pikova ($N=100$) u mokraći kuja s piometrom (ljubičasti panel) i kontrolne skupine kuja (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazane tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)

g) Analiza biomarkera

Analiza biomarkera je uključila analizu pojedinačnih ROC krivulja za identificirane i značajno promijenjene ($p < 0,05$) metabolite (Slika 15). D-Glukonska kiselina i betain s ostvarenim AUC $> 0,8$ pokazuju osobine vrlo dobrih biomarkera, dok L-fenilalanin i L-glutamat pokazuju osobine odličnih biomarkera s AUC $> 0,9$.



Slika 15.

Grafički prikaz ROC krivulja metabolita čiji su intenziteti statistički značajno promijenjeni u mokraći kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Prikazani su AUC i 95 % CI. (Os apscisa predstavlja lažno pozitivne vrijednosti, tj. specifičnost, a os ordinata prave pozitivne vrijednosti, tj. osjetljivost.)

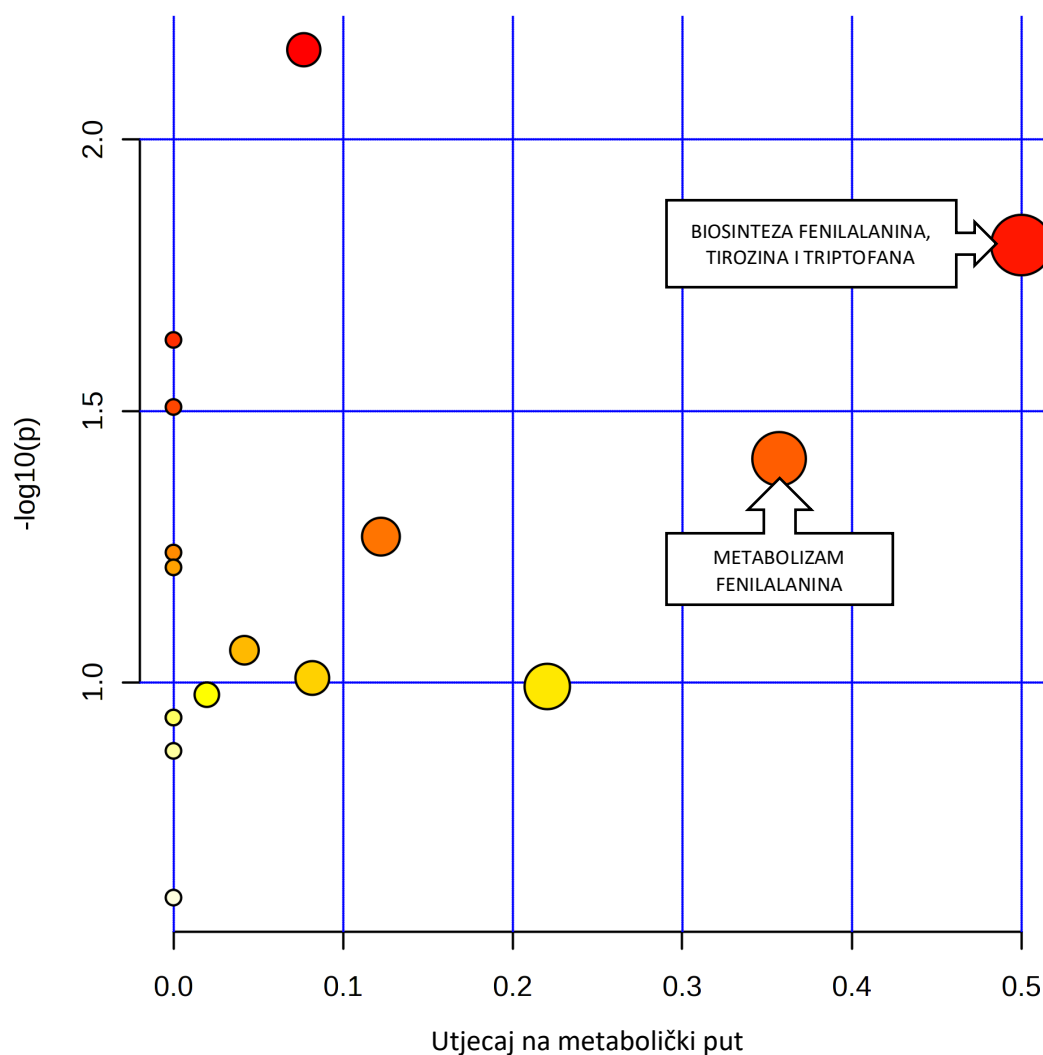
h) Analiza bioloških puteva

Za otkrivanje statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva u piometri poslužili su statistički značajno promijenjeni metaboliti identificirani u mokraći kuja s piometrom. Najznačajnije promijenjeni metabolički putevi u piometri kuja su biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana te metabolizam fenilalanina (Tablica 7, Slika 16).

Tablica 7.

Tablični prikaz značajno promijenjenih metaboličkih puteva kuja s piometrom s pripadajućim identificiranim, statistički značajno promijenjenim metabolitom u mokraći. Istaknuti su metabolički putevi sa statističkom značajnošću $p < 0,05$ i utjecajem na put $> 0,1$.

Metabolički put	Metabolit	Vrijednost p	Utjecaj na metabolički put
Biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana	L-fenilalanin	1,57E-02	0,50
Metabolizam fenilalanina	L-fenilalanin	3,87E-2	0,36



Slika 16.

Grafički prikaz značajno promijenjenih metaboličkih puteva u kuja s piometrom koji su određeni prema identificiranim i statistički značajno promijenjenim metabolitima u mokraći kuja s piometrom. (Promjer kruga je proporcionalan broju metabolita identificiranih u metaboličkom putu. Tonovima bijele, žute i crvene boje je predložena kumulativna statistička značajnost puta i utjecaj na metabolički put.)

5.3. ISTRAŽIVANJE POČETKA RAZVOJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA U PIOMETRI KUJA

Radi uvida u metaboličke promjene povezane s početkom razvoja AKI u piometri kuja skupina kuja s piometrom i sa serumskom koncentracijom kreatinina $<140 \mu\text{mol/L}$ (N=18) je uspoređena s kontrolnom skupinom kuja (N=18). Prema IRIS-ovoj klasifikaciji koncentracija kreatinina u serumu $<140 \mu\text{mol/L}$ odgovara I stupnju AKI-a.

5.3.1. ANALIZA PUNE KRVI

Značajne razlike ($p < 0,05$) u vrijednostima pokazatelja kompletne krvne slike između kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja su utvrđene za ukupni broj leukocita i eritrocita, hematokrit, hemoglobin i MPV te apsolutni broj segmentiranih i neselementiranih neutrofila, monocita i eozinofila. Pritom su u kuja s piometrom ukupni broj leukocita, MPV i apsolutni broj monocita, neselementiranih i segmentiranih neutrofila povišeni, a ukupni broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit i apsolutni broj eozinofila sniženi u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (Tablica 8).

Tablica 8.

Tablični prikaz usporedbe pokazatelja kompletne krvne slike kontrolne skupine kuja i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra početak AKI I (N=18)	Vrijednost p
Neselementirani neutrofil	Apsolutni broj	0,0 (0,00-0,11)	2,38 (0,06-27,46)	$<0,0001$
Leukociti	$\times 10^9/\text{L}$	7,80 (5,4-10,6)	20,0 (6,2-60,8)	$<0,0001$
Monociti	Apsolutni broj	0,22 (0,07-0,67)	1,53 (0,43-3,87)	$<0,0001$
Segmentirani neutrofil	Apsolutni broj	4,94 (2,75-7,43)	9,61 (2,82-38,3)	$0,0004$
Hematokrit	%	44,5 (37-54)	36,0 (11-56)	$0,0050$

Hemoglobin	g/L	153,5 (127-186)	124,0 (41-205)	0,0056
MPV	fL	9,0 (8-12)	11,0 (8-12)	0,0072
Eritrociti	x 10 ¹² /L	6,65 (5,3-7,8)	5,40 (1,7-8,1)	0,0078
Eozinofili	Apsolutni broj	0,36 (0,00-1,27)	0,08 (0,00-2,49)	0,0284
Bazofili	Apsolutni broj	0,0 (0-0,11)	0,0 (0-0)	0,3173
Limfociti	Apsolutni broj	2,02 (0,99-3,27)	1,72 (0,57-5,57)	0,3842
Trombociti	x 10 ⁹ /L	266,0 (124-422)	201,0 (119-698)	0,4245
MCV	fL	69,0 (62-75)	67,5 (63-73)	0,4736

(Hematološki pokazatelji su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom.) MPV, *Mean Platelet Volume* – prosječan volumen trombocita; MCV, *Mean Corpuscular Volume* – prosječan volumen eritrocita.

5.3.2. ANALIZE SERUMA

5.3.2.1. Biokemijska analiza seruma

U istraživanju početka I stupnja AKI-a u piometri kuja značajne razlike ($p < 0,05$) u vrijednostima biokemijskih pokazatelja su utvrđene za koncentracije CRP, albumina, triglicerida, glukoze, ureje i ukupnog kolesterola te katalitičke koncentracije ALP, lipaze DGGR, ALT, LDH i γ -GT. Pritom su u kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a koncentracije CRP, triglicerida, ukupnog kolesterola, ALP, lipaze DGGR i LDH povišene, a koncentracije albumina, glukoze, ALT, ureje i γ -GT snižene u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (Tablica 9).

Tablica 9.

Tablični prikaz usporedbe biokemijskih pokazatelja u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra početak AKI I (N=18)	Vrijednost p
CRP	mg/L	1,00 (1,0-4,3)	129,3 (3,4-355,2)	<i><0,0001</i>
Albumin	g/L	30,0 (25-31)	24,5 (15-31)	<i><0,0001</i>
Trigliceridi	mmol/L	0,50 (0,3-1,3)	0,80 (0,5-1,6)	<i>0,0003</i>
Glukoza	mmol/L	6,45 (4,6-9,6)	5,05 (2,9-6,3)	<i>0,0005</i>
ALP	U/L	34,0 (10-68)	79,5 (20-234)	<i>0,0009</i>
Ureja	mmol/L	6,05 (3,5-8,7)	3,70 (2,2-7,0)	<i>0,0009</i>
ALT	U/L	34,5 (16-58)	19,5 (9-60)	<i>0,0029</i>
Lipaza DGGR	U/L	36,0 (21-125)	62,5 (28-402)	<i>0,0032</i>
LDH	U/L	62,5 (24-231)	116,0 (41-375)	<i>0,0218</i>
γ -GT	U/L	5,0 (2-8)	3,0 (1-18)	<i>0,0432</i>
Kolesterol ukupni	mmol/L	4,90 (3,3-8,1)	6,00 (2,5-11,4)	<i>0,0484</i>
Bilirubin ukupni	μ mol/L	1,85 (1,1-2,9)	1,35 (0,9-5,5)	<i>0,0569</i>
Proteini ukupni	g/L	60,5 (50-68)	69,0 (40-85)	<i>0,0720</i>
Željezo	μ mol/L	30,20 (13,9-50,7)	20,55 (11,3-57,6)	<i>0,0846</i>

Magnezij ukupni	mmol/L	0,75 (0,6-1,0)	0,80 (0,5-1,0)	0,1333
Fosfat anorganski	mmol/L	1,60 (1,0-2,3)	1,25 (1,0-2,2)	0,1614
Kalcij ukupni	mmol/L	2,50 (2,0-2,8)	2,40 (1,8-2,8)	0,3039
AST	U/L	26,5 (18-58)	34,0 (14-66)	0,4014
Kreatinin	μmol/L	73,5 (44-109)	70,0 (49-109)	0,4229
Klorid	mmol/L	116,0 (110-124)	117,0 (98-122)	0,5354
Kalij	mmol/L	4,45 (3,5-5,0)	4,40 (3,5-5,0)	0,6032
Natrij	mmol/L	146,0 (143-149)	147,0 (126-158)	0,6442
CK	U/L	110,5 (62-233)	132,5 (23-685)	0,8247

(Biokemijski pokazatelji su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom.) CRP, C-reaktivni protein; ALP, alkalna fosfataza; ALT, alanin-aminotransferaza; LDH, laktat-dehidrogenaza; γ-GT, γ-glutamil-transferaza; AST, aspartat-aminotransferaza; CK, kreatinkinaza

5.3.2.2. Neciljana metabolomska analiza seruma

Neciljanom LC-MS metabolomskom metodom su analizirani uzorci seruma kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (N=18) i kontrolne skupine kuja (N=18). U uzorcima seruma (N=36) detektirani su intenziteti 1604 pika (*mz/rt*) koji se odnose na 3545 mogućih metabolita. Provjerom cjelovitosti podataka utvrđen je izostanak 774 (1,3 %) vrijednosti. Od 1604 pika identificiran je 41 sljedeći metabolit: betain, L-karnitin, kreatinin, L-prolin, L-glutamin, N(*pi*)-metil-L-histidin, L-valin, L-leucin, β-alanin, L-alanin, L-fenilalanin, L-citrulin, kolin, L-arginin, L-metionin, 4-trimetil-amonij-butanoat, L-glutamat, L-serin, L-asparagin, N-acetil-

glutamin, citozin, citidin, L-kinurenin, glicin, pantotenat, *trans*-4-hidroksi-L-prolin, 5-oksoprolin, taurin, (S)-malat, (R)-2-hidroksi-glutarat, L-triptofan, *cis*-akoničat, inozin, metil-malonat, sukcinat, malonat, N-acetil-neuraminat, orotat, N-acetil-L-glutamat te L-homoserin i/ili L-treonin.

a) *Fold change* analiza

Fold change analizom su utvrđeni omjeri intenziteta pikova u serumu između kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja. Značajno ($FC \geq 2,0$) je povišen intenzitet 30 pikova, a snižen intenzitet 75 pikova. Intenziteti preostalih 1499 pikova nisu značajno promijenjeni.

b) Studentov *t*-test

Studentovim *t*-testom je u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a u odnosu na kontrolnu skupinu kuja utvrđena značajna ($t\text{-test} \leq 0,05$) promjena intenziteta 645 pikova (Tablica XVIII, Dodatak), dok intenziteti preostalih 959 pikova nisu značajno promijenjeni. U serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a su intenziteti metabolita L-karnitina, malonata, N-acetil-glutamina i orotata povišeni, a pantotenata, L-glutamina, L-prolina, L-citrulina, L-arginina, glicina, L-triptofana, citozina, *trans*-4-hidroksi-prolina, *cis*-akoničata, citidina, kreatinina, L-serina sniženi u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (Tablica 10, Slika 17).

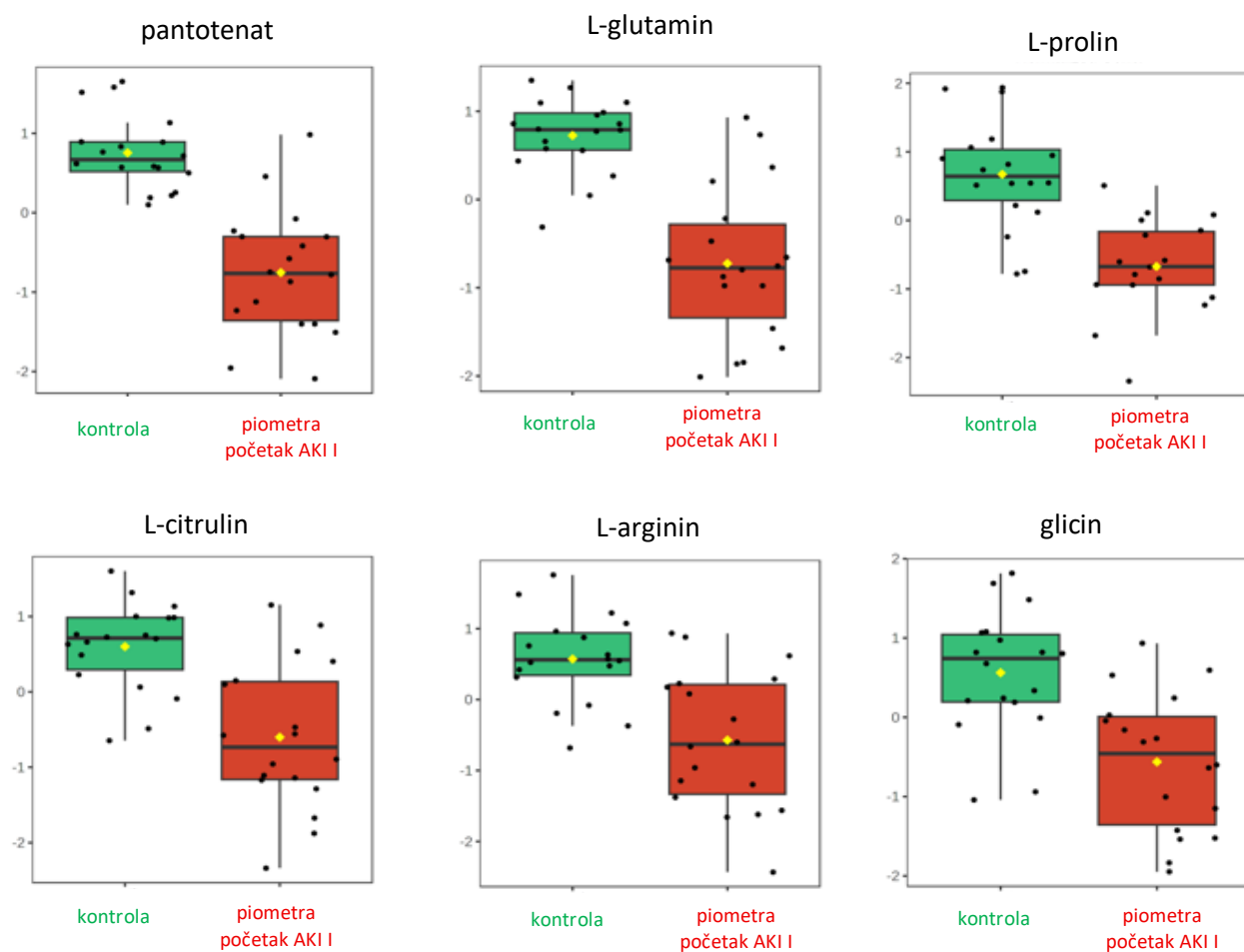
Tablica 10.

Tablični prikaz metabolita (N=17) identificiranih u serumu čiji su intenziteti prema *t*-testu značajno promijenjeni u kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a u odnosu na kontrolnu skupinu kuja.

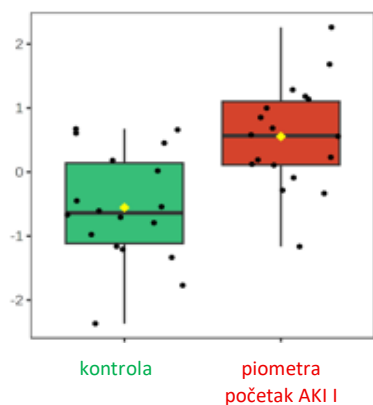
Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Log ₂ (FC)	Vrijednost p	FDR
pantotenat	220,118	454,35	-1,41	5,50E-08	4,42E-06
L-glutamin	147,0763	689,94	-0,63	3,29E-07	1,38E-05
L-prolin	116,0706	611,66	-0,75	4,75E-06	8,66E-05
L-citrulin	176,1029	720,74	-0,85	7,96E-05	7,34E-04
L-arginin	175,119	1216,69	-0,51	2,10E-04	1,53E-03

glicin	76,0393	730,1	-0,61	2,85E-04	1,95E-03
L-karnitin	162,1125	610,4	0,80	3,50E-04	2,31E-03
L-triptofan	203,0831	595,13	-0,52	6,06E-04	3,55E-03
citozin	112,0505	598,36	-0,79	1,14E-03	5,50E-03
<i>trans</i> -4-hidroksi-L-prolin	132,0655	704,73	-0,76	1,19E-03	5,66E-03
malonat	103,0039	721,24	0,71	2,96E-03	1,14E-02
<i>cis</i> -akonitat	173,0095	786,76	-0,44	4,66E-03	1,61E-02
citidin	244,0928	598,88	-0,59	7,05E-03	2,23E-02
N-acetil-glutamin	189,087	529,14	0,47	8,32E-03	2,53E-02
kreatinin	14,0662	510,38	-0,30	1,01E-02	2,93E-02
L-serin	106,0499	736,18	-0,46	1,59E-02	4,14E-02
orotat	155,0101	548,57	0,56	1,75E-02	4,44E-02

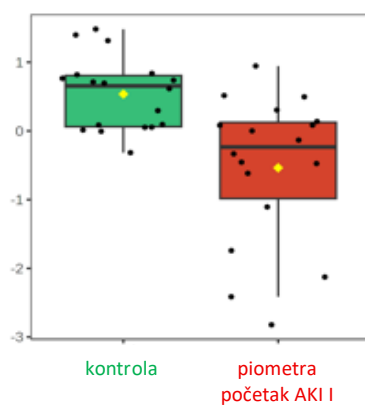
(FDR, *False Discovery Rate* – mjera lažno otkrivenih rezultata)



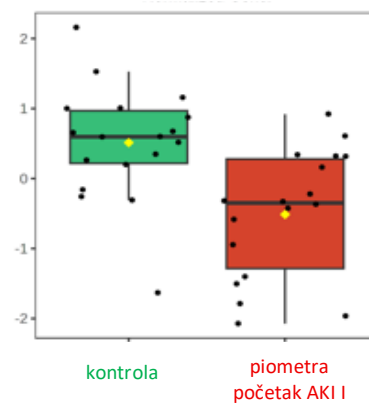
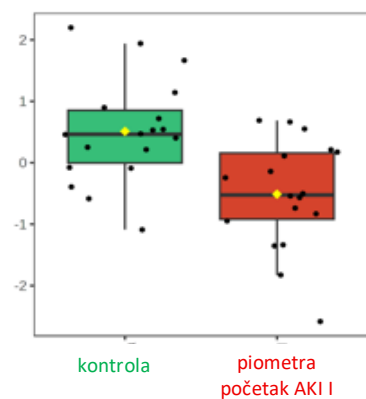
L-karnitin



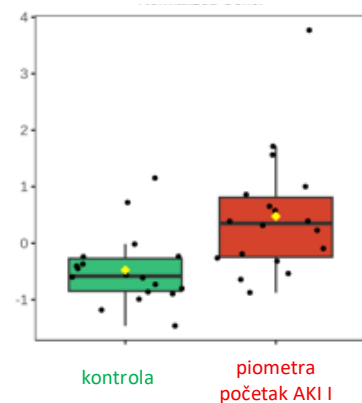
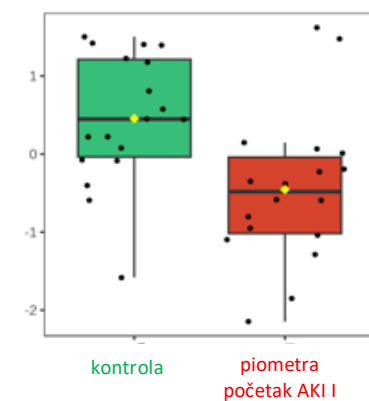
L-triptofan



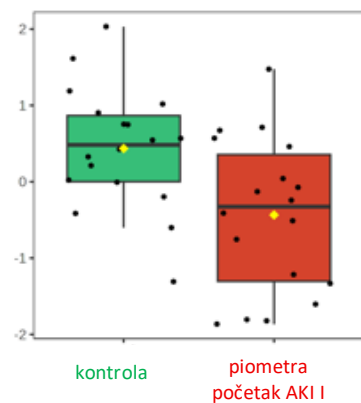
citozin

*trans*-4-hidroksi-L-prolin

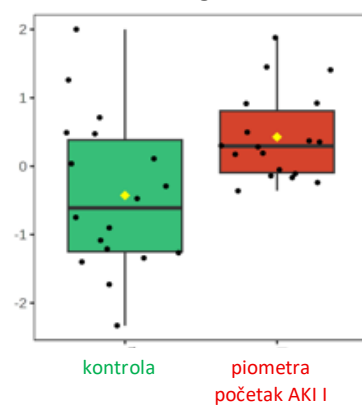
malonat

*cis*-akonitat

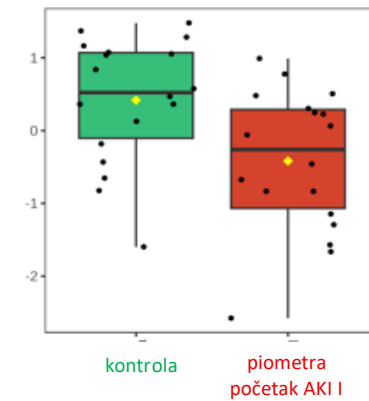
citidin



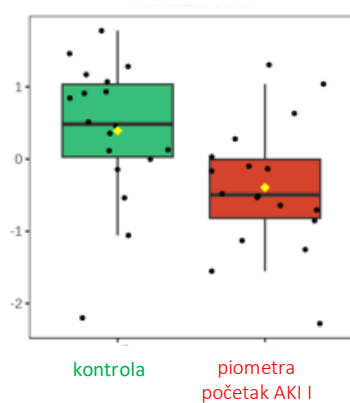
N-acetil-glutamin



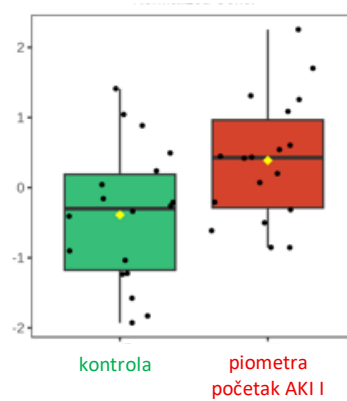
kreatinin



L-serin



orotat

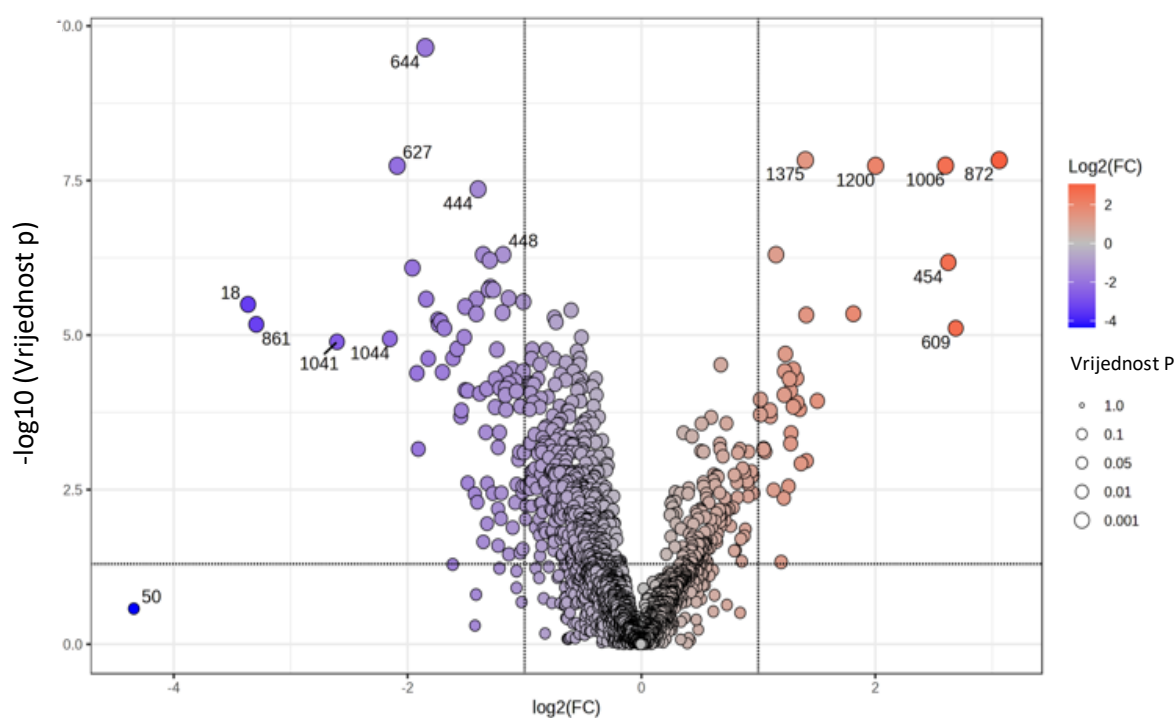


Slika 17.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita identificiranih u serumu čiji su intenziteti prema *t*-testu statistički značajno promijenjeni u kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (crveni pravokutnik) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (zeleni pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Crna vodoravna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)

c) *Volcano* analiza

Volcano analizom su u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a utvrđeni značajno ($FC \geq 2,0$; $t\text{-test} \leq 0,05$) povišeni intenziteti 29 pikova i značajno sniženi intenziteti 71 pika u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenziteti preostala 1504 pika nisu statistički značajno promijenjeni (Slika 18).



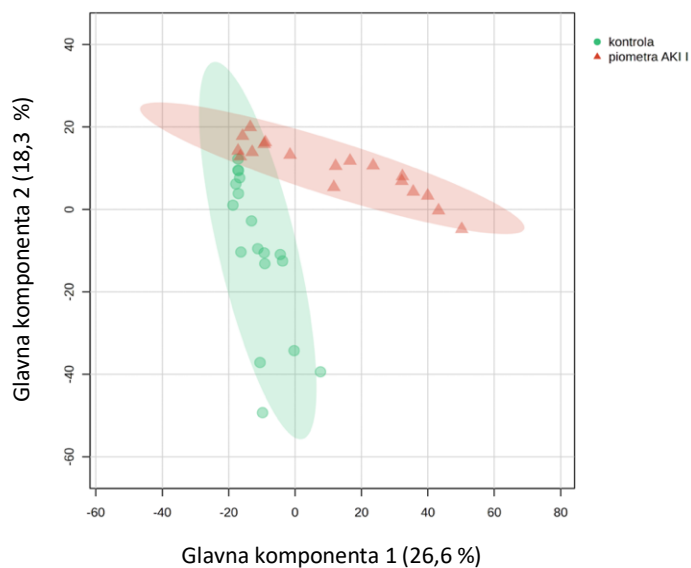
Slika 18.

Grafički prikaz *Volcano* analize intenziteta svih pikova detektiranih u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenzitet pika je statistički značajnije promijenjen, što je udaljeniji od sjecišta (0,0). Najznačajnije promijenjeni intenziteti pikova (N=15) su obilježeni brojem pika iz kromatograma (Tablica XIX, Dodatak).

d) Analiza glavnih komponenti

(engl. *Principal component analysis*; PCA)

PCA analizom intenziteta pikova u serumu ispitane su unutarnje varijacije u skupini kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i u kontrolnoj skupini kuja (Slika 19). Prisutno je djelomično preklapanje dviju skupina kuja.



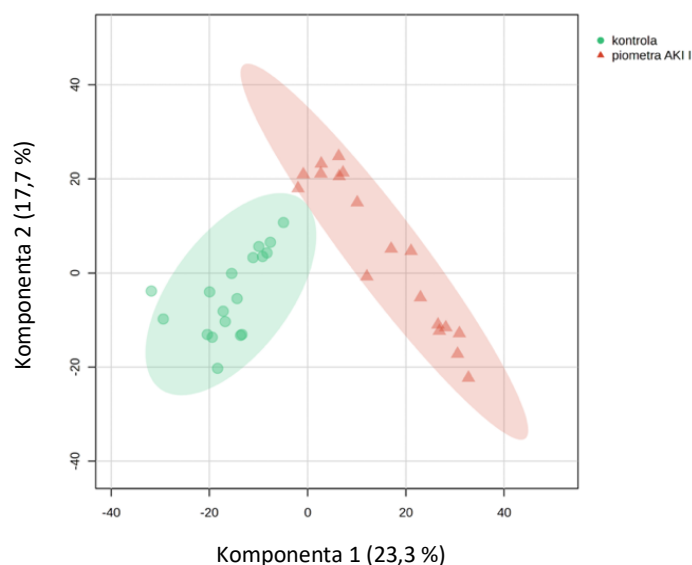
Slika 19.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u serumu skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (crveni trokutići) i kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

e) Djelomična diferencijalna analiza najmanjih kvadrata

(engl. *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*; PLS-DA)

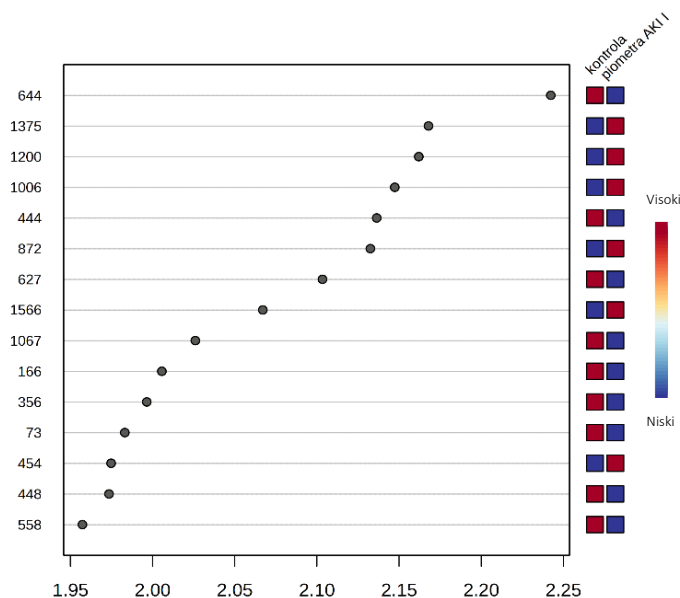
PLS-DA analiza seruma pokazuje vrlo dobro razdvajanje skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a od kontrolne skupine kuja.



Slika 20.

Grafički prikaz PLS-DA analize intenziteta pikova detektiranih u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (crveni trokutići) i kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

Rezultati VIP (*Variable Importance in Projection* – projekcija važnosti varijable) analize upućuju na statistički značajno promijenjene intenzitete pikova u serumu koji najviše doprinose razlikovanju skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a od kontrolne skupine kuja (Slika 21).



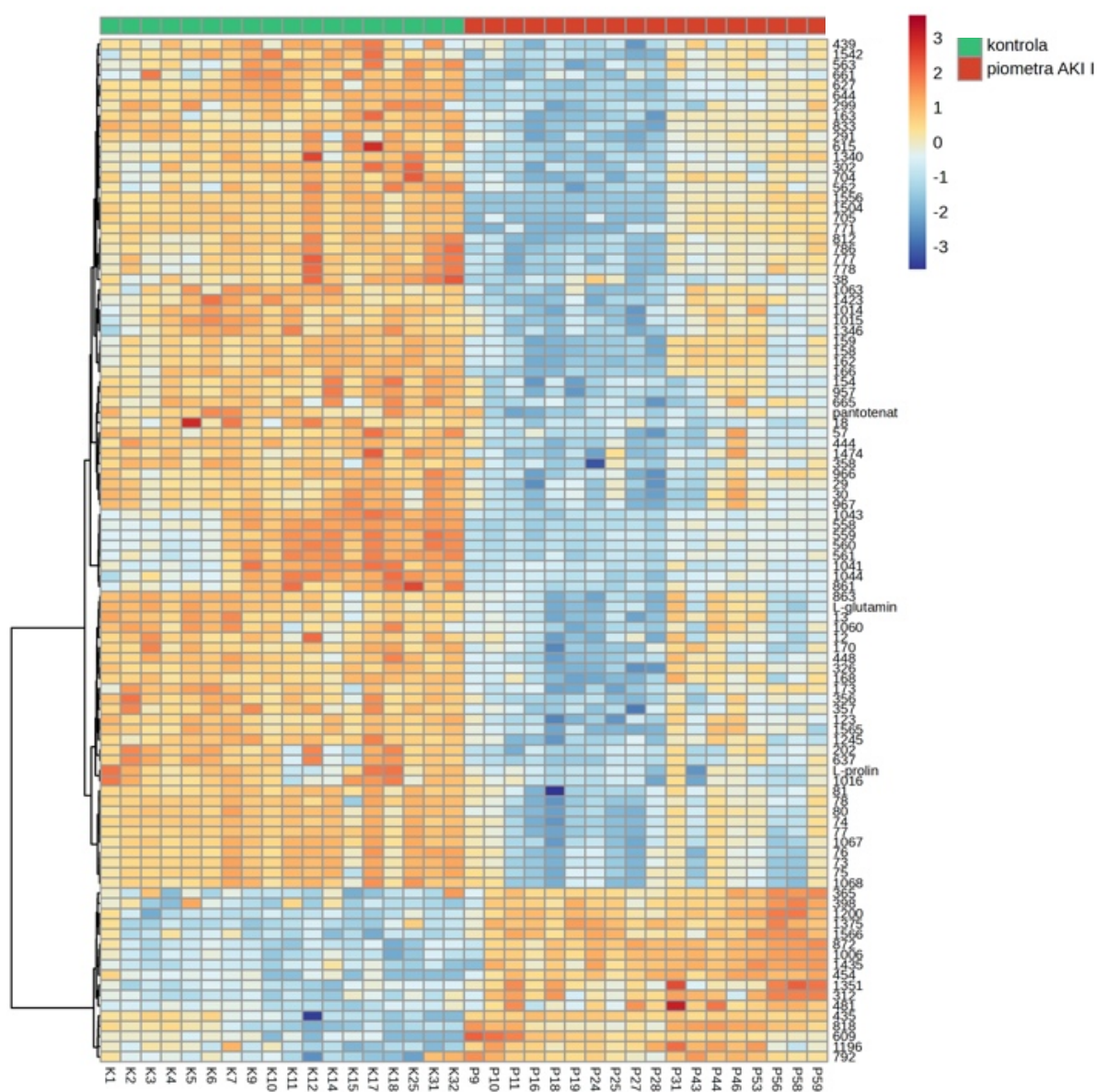
Slika 21.

Grafički prikaz VIP analize intenziteta pikova u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja. Prikazani su pikovi (N=15) čiji intenziteti najviše doprinose

razlikovanju navedenih skupina (Tablica XX, Dodatak). (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)

f) Analiza hijerarhijskog grupiranja

Hijerarhijskim grupiranjem su analizirani odnosi između intenziteta najznačajnijih pikova detektiranih u serumu kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5 (Slika 22). Analiza hijerarhijskog grupiranja pokazuje dobru razliku između skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja.

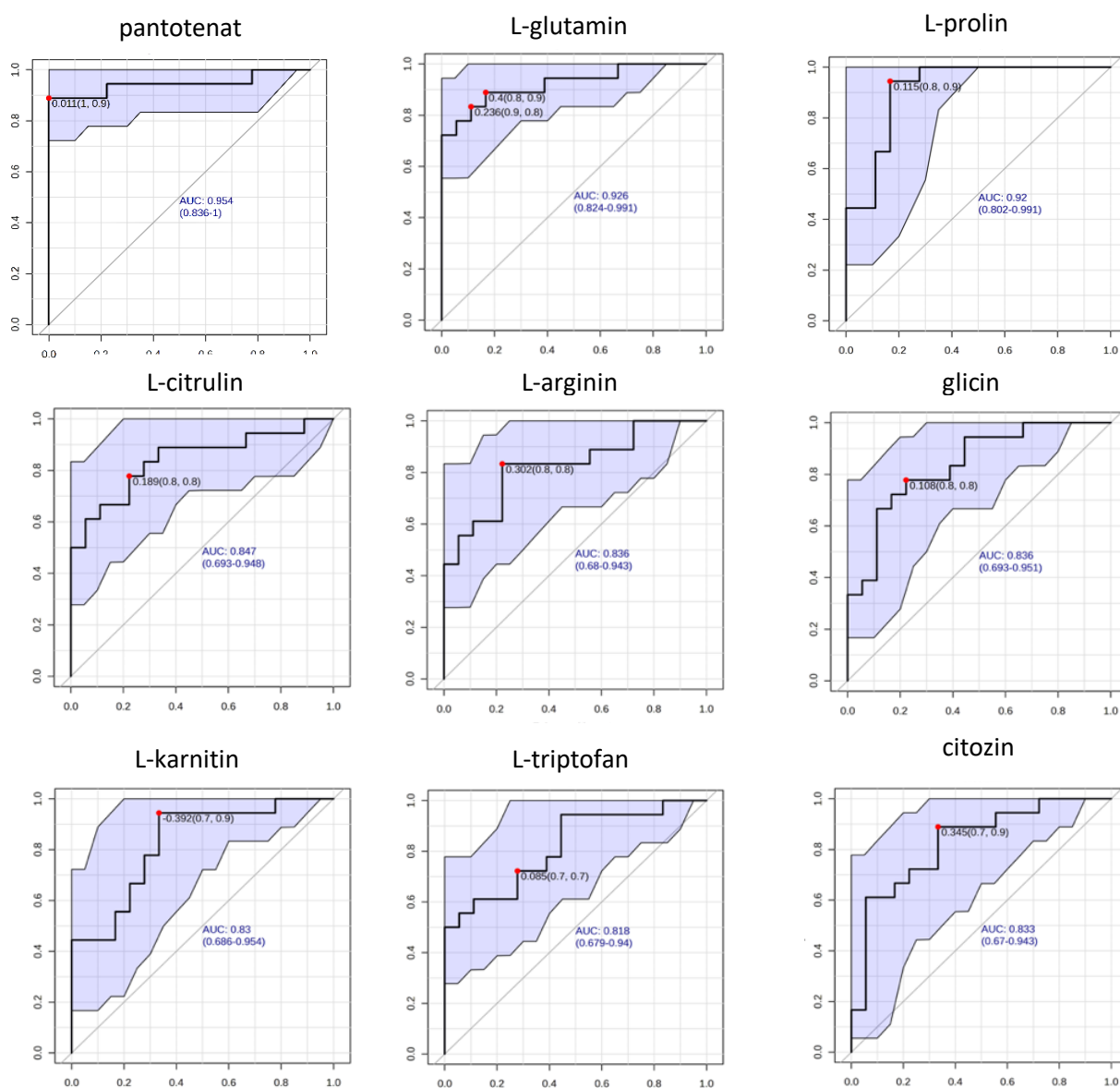


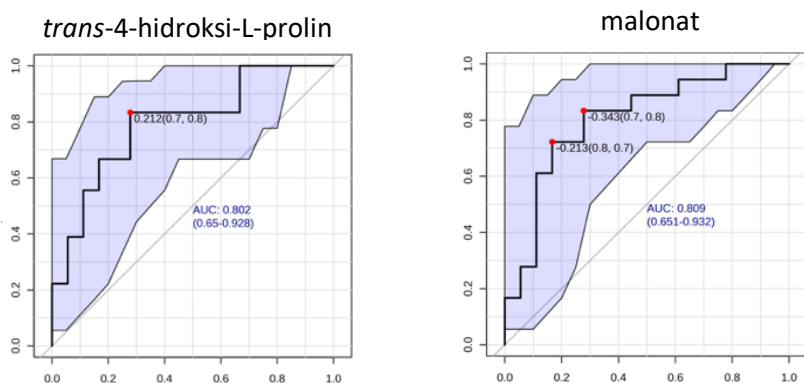
Slika 22.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja prema Studentovom t -testu između najznačajnije promijenjenih intenziteta pikova ($N=100$) u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (crveni panel) i kontrolne skupine kuja (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazane tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)

g) Analiza biomarkera

Analiza biomarkera je uključila analizu pojedinačnih ROC krivulja za identificirane i značajno promijenjene ($p < 0,05$) metabolite (Slika 23). L-Citrulin, L-arginin, glicin, L-karnitin, L-triptofan, citozin, *trans*-4-hidroksi-L-prolin i malonat ostvaruju $AUC > 0,8$. Pantotenat, L-glutamin i L-prolin pokazuju osobine odličnih biomarkera s $AUC > 0,9$.





Slika 23.

Grafički prikaz ROC krivulja značajno promijenjenih ($p < 0,05$) metabolita u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a. Prikazani su AUC i 95 % CI. (Os apscisa predstavlja lažno pozitivne vrijednosti, tj. specifičnost, a os ordinata prave pozitivne vrijednosti, tj. osjetljivost.)

h) Analiza bioloških puteva

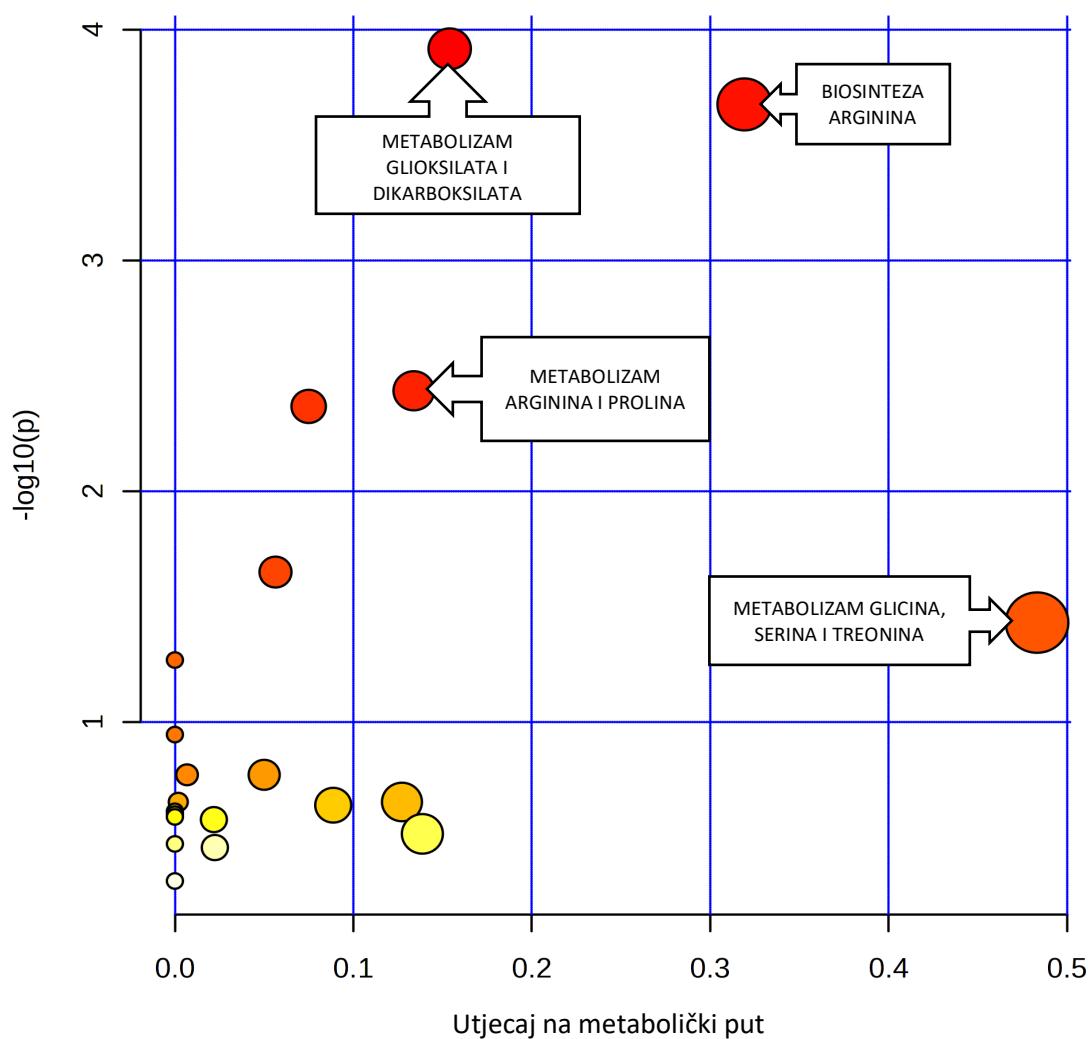
Za otkrivanje statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva u piometri na početku I stupnja AKI-a poslužili su značajno promijenjeni ($p < 0,05$) metaboliti identificirani u mokraći kuja s piometrom. Statistički najznačajnije promijenjeni metabolički putevi su metabolizam biosinteze arginina, metabolizam glioksilata i dikarboksilata, metabolizam glicina, serina i treonina te metabolizam arginina i prolina (Tablica 11, Slika 24).

Tablica 11.

Tablični prikaz statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva i pripadajućih metabolita identificiranih u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a. Istaknuti su metabolički putevi sa statističkom značajnošću $p < 0,05$ i utjecajem na put $> 0,1$.

Metabolički put	Metabolit	Vrijednost p	Utjecaj na metabolički put
Metabolizam glioksilata i dikarboksilata	<i>cis</i> -akonitat	1,21E-04	0,15
	L-serin		
	glicin		
	L-glutamin		
Biosinteza arginina	L-arginin	2,11E-04	0,32
	L-citrulin		
	L-glutamin		

Metabolizam arginina i prolina	L-arginin hidroksi-prolin L-prolin	3,67E-03	0,13
Metabolizam glicina, serina i treonina	L-serin glicin	3,71E-02	0,48



Slika 24.

Grafički prikaz statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva određenih prema statistički značajno promijenjenim metabolitima identificiranim u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a. (Promjer kruga je proporcionalan broju metabolita identificiranih u metaboličkom putu. Tonovima od bijele do crvene boje je predložena kumulativna statistička značajnost puta i utjecaj na metabolički put.)

5.3.3. ANALIZE MOKRAĆE

5.3.3.1. Fizikalna i biokemijska analiza mokraće

U istraživanju piometre kuja na početku I stupnja AKI-a analizirani su fizikalni i biokemijski pokazatelji mokraće kuja s piometrom (N=18) i kontrolne skupine kuja (N=18) (Tablica 12). U mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a je značajno promijenjena ($p < 0,05$) koncentracija ukupnih proteina i natrija te UPCR-a i osmolalnosti u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Pritom su koncentracije ukupnih proteina te UPCR-a značajno povišene, a koncentracija natrija i osmolalnost značajno snižene.

Tablica 12.

Tablični prikaz usporedbe fizikalnih i biokemijskih pokazatelja mokraće kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra početak AKI I (N=18)	Vrijednost p
Proteini ukupni	mg/L	0,153 (0,039-0,918)	0,6650 (0,106-1,760)	<i><0,0001</i>
UPCR	/	0,060 (0,04-0,20)	0,395 (0,07-1,36)	<i><0,0001</i>
Natrij	mmol/L	129,6 (30,2-311,2)	23,2 (14,1-320,5)	<i>0,0099</i>
Osmolalnost	mOsmol/kg	1,359 (0,484-2,455)	0,8620 (0,269-1,886)	<i>0,0378</i>
Ureja	mmol/L	800,85 (242,8-1598,1)	533,10 (129,5-1416,9)	0,1489
USG	/	1,034 (1,013-1,064)	1,023 (1,009-1,052)	0,1589
Kreatinin	mmol/L	23,175 (5,32-39,83)	14,155 (2,90-37,90)	0,3888
Glukoza	mmol/L	0,469 (0,110-1,367)	0,484 (0,018-1,211)	0,9118

(Fizikalni i biokemijski pokazatelji mokraće su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom) UPCR, engl. *Urine Protein to Creatinine Ratio*, omjer proteina i kreatinina u mokraći; USG, engl. *Urine Specific Gravity*, specifična težina mokraće.

5.3.3.2. Neciljana metabolomska analiza mokraće

Neciljanom metabolomskom LC-MS metodom je analizirana mokraća skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (N=18) i mokraća kontrolne skupine kuja (N=18). U svim uzorcima mokraće (N=36) su detektirani relativni intenziteti (mz/rt) ukupno 1149 pikova koji se odnose na 1954 mogućih metabolita. Od 1149 pikova su identificirani sljedeći metaboliti (N=12): kreatinin, betain, N(*pi*)-metil-L-histidin, N-acetil-glutamin, L-glutamat, D-glukonska kiselina, *cis*-akonitat, alantoin, D-galakatar, L-glutamin te L-homoserin i/ili L-treonin.

Bioinformatičkom obradom podataka vidljivo se izdvajao uzorak mokraće jedne kuje (engl. *outlier*) koji je isključen iz daljnje analize radi dobivanja točnih rezultata. Prvotnom provjerom cjelovitosti podataka (N=36) je utvrđen izostanak 403 (1 %) vrijednosti, a nakon isključivanja *outliera* (N=35) utvrđen je izostanak 173 (0,4 %) vrijednosti. (Tablični i grafički prikazi bioinformatičke obrade podataka mokraće kuja s *outliera* (N=36) su prikazani u Prilogu.)

a) *Fold change* analiza

Fold change analizom su utvrđeni omjeri intenziteta pikova u mokraći između kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja. Značajno ($FC \geq 2,0$) je povišen intenzitet 132 pika, a snižen intenzitet 5 pikova. Intenziteti preostalih 1013 pikova nisu značajno promijenjeni.

b) Studentov *t*-test

Studentovim *t*-testom je utvrđen statistički značajno promijenjen intenzitet 261 pika (Tablica XXI, Dodatak), dok intenziteti preostalih 898 pikova nisu statistički značajno promijenjeni. U mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a su povišeni intenziteti L-glutamata, *cis*-

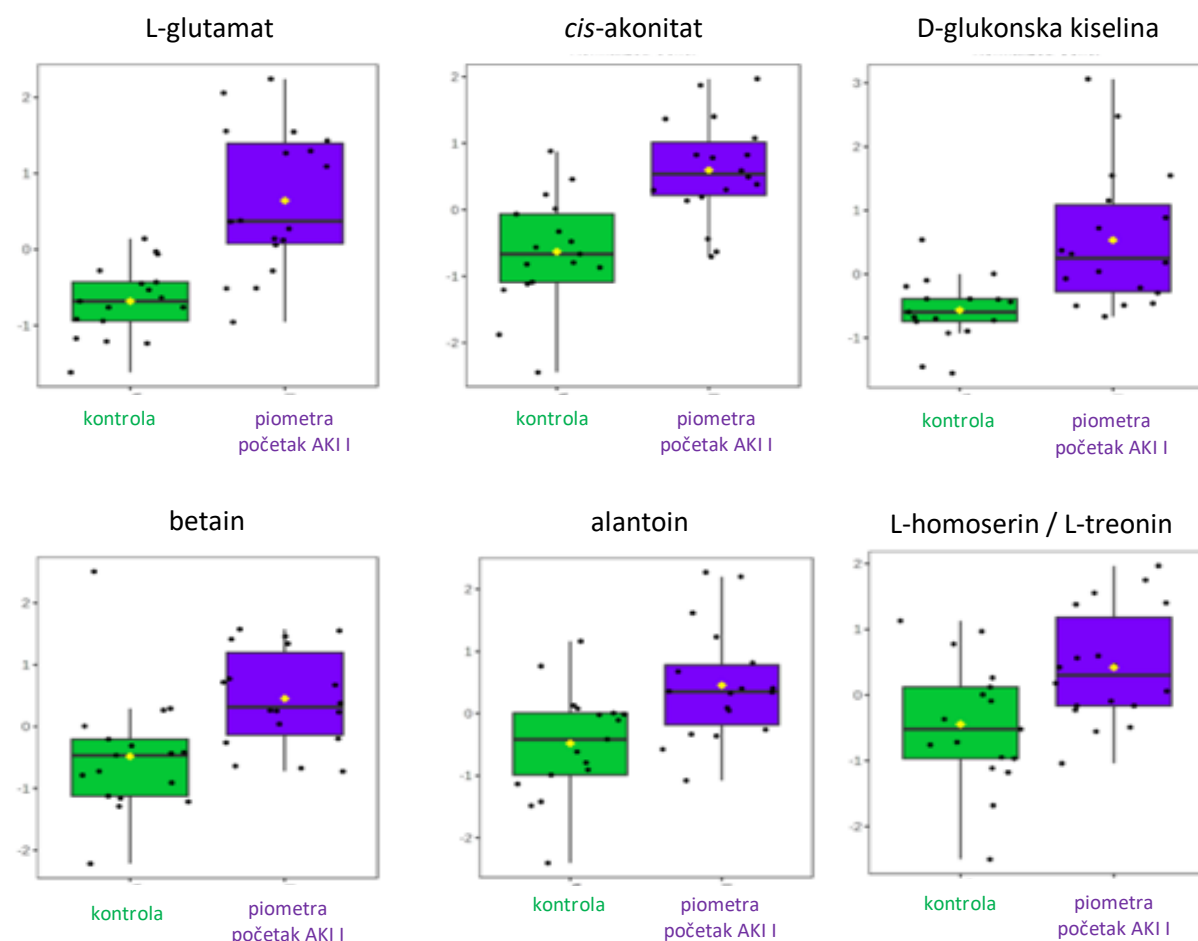
akonitata, D-glukonske kiseline, betaina, alantoina i L-homoserina i/ili L-treonina u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (Tablica 13, Slika 25).

Tablica 13.

Tablični prikaz metabolita identificiranih u mokraći (N=7) čiji su intenziteti prema *t*-testu značajno promijenjeni u kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a u odnosu na kontrolnu skupinu kuja.

Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Log ₂ (FC)	Vrijednost p	FDR
L-glutamat	148,0604	660,74	1,83	1,03E-05	2,53E-04
<i>cis</i> -akonitat	173,0094	772,58	0,88	6,53E-05	9,87E-04
D-glukonska kiselina	195,0513	648,16	2,07	5,00E-04	4,57E-03
betain	118,0862	555,09	0,54	3,99E-03	2,20E-02
alantoin	157,037	732,09	0,49	4,04E-03	2,22E-02
L-homoserin / L-treonin	118,0513	675,89	0,60	8,18E-03	3,93E-02

(FDR, *False Discovery Rate* – mjera lažno otkrivenih rezultata)

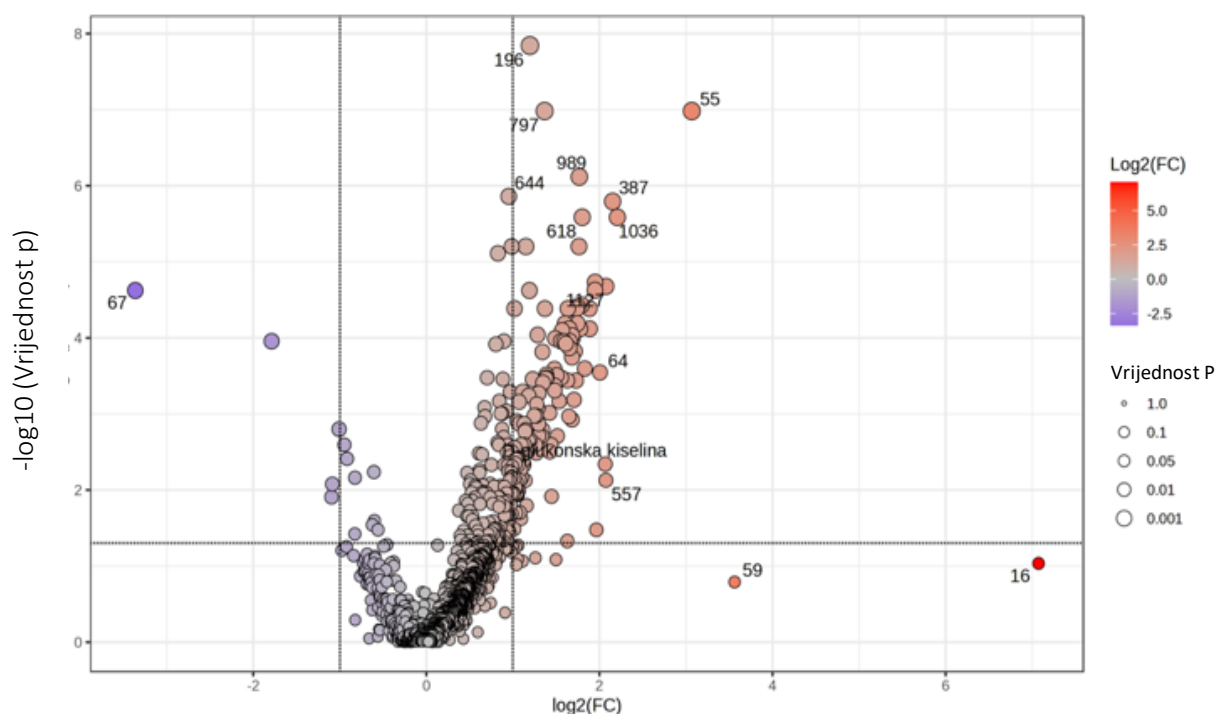


Slika 25.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita identificiranih u mokraći čiji su intenziteti prema *t*-testu statistički značajno promijenjeni u kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (ljubičasti pravokutnik) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (zeleni pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Vodoravna crna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)

c) *Volcano* analiza

Volcano analizom su u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a utvrđeni značajno ($FC \geq 2,0$; $t\text{-test} \leq 0,05$) povišeni intenziteti 123 pika i značajno sniženi intenziteti 5 pikova u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenziteti preostala 1022 pika nisu statistički značajno promijenjeni (Slika 26).

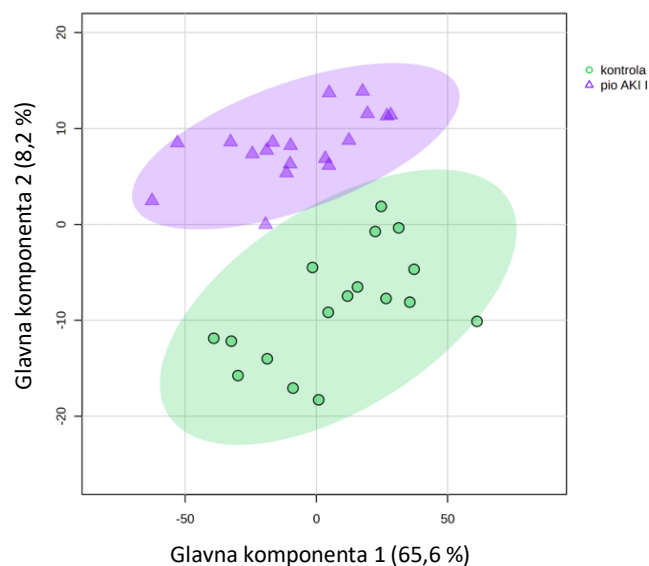


Slika 26.

Grafički prikaz *Volcano* analize intenziteta svih pikova detektiranih u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Intenzitet pika je statistički značajnije promijenjen, što je udaljeniji od sjecišta (0,0). Statistički najznačajnije promijenjeni intenziteti pikova (N=15) su obilježeni brojem pika iz kromatograma (Tablica XXII, Dodatak).

d) Analiza osnovnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA)

PCA analizom intenziteta pikova u mokraći ispitane su unutarnje varijacije u skupini kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i u kontrolnoj skupini kuja (Slika 27).



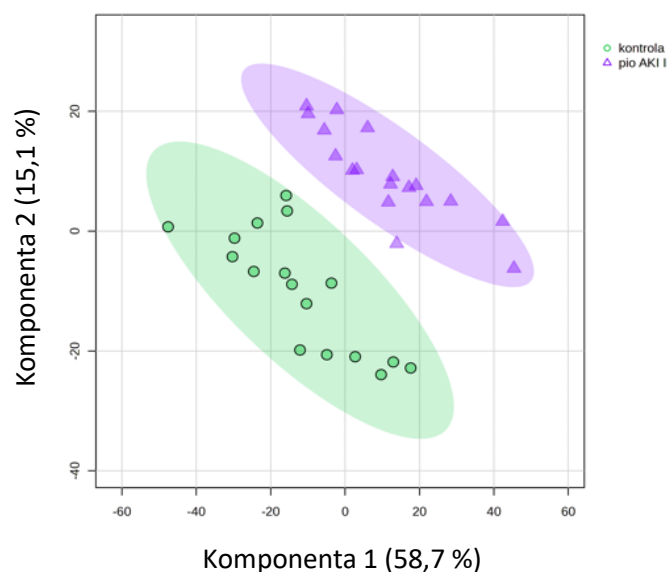
Slika 27.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (ljubičasti trokutići) i mokraći kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

e) Djelomična diferencijalna analiza najmanjih kvadrata

(engl. *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*; PLS-DA)

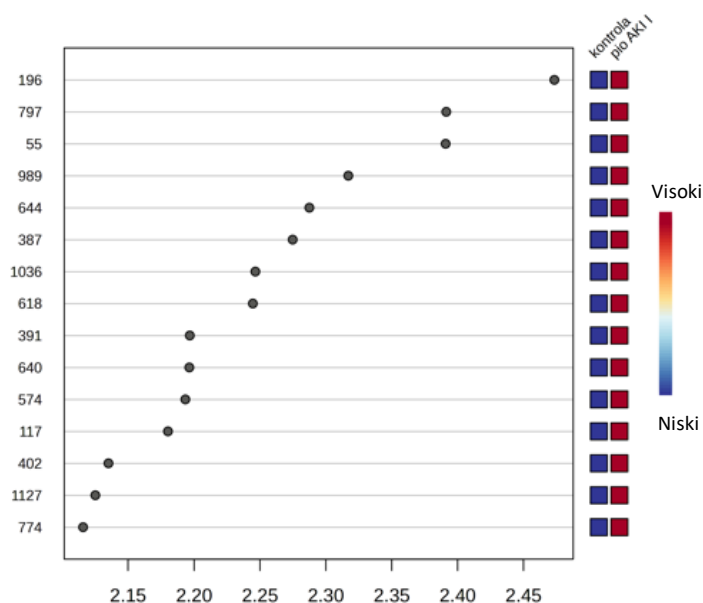
PLS-DA analiza mokraće pokazuje odlično razdvajanje skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja.



Slika 28.

Grafički prikaz PLS-DA analize intenziteta pikova u mokraći kuja na početku I stupnja AKI-a (ljubičasti trokutići) i kontrolne skupine kuja (zeleni kružići).

Rezultati VIP (*Variable Importance in Projection* – projekcija važnosti varijable) analize upućuju na statistički značajno promijenjene pikove (N=15) čiji su intenziteti najviše doprinjeli razlikovanju metaboloma mokraće kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a od kontrolne skupine kuja (Slika 29).



Slika 29.

Grafički prikaz VIP analize mokraće kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i kontrolne skupine kuja. Prikazani su pikovi (N=15) čiji intenziteti najviše doprinose razlikovanju

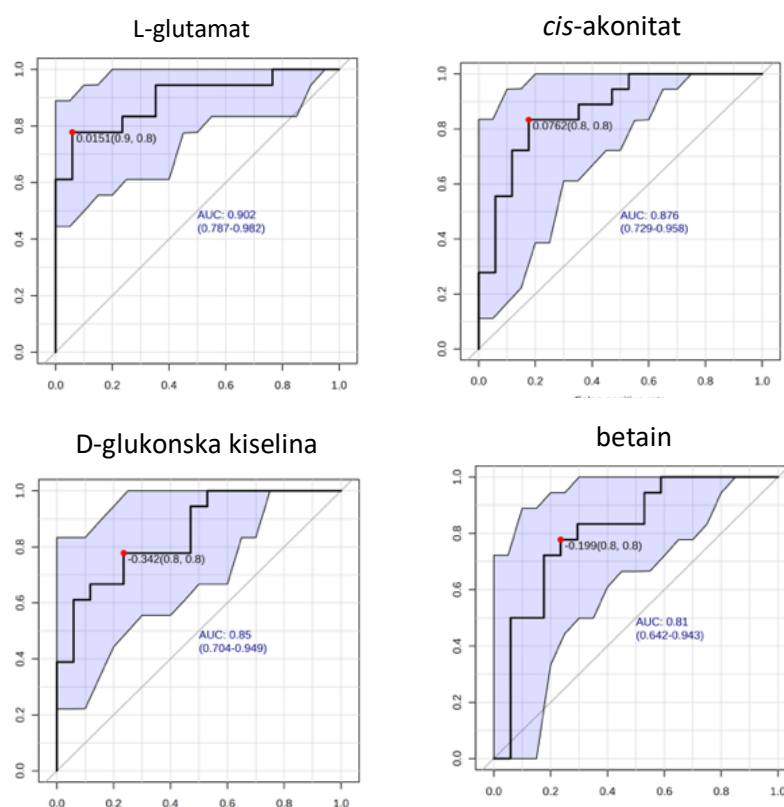
f) Analiza hijerarhijskog grupiranja

Slika 30.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja prema Studentovom t -testu između najznačajnije promijenjenih intenziteta pikova ($N=100$) u mokraći između kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (ljubičasti panel) i kontrolne skupine kuja (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazani tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)

g) Analiza biomarkera

Analiza biomarkera je uključila analizu pojedinačnih ROC krivulja za identificirane i značajno promijenjene ($p < 0,05$) metabolite (Slika 31). *Cis*-akonitat, D-glukonska kiselina i betain ostvaruju $AUC > 0,8$, dok L-glutamat pokazuje osobine odličnog biomarkera s $AUC > 0,9$.



Slika 31.

Grafički prikaz ROC krivulja značajno promijenjenih ($p < 0,05$) metabolita u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a. Prikazani su AUC i 95 % CI. Os apscisa predstavlja lažno pozitivne vrijednosti, tj. specifičnost, a os ordinata prave pozitivne vrijednosti, tj. osjetljivost.

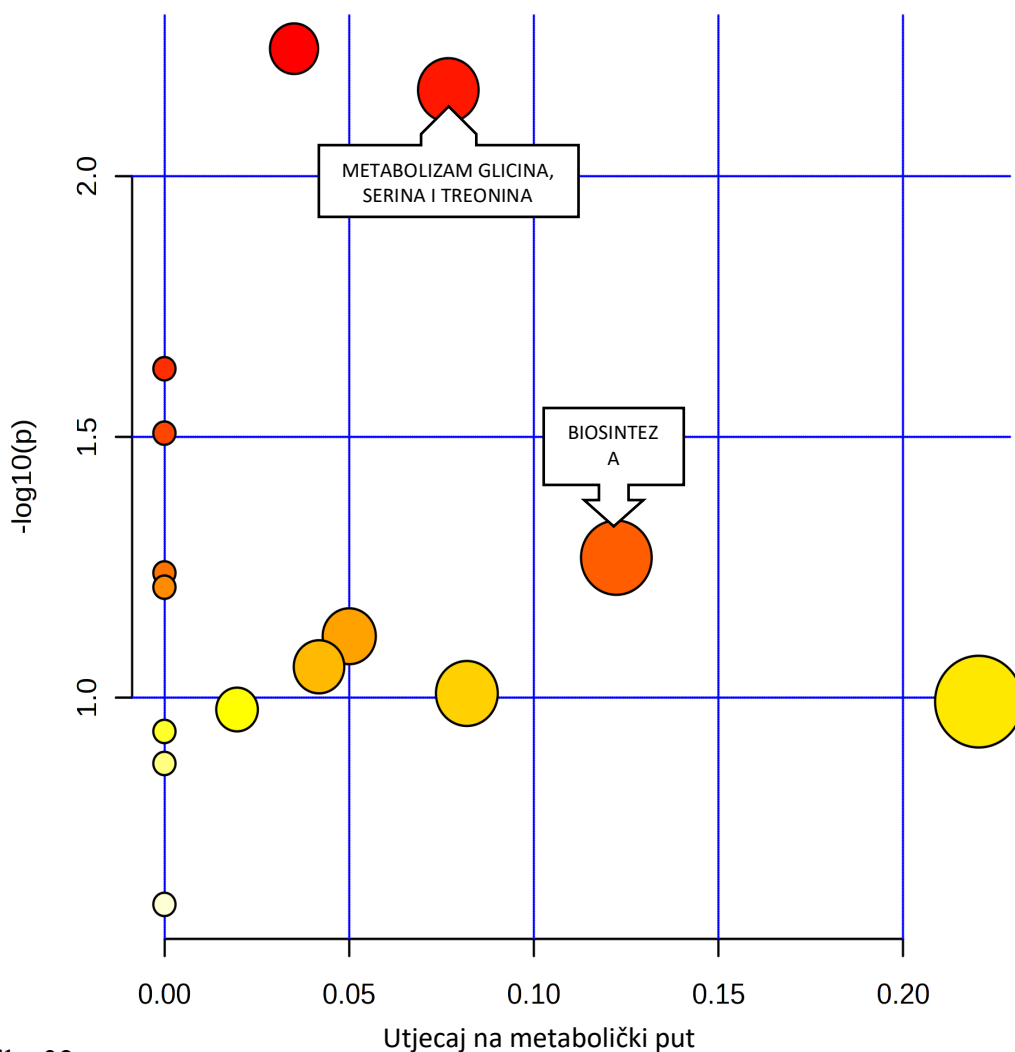
h) Analiza bioloških puteva

Identificirani i statistički značajno promijenjeni metaboliti u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a su poslužili za otkrivanje statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva ranih metaboličkih promjena u piometri (Tablica 14, Slika 32). U metabolomu mokraće kuja s piometrom prema kriteriju $p < 0,05$ i utjecaja na put $> 0,1$ nije značajno promijenjen niti jedan metabolički put. Uz primjenu kriterija $p < 0,06$ i utjecaja na put $> 0,7$, najznačajnije su promijenjeni metabolizam glicina, serina i treonina te biosinteza arginina.

Tablica 14.

Tablični prikaz statistički najznačajnije promijenjenih metaboličkih puteva s pripadajućim identificiranim, statistički značajno promijenjenim metabolitima u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a.

Metabolički put	Metabolit	Vrijednost p	Utjecaj na metabolički put
Metabolizam glicina, serina i treonina	betain L-treonin	6,84E-03	0,08
Biosinteza arginina	L-glutamat	5,39E-02	0,12



Slika 32.

Grafički prikaz statistički značajno promijenjenih metaboličkih puteva u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a određenih prema identificiranim i statistički značajno promijenjenim metabolitima u mokraći. (Promjer kruga je proporcionalan broju metabolita identificiranih u metaboličkom putu. Tonovima od bijele do crvene boje je predložena kumulativna statistička značajnost puta i utjecaj na metabolički put.)

5.4. ISTRAŽIVANJE POVEZANOSTI PROTEINURIJE I POČETKA RAZVOJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA U PIOMETRI KUJA

Radi uvida u metaboličke promjene kuja s piometrom koje su na početku razvoja AKI-a, neciljanom metabolomskom LC-MS metodom su uspoređeni uzorci seruma kontrolne skupine kuja (N=18) i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a koje su podijeljene na skupinu kuja s UPCR <0,5 (N=11) i skupinu kuja s UPCR >0,5 (N=7). Svakoj skupini kuja su zasebno statistički obrađene vrijednosti pokazatelja kompletne krvne slike (Tablica 15), biokemijskih pokazatelja seruma (Tablica 16) i mokraće te fizikalnih pokazatelja mokraće (Tablica 19).

5.4.1. ANALIZA PUNE KRVI

Značajne razlike ($p < 0,05$) pokazatelja hemograma između kuja s piometrom s AKI I i UPCR <0,5, kuja s piometrom s AKI I i UPCR >0,5 i kontrolne skupine kuja su utvrđene za ukupni broj leukocita i eritrocita, apsolutni broj nesegmentiranih neutrofila, monocita, limfocita i eozinofila te hematokrit, hemoglobin i MPV (Tablica 15).

Tablica 15.

Tablični prikaz usporedbe pokazatelja kompletne krvne slike kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s vrijednostima UPCR >0,5, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s vrijednostima UPCR <0,5 i kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra početak AKI I		Vrijednost p
			UPCR <0,5 (N=11)	UPCR >0,5 (N=7)	
Nesegmentirani neutrofili	Apsolutni broj	0,00 ^{a,b} (0-0,11)	1,60 ^a (0,10-18,90)	3,70 ^b (1,80-27,50)	<0,0001
Leukociti	x 10 ⁹ /L	7,80 ^{a,b} (5,4-10,6)	17,20 ^a (6,2-60,8)	20,40 ^b (9,4-35,2)	0,0001
Monociti	Apsolutni broj	0,22 ^{a,b} (0,07-0,67)	1,40 ^a (0,40-3,70)	1,60 ^b (0,90-3,90)	<0,0010
Segmentirani neutrofili	Apsolutni broj	4,94 ^a (2,75-7,43)	9,24 ^a (3,84-38,30)	11,40 (2,82-14,42)	0,0050

Hematokrit	%	44,5 ^{a,b} (37-54)	36,0 ^a (19-56)	37,0 ^b (11-47)	0,0190
Hemoglobin	g/L	153,5 ^{a,b} (127-186)	128,0 ^a (68-205)	124,0 ^b (41-162)	0,0205
MPV	fL	9,0 ^{a,b} (8-12)	11,0 ^a (8-12)	11,0 ^b (8-12)	0,0268
Eritrociti	x 10 ¹² /L	6,65 ^{a,b} (5,3-7,8)	5,40 ^a (2,9-8,1)	5,50 ^b (1,7-6,9)	0,0289
Eozinofili	Apsolutni broj	0,36 (0,00-1,27)	0,10 (0,00-2,50)	0,10 (0,40)	0,0847
MCV	fL	69,0 (62-75)	69,0 (65-73)	66,0 (63-70)	0,2513
Trombociti	x 10 ⁹ /L	266,0 (124-422)	301,0 (119-698)	197,0 (163-499)	0,3236
Bazofili	Apsolutni broj	0,00 (0,00-0,11)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,3575
Limfociti	Apsolutni broj	2,02 (0,99-3,27)	1,80 (0,60-4,50)	1,60 (1,00-5,60)	0,9830

(Hematološki pokazatelji su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom. MPV, *Mean Platelet Volume* – prosječan volumen trombocita; MCV, *Mean Corpuscular Volume* – prosječan volumen eritrocita.)

5.4.1. ANALIZE SERUMA

5.4.1.1. Biokemijska analiza seruma

U istraživanju povezanosti proteinurije i početka I stupnja AKI-a u piometri kuja uspoređeni su biokemijski pokazatelji kontrolne skupine kuja (N=18), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 (N=11) te kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (N=7). Značajne razlike (p <0,05) u vrijednostima biokemijskih pokazatelja su utvrđene za koncentracije CRP-a, albumina, triglicerida, ureje, glukoze i ukupnih proteina te katalitičke koncentracije ALP, lipaze DGGR i ALT (Tablica 16).

Tablica 16.

Tablični prikaz usporedbe biokemijskih pokazatelja kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 te kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra početak AKI I		Vrijednost p
			UPCR <0,5 (N=11)	UPCR >0,5 (N =7)	
CRP	mg/L	1,00 ^{a,b} (1,0-4,3)	153,50 ^a (3,4-355,2)	109,30 ^b (75,0-263,0)	<0,0001
Albumin	g/L	30,0 ^{a,b} (25-31)	25,0 ^a (17-31)	24,0 ^b (15-26)	0,0004
Trigliceridi	mmol/L	0,50 ^{a,b} (0,3-1,3)	0,80 ^a (0,5-1,3)	0,80 ^b (0,5-1,6)	0,0013
ALP	U/L	34,0 ^{a,b} (10-68)	78,0 ^a (22-225)	113,0 ^b (20-234)	0,0041
Ureja	mmol/L	6,05 ^{a,b} (3,5-8,7)	3,70 ^a (2,2-7,0)	3,70 ^b (2,7-7,0)	0,0041
Glukoza	mmol/L	6,45 ^{a,b} (4,6-9,6)	5,30 ^a (2,9-6,3)	4,50 ^b (3,4-6,1)	0,0047
Lipaza DGGR	U/L	36,0 ^{a,b} (21-125)	68,0 ^a (43-301)	49,0 ^b (28-227)	0,0080
ALT	U/L	34,5 ^{a,b} (16-58)	20,0 ^a (9-60)	18,0 ^b (10-46)	0,0119
Proteini ukupni	g/L	60,5 ^a (50-68)	65,0 (40-73)	72,0 ^a (50-85)	0,0156
LDH	U/L	62,5 (24-231)	106,0 (61-347)	214,0 (41-375)	0,0580
Bilirubin ukupni	μmol/L	1,85 (1,1-2,9)	1,20 (0,9-3,1)	1,40 (1,0-5,5)	0,0697
AST	U/L	26,5 (18-58)	31,0 (14-45)	46,0 (18-66)	0,0855
Kolesterol ukupni	mmol/L	4,90 (3,3-8,1)	6,90 (4,1-11,4)	5,70 (2,5-9,9)	0,1082

γ -GT	U/L	5,0 (2-8)	3,0 (1-18)	3,0 (2-6)	0,1273
Fosfat anorganski	mmol/L	1,60 (1,0-2,3)	1,20 (1,0-2,2)	1,60 (1,1-1,9)	0,1713
Željezo	μ mol/L	30,2 (13,9-50,7)	21,20 (11,3-57,6)	19,90 (11,7-46,7)	0,2250
Magnezij ukupni	mmol/L	0,75 (0,6-1,0)	0,80 (0,5-1,0)	0,80 (0,5-0,9)	0,2873
Kalcij ukupni	mmol/L	2,50 (2,0-2,8)	2,40 (1,8-2,8)	2,40 (2,0-2,6)	0,5734
Kreatinin	μ mol/L	73,5 (44-109)	73,0 (49-109)	70,0 (54-86)	0,6119
CK	U/L	110,5 (62-233)	129,0 (26-586)	137,0 (23-685)	0,7301
Natrij	mmol/L	146,0 (143-149)	145,0 (126-158)	147,0 (128-156)	0,7430
Kalij	mmol/L	4,45 (3,5-5,0)	4,40 (3,5-5,0)	4,30 (3,8-4,9)	0,7980
Klorid	mmol/L	116,0 (110-124)	117,0 (98-122)	117,0 (105-120)	0,8151

(Biokemijski pokazatelji su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom.) CRP, C-reaktivni protein; ALP, alkalna fosfataza; ALT, alanin-aminotransferaza; LDH, laktat-dehidrogenaza; γ -GT, γ -glutamil-transferaza; AST, aspartat-aminotransferaza; CK, kreatinkinaza

5.4.1.2. Neciljana metabolomska analiza seruma

U uzorcima seruma (N=36) detektirani su relativni intenziteti (mz/rt) 1604 pika koji se odnose na mogućih 3545 metabolita. Provjerom cjelovitosti podataka utvrđen je izostanak 774 (1,3 %) vrijednosti. Od 1604 pika je identificiran sljedeći 41 metabolit: L-karnitin, kreatinin, L-prolin, L-glutamin, L-valin, L-leucin, β -alanin, L-alanin, L-fenilalanin, L-citrulin, kolin, L-arginin, L-metionin, 4-trimetil-amonij-butanoat, L-glutamat, L-serin, L-asparagin, N-acetil-glutamin,

citozin, citidin, L-kinurenin, glicin, pantotenat, *trans*-4-hidroksi-L-prolin, taurin, 5-oksoprolin, (S)-malat, (R)-2-hidroksi-glutarat, L-triptofan, *cis*-akonitat, betain, inozin, metil-malonat, suksinat, malonat, N-acetil-neuraminat, orotat, N-acetil-L-glutamat te L-homoserin i/ili L-treonin.

a) One-way ANOVA & *post-hoc* analiza

One-way ANOVA i *post-hoc* analizom su utvrđeni statistički značajno promijenjeni intenziteti 504 pika (Tablica XXIV, Dodatak), dok intenziteti preostalih 1100 pikova nisu statistički značajno promijenjeni. U serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 te serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 su intenziteti metabolita pantotenata, L-glutamina, L-prolina, L-citrulina, glicina, L-triptofana, L-arginina, citozina i *trans*-4-hidroksi-L-prolina značajno sniženi, a L-karnitina i malonata značajno povišeni u odnosu na kontrolnu skupinu kuja (Tablica 17, Slika 33). *Post hoc* analiza nije detektirala statistički značajan rastući ili padajući trend između intenziteta metabolita i vrijednosti UPCR-a tri skupine kuja. Blagi padajući trend je uočljiv kod glicina, L-triptofana, kao i blagi rastući trend kod L-karnitina.

Tablica 17.

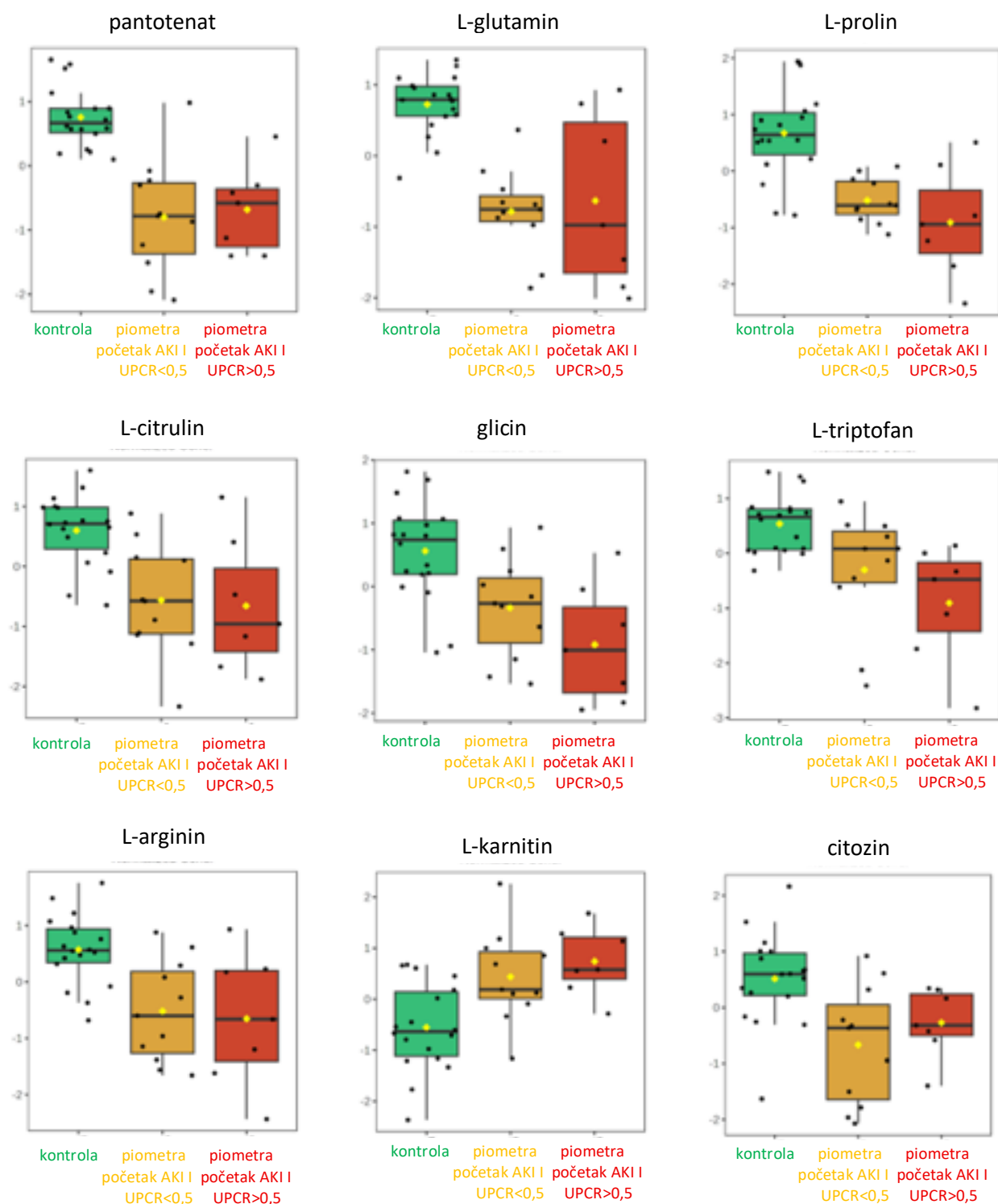
Tablični prikaz metabolita (N=11) identificiranih u serumu čiji su intenziteti prema ANOVA i *post-hoc* analizi statistički značajno promijenjeni između kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom, početkom AKI i UPCR <0,5 te kuja s piometrom, početkom AKI i UPCR >0,5.

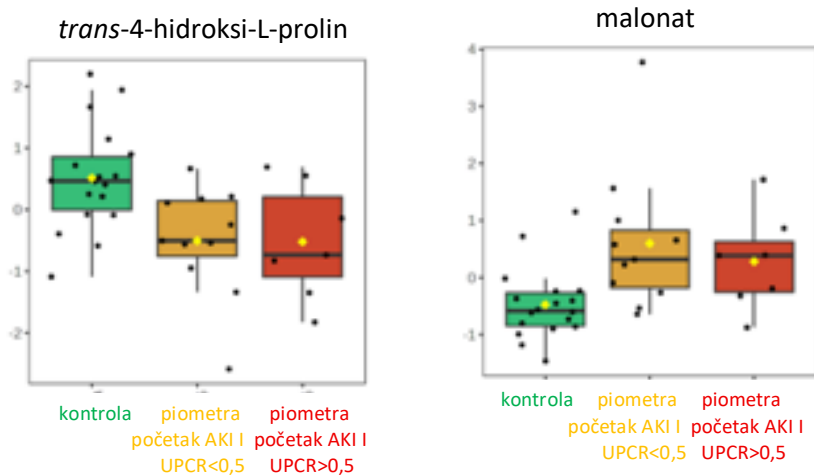
Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Vrijednost p	Fischerov LSD
pantotenat	220,118	454,35	4,58E-07	a, b
L-glutamin	147,0763	689,94	2,43E-06	a, b
L-prolin	116,0706	611,66	1,87E-05	a, b
L-citrulin	176,1029	720,74	4,58E-04	a, b
glicin	76,0393	730,1	5,39E-04	a, b
L-triptofan	203,0831	595,13	1,04E-03	a, b
L-arginin	175,119	1216,69	1,10E-03	a, b
L-karnitin	162,1125	610,4	1,41E-03	c, d
citozin	112,0505	598,36	3,53E-03	a

<i>trans</i> -4-hidroksi-L-prolin	132,0655	704,73	5,66E-03	a, b
malonat	103,0039	721,24	9,92E-03	a

a - kontrola–pio UPCR <0,5; b - kontrola–pio UPCR >0,5;

c - pio UPCR <0,5–kontrola; d - pio UPCR >0,5-kontrola





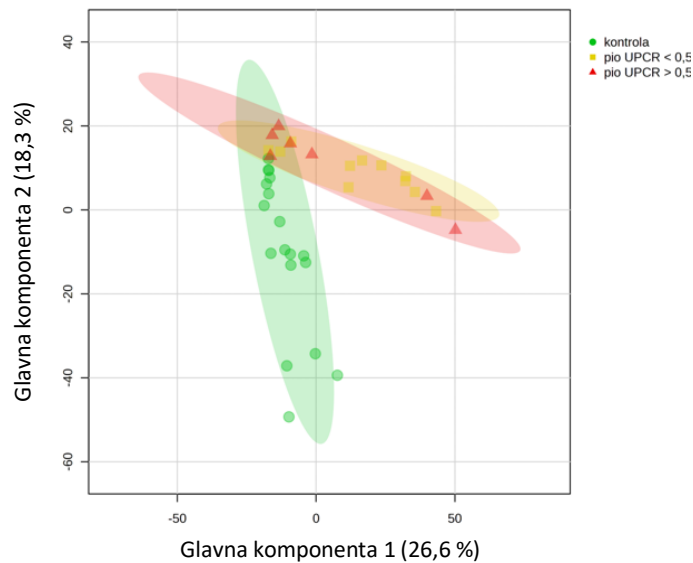
Slika 33.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita identificiranih u serumu čiji su intenziteti prema rezultatima ANOVA i *post-hoc* analize statistički značajno promijenjeni između kontrolne skupine kuja (zeleni pravokutnik), kuja s piometrom, početkom AKI i UPCR <0,5 (žuti pravokutnik) te kuja s piometrom, početkom AKI i UPCR >0,5 (crveni pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Vodoravna crna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.) *Post hoc* analiza nije detektirala statistički značajan rastući ili padajući trend između intenziteta metabolita i vrijednosti UPCR-a tri skupine kuja. Blagi padajući trend je uočljiv kod glicina, L-triptofana, kao i blagi rastući trend kod L-karnitina.

b) Analiza glavnih komponenti

(engl. *Principal Component Analysis*; PCA analiza)

PCA analizom intenziteta pikova u serumu ispitane su unutarnje varijacije kontrolne skupine kuja, skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 te skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (Slika 34).



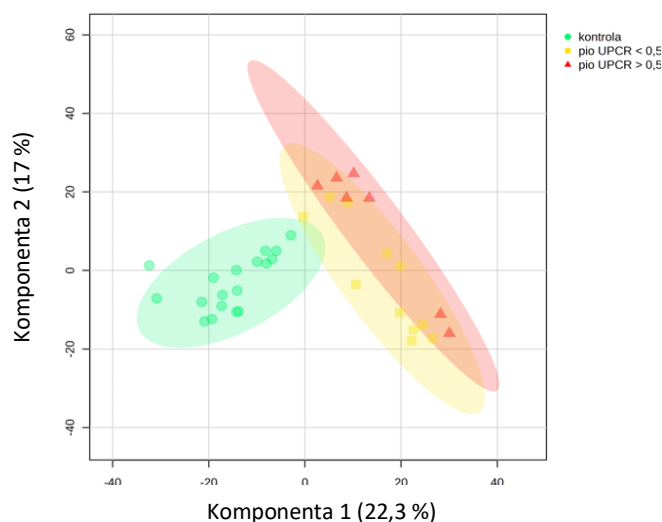
Slika 34.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u serumu kontrolne skupine kuja (zeleni kružići), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 (žuti kvadratići) i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (crveni trokutići).

c) Djelomična diferencijalna analiza najmanjih kvadrata

(engl. *Partial Least Squares – Diskriminant Analysis*; PLS-DA)

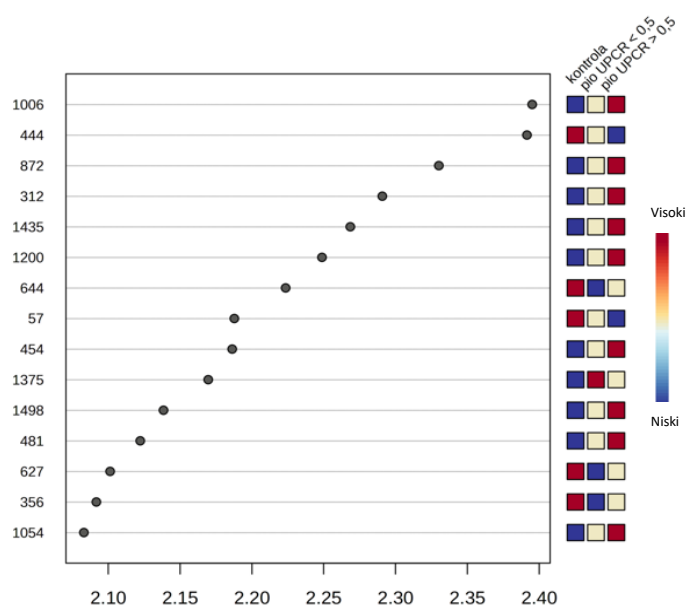
PLS-DA analiza seruma pokazuje vrlo dobro razdvajanje kontrolne skupine kuja od obje skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a. Međutim, prisutno je međusobno preklapanje skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 i skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5.



Slika 35.

Grafički prikaz PLS-DA analize intenziteta pikova detektiranih u serumu kontrolne skupine kuja (zeleni kružići), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 (žuti kvadratići) i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (crveni trokutići).

Rezultati VIP (*Variable Importance in Projection* – projekcija važnosti varijable) analize upućuju na značajno promijenjene ($p < 0,05$) pikove čiji intenziteti najviše doprinose razlikovanju metaboloma seruma kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (Slika 36).



Slika 36.

Grafički prikaz VIP analize seruma kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5. Prikazani su pikovi (N=15) koji najviše doprinose razlikovanju navedenih skupina (Tablica XXV, Dodatak). (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)

d) Analiza korelacije

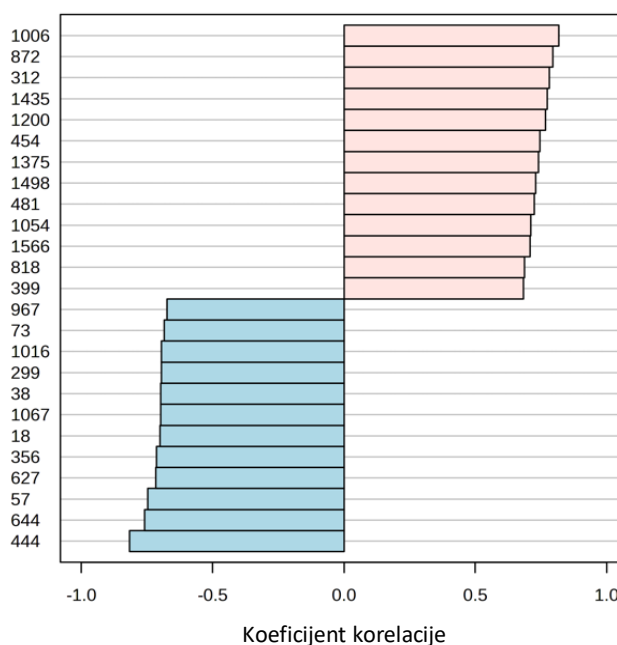
Analizom korelacije je ispitana povezanost prosječne vrijednosti UPCR-a s intenzitetima pikova u serumu kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (Tablica 18, Slika 37). Vrijednost korelacije između UPCR-a skupina i intenziteta metabolita je umjerena i negativna

((-0,75) - (-0,50)) za L-prolin, pantotenat, L-glutamin, glicin, L-triptofan, L-citrulin i L-arginin, a umjerena i pozitivna (0,50 - 0,75) za L-karnitin.

Tablica 18.

Tablični prikaz povezanosti vrijednosti UPCR-a i intenziteta metabolita identificiranih u serumu (N=8) kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 te kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5.

Metabolit	Koeficijent korelacije	Vrijednost p
L-prolin	-0,671	7,49E-06
pantotenat	-0,667	8,99E-06
L-glutamin	-0,635	3,18E-05
glicin	-0,601	1,06E-04
L-triptofan	-0,581	2,02E-04
L-citrulin	-0,560	3,85E-04
L-karnitin	0,552	4,89E-04
L-arginin	-0,540	6,73E-04

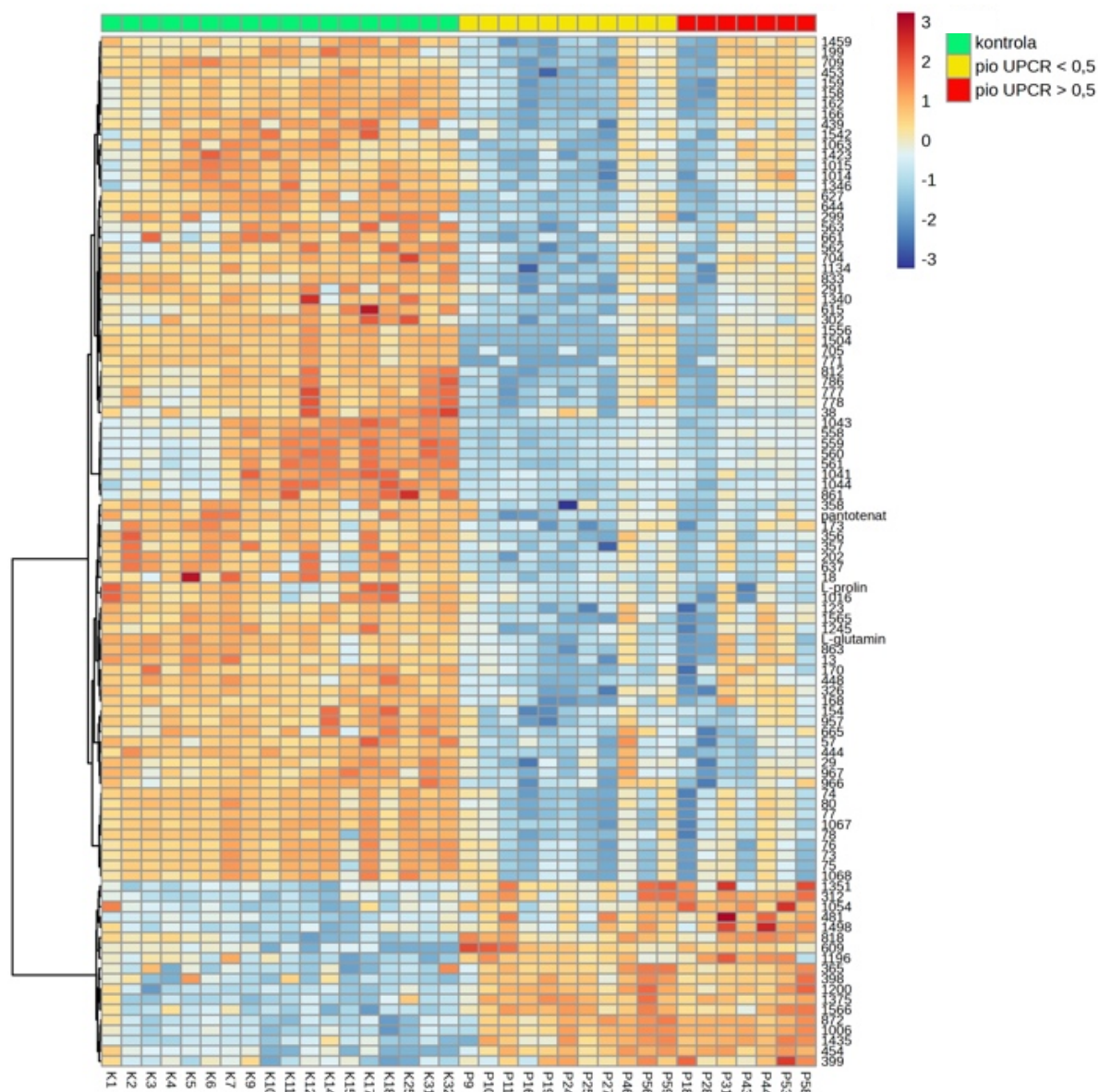


Slika 37.

Grafički prikaz analize korelacije intenziteta pikova (*mz/rt*) u serumu (N=25) s vrijednosti UPCR-a kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR <0,5 i kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR >0,5 (Tablica XXVI, Dodatak).

e) Analiza hijerarhijskog grupiranja

Hijerarhijskim grupiranjem su analizirani odnosi intenziteta najznačajnijih pikova detektiranih u serumu između skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5, skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 i kontrolne skupine kuja. Analiza prikazuje dobru razliku između obje skupine kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja.



Slika 38.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja statistički najznačajnije promijenjenih pikova (N=100) u serumu prema rezultatima ANOVA i *post hoc* analize između kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (crveni panel), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 (žuti panel) i kontrolne skupine kuja (zeleni panel). (Prema priloženom

kazalu su povišeni intenziteti prikazani tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)

5.4.2. ANALIZE MOKRAĆE

5.4.2.1. Fizikalna i biokemijska analiza mokraće

U istraživanju piometre kuja na početku I stupnja AKI-a koje su u riziku od razvoja akutne ozljede bubrega uspoređeni su fizikalno-kemijski i biokemijski pokazatelji mokraće skupine 18 kuja s piometrom i kontrolne skupine 18 kuja (Tablica 19). U mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr >0,5 je u odnosu na kontrolnu skupinu kuja statistički značajno promijenjena ($p < 0,05$) koncentracija ukupnih proteina.

Tablica 19.

Tablični prikaz usporedbe fizikalnih i biokemijskih pokazatelja mokraće između kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr >0,5, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr <0,5 i kontrolne skupine kuja.

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Kontrola (N=18)	Piometra početak AKI I		Vrijednost p
			UPCr <0,5 (N=11)	UPCr >0,5 (N=7)	
Proteini ukupni	mg/L	0,153 ^{a,b} (0,039-0,918)	0,456 ^a (0,106-1,760)	0,886 ^b (0,180-1,691)	0,0001
Natrij	mmol/L	104,1 (30,2-311,2)	28,9 (14,1-320,5)	22,4 (17,5-196,7)	0,0012
Osmolalnost	mOsmol	1,359 (0,484-2,455)	1,073 (0,526-1,773)	0,764 (0,269-1,886)	0,1054
Kreatinin	mmol/L	23,2 (5,3-39,8)	16,3 (9,7-37,9)	10,3 (2,9-22,4)	0,1189
Ureja	mmol/L	800,9 (242,8-1598,1)	602,9 (229,2-1327,4)	345,0 (129,5-1416,9)	0,2238
USG	/	1,034 (1,013-1,064)	1,024 (1,017-1,045)	1,023 (1,009-1,052)	0,2615

Glukoza	mmol/L	0,469 (0,110-1,367)	0,503 (0,260-1,211)	0,764 (0,269-1,886)	0,6833
---------	--------	------------------------	------------------------	------------------------	--------

(Fizikalni i biokemijski pokazatelji mokraće su prikazani medijanom te najnižom i najvišom vrijednosti u skupini. Vrijednosti p statistički značajno promijenjenih pokazatelja su istaknute kurzivom.) USG, engl. *Urine Specific Gravity*, specifična težina mokraće

5.4.2.2. Neciljana metabolomska analiza mokraće

Radi uvida u povezanost proteinurije i početka I stupnja AKI-a u piometri kuja neciljanom LC-MS metabolomskom metodom su uspoređeni uzorci mokraće kontrolne skupine kuja (N=18) i skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a koja je podijeljena na skupinu s UPCr <0,5 (N=11) i skupinu s UPCr >0,5 (N=7). U svim uzorcima mokraće (N=36) je detektiran relativni intenzitet (*mz/rt*) ukupno 1149 pikova koji se odnose na 1954 mogućih metabolita. Od 1149 pikova su identificirani sljedeći metabolit (N=12): kreatinin, betain, N(*pi*)-metil-L-histidin, N-acetil-glutamin, L-glutamat, D-glukonska kiselina, *cis*-akonitat, alantoin, D-glaktarat, L-glutamin te L-homoserin i/ili L-treonin.

Bioinformatičkom obradom podataka vidljivo se izdvajao uzorak mokraće jedne kuje iz kontrolne skupine (engl. *outlier*) koji je isključen iz daljnje analize radi dobivanja točnih rezultata. Prvotnom provjerom cjelovitosti podataka (N=36) je utvrđen izostanak 403 (1,0 %) vrijednosti, a nakon isključivanja *outliera* (N=35) utvrđen je izostanak 173 (0,4 %) vrijednosti. (Tablični i grafički prikazi bioinformatičke obrade podataka uzoraka mokraće kuja s *outlierm* (N=36) su prikazani u Prilogu.)

a) One-way ANOVA & *post-hoc* analiza

One-way ANOVA i *post-hoc* analizom su utvrđeni statistički značajno promijenjeni intenziteti 223 pika, dok intenziteti preostalih 927 pikova nisu značajno promijenjeni (Tablica XXVII, Dodatak). U mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr <0,5 i mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr >0,5 su intenziteti metabolita L-glutamata, *cis*-akonitata i D-glukonske kiseline značajno povišeni u odnosu na kontrolnu skupinu kuja.

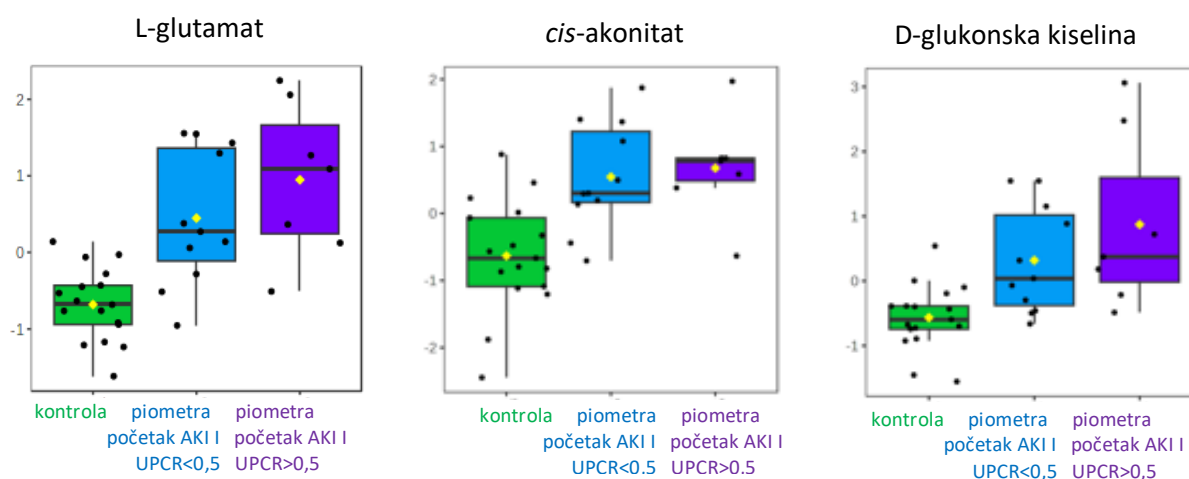
Tablica 20.

Tablični prikaz metabolita identificiranih u mokraći (N=3) čiji su intenziteti prema rezultatima ANOVA i *post-hoc* analize statistički značajno promijenjeni između kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr >0,5.

Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Vrijednost p	Fischerov LSD
L-glutamat	148,0604	660,74	2,73E-05	a, b
<i>cis</i> -akonitat	173,0094	772,58	3,71E-04	a, b
D-glukonska kiselina	195,0513	648,16	1,02E-03	a, b

(LSD, *Fisher's Least Significant Difference Method* – Fischerova metoda najmanje značajne razlike)

a – pio UPCr <0,5 – kontrola; b – pio UPCr >0,5 – kontrola



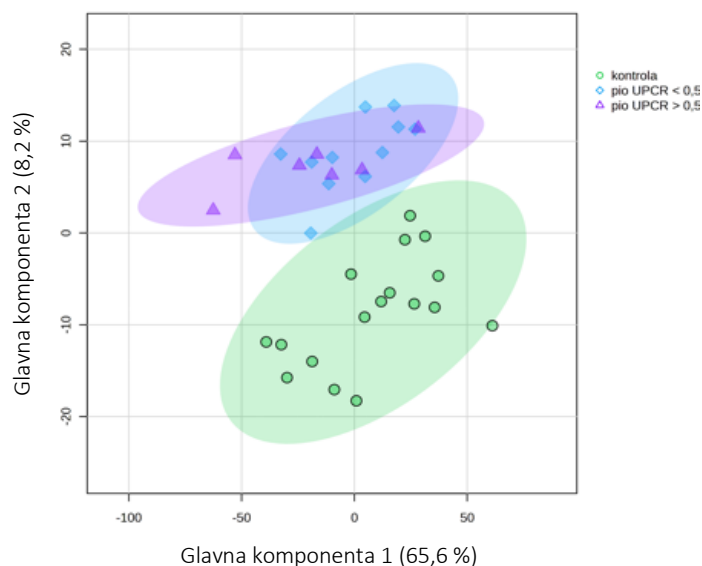
Slika 39.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita identificiranih u mokraći čiji su intenziteti prema rezultatima ANOVA i *post-hoc* analize statistički značajno promijenjeni između kontrolne skupine kuja (zeleni pravokutnik), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr <0,5 (plavi pravokutnik) i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCr >0,5 (ljubičasti pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Crna vodoravna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)

b) Analiza glavnih komponenti

(engl. *Principal component analysis*; PCA analiza)

PCA analizom intenziteta pikova u mokraći ispitane su unutarnje varijacije za kontrolnu skupinu kuja, skupinu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 te za skupinu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5 (Slika 40).



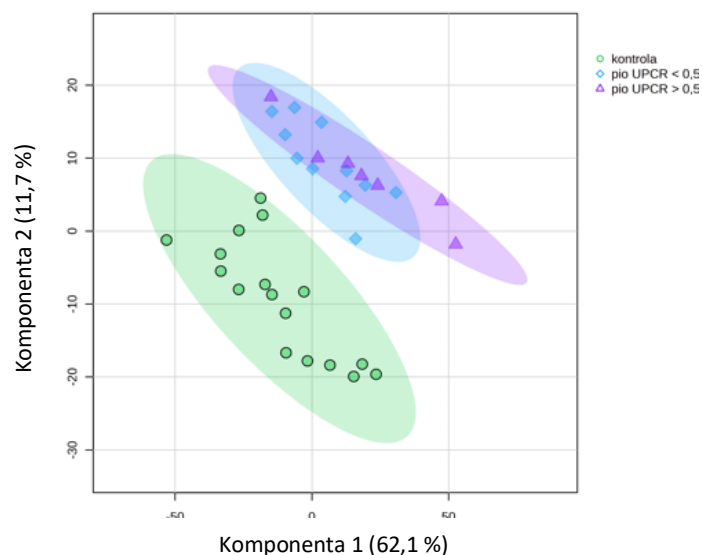
Slika 40.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u mokraći kontrolne skupine kuja (zeleni kružići), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 (plavi rombići) i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5 (ljubičasti trokutići).

c) Djelomična diferencijalna analiza najmanjih kvadrata

(engl. *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*; PLS-DA)

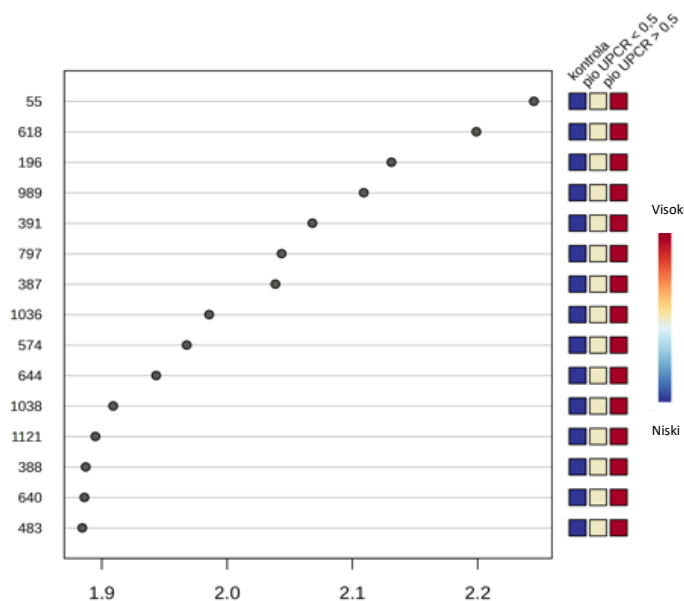
PLS-DA analiza pikova mokraće pokazuje vrlo dobro odvajanje između kontrolne skupine kuja i obje kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a. Prisutno je, međutim, međusobno preklapanje skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR <0,5 i skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR >0,5.



Slika 41.

Grafički prikaz PLS-DA analize mokraća kontrolne skupine kuja (zeleni kružići), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 (plavi rombići) i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5 (ljubičasti trokutići).

Rezultati VIP (*Variable Importance in Projection* – projekcija važnosti varijable) analize upućuju na statistički značajno promijenjene pikove čiji su intenziteti najviše doprinjeli razlikovanju metaboloma mokraće kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5 (Slika 42).



Slika 42.

Grafički prikaz VIP analize mokraća između kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5. Prikazani su pikovi (N=15) čiji intenziteti najviše doprinose razlikovanju navedenih skupina (Tablica XXVIII, Dodatak). (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)

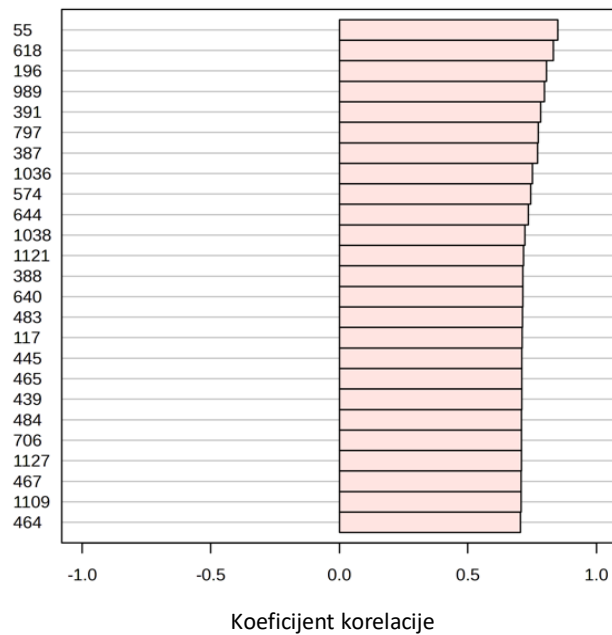
d) Analiza korelacije

Analizom korelacije je ispitana povezanost prosječne vrijednosti parametra UPCR s relativnim intenzitetima pikova u mokraći kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5 (Tablica 21, Slika 43). Korelacija između prosječne vrijednosti UPCR-a skupina i relativnih intenziteta L-glutamata, D-glukonske kiseline i *cis*-akonitata je umjerena i pozitivna (0,50 - 0,75).

Tablica 21.

Tablični prikaz povezanosti parametra UPCR i metabolita identificiranih u mokraći (N=3) kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5.

Metabolit	Koeficijent korelacije	Vrijednost p
L-glutamat	0,679	7,33E-06
D-glukonska kiselina	0,587	2,13E-04
<i>cis</i> -akonitat	0,577	2,86E-04

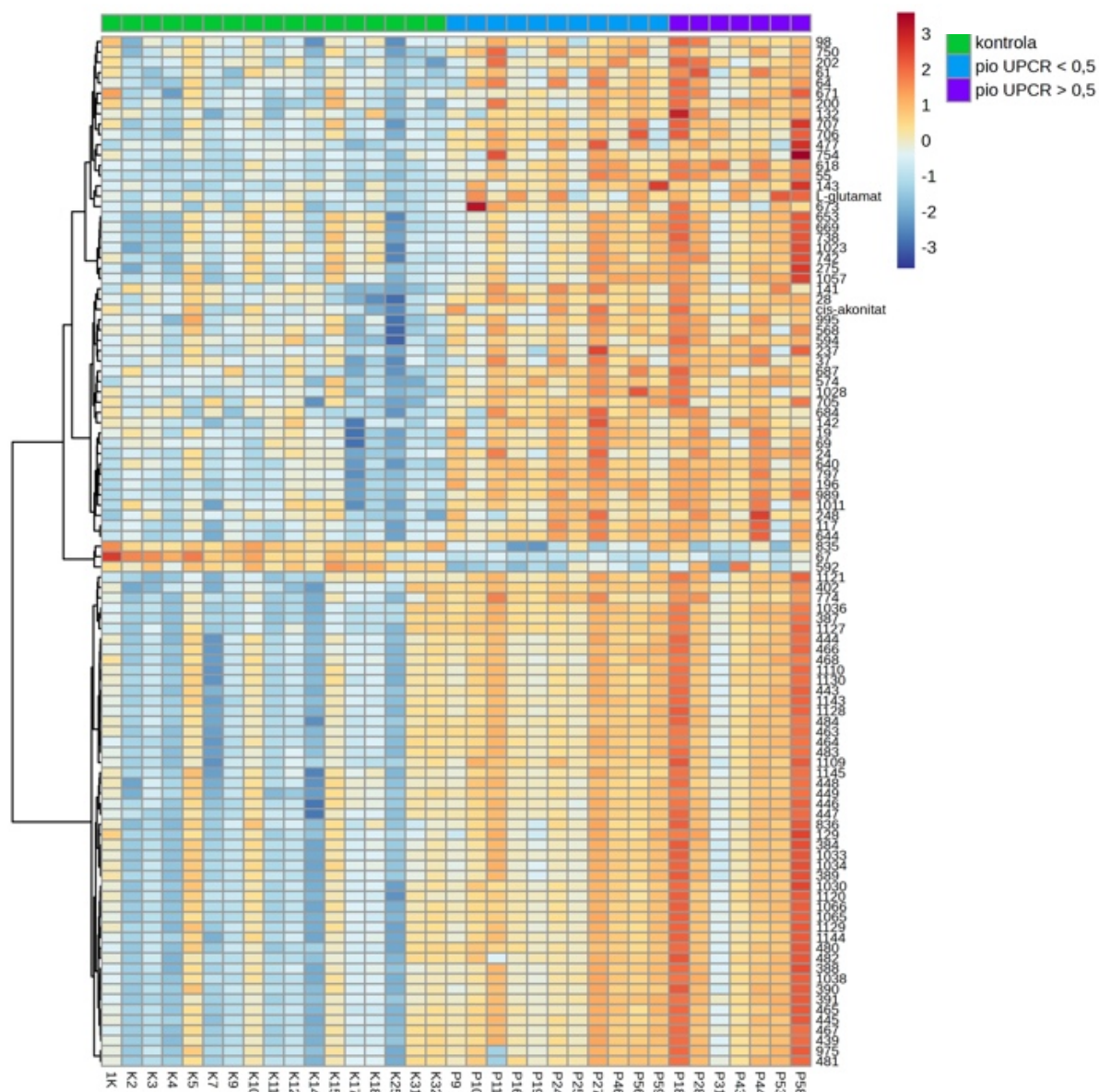


Slika 43.

Grafički prikaz analize korelacije intenziteta (mz/rt) pikova ($N=25$) u mokraći s vrijednostima UPCR-a kontrolne skupine kuja, kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR $<0,5$ i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a i UPCR $>0,5$ (Tablica XXIX, Dodatak).

e) Analiza hijerarhijskog grupiranja

Hijerarhijskim grupiranjem su analizirani odnosi intenziteta najznačajnijih pikova detektiranih u mokraći između kontrolne skupine kuja, skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR $<0,5$ i skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR $>0,5$. Analiza hijerarhijskog grupiranja pokazuje slabu razliku između skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR $<0,5$ i skupine kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR $>0,5$.



Slika 44.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja pikova u mokraći (N=100) čiji su intenziteti prema rezultatima ANOVA i *post hoc* analize najznačajnije promijenjeni između kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR >0,5 (ljubičasti panel), kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR <0,5 (plavi panel) i kontrolne skupine kuja (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazani tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)

6. RASPRAVA

Profil metabolita i povezanih metaboličkih puteva u serumu i mokraći kuja s piometrom i razvojem akutne ozljede bubrega dobiven je primjenom spregnutog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa upotrebom neciljanog metabolomskog pristupa.

Piometra je često dijagnosticirana bakterijska upala u intaktnih, spolno zrelih kuja u kojoj dolazi do nakupljanja gnojnog sadržaja u lumenu maternice (FUKUDA, 2001; MADDENS i sur., 2010). Dobna struktura skupine kuja u metabolomskom istraživanju piometre potvrđuje rezultate drugih istraživanja prema kojima se bolest češće javlja u kuja starijih od četiri godine (PRETZER, 2008).

Akutna ozljeda bubrega obuhvaća kontinuum promjena u funkciji bubrega, od najblažih, subkliničkih promjena koje se odvijaju unutar I stupnja AKI-a do promjena karakterističnih za V stupanj AKI (www.iris-kidney.com). Drugim riječima, koncentracija kreatinina (i ureje) u serumu životinje može biti unutar fizioloških granica usprkos prisutnoj ozljedi bubrega (HARLEY i LANGSTON, 2012). Metabolomskim istraživanjem seruma i mokraće kuja s piometrom detektirane su značajne promjene metaboličkih profila iako su koncentracije kreatinina bile unutar fiziološkog raspona. Pritom je u serumu kuja s piometrom statistički značajno promijenjeno 645 pikova, odnosno u mokraći 261 pik. U analizi rezultata metabolomskog istraživanja piometre je kao čimbenik rizika za razvoj AKI-a primijenjen konvencionalni parametar, omjer ukupnih proteina i kreatinina u mokraći (UPCR).

U veterinarskoj i humanoj medicini bakterijske infekcije su od velike važnosti jer mogu dovesti do poremećaja funkcije bubrega (GRAUER, 2005; RODRIGUEZ-ITURBE i MUSSER, 2008). Piometra je česta upalna bolest maternice koja može imati za posljedicu poremećenu funkciju nefrona na glomerularnom i tubularnom (proksimalnom) nivou (Maddens i sur., 2010). Kao posljedica piometre, odnosno bakterijske infekcije, može doći do oštećenja glomerularnog i tubularnog dijela nefrona s taloženjem imunokompleksa u glomerulima, odnosno do oštećenja svih segmenata nefrona (HEIENE i sur., 2007; HAGMAN, 2014; DA SILVA FIGUEIREDO i sur., 2017). Važna posljedica piometre i posljedične nefropatije je proteinurija koja može ukazivati na tubulointersticijski nefritis i $UPCR > 0,5$, odnosno na glomeruloskleroza i $UPCR > 1,0$ (MADDENS i sur., 2011). Prema IRIS protokolu proteinurija je prisutna uz $UPCR > 0,5$.

U kuja s piometrom UPCR može biti blago povišen, ali može biti manji od 0,5 (POLZIN, 2010). U metabolomskom istraživanju piometre je 11 kuja s piometrom imalo UPCR <0,5 što bi moglo ukazivati na graničnu ozljedu bubrega, dok je 7 kuja imalo UPCR >0,5. Uzrok povišenom UPCR-u može biti i upala mokraćnog trakta što je često prisutno u kuja s piometrom. U 7 kuja s piometrom je nalaz urinokulture pozitivan i ne može se isključiti kao razlog povišenog UPCR-a (BAGLEY i sur., 1991; VADEN i sur., 2004). Najčešće izolirana bakterija u piometri je *Escherichia coli* što je u skladu s metabolomskim istraživanjem piometre gdje je u oko 70 % kuja s piometrom izolirana *E. coli* u urinokulturi, odnosno u obrisku maternice. Više vrijednosti UPCR-a ukazuju na teže histopatološke promjene u bubrežima što je moguće bio razlog uginuća jedne kuje s piometrom koja je, osim značajne azotemije, imala UPCR 4,12.

Na temelju blago povišenog UPCR-a i/ili omjera albumina i kreatinina u mokraći kuja s piometrom može se govoriti samo o blago poremećenoj funkciji glomerula bubrega (MADDENS i sur., 2010). Metabolomsko istraživanje piometre kuja potvrđuje da u slučaju početnog razvoja akutne ozljede bubrega dolazi do značajnih metabolomskih promjena. Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti spregnuta sa spektrometrom masa pokazala je, primjenom neciljanog metabolomskog pristupa, da u serumu kuja s piometrom i početnim razvojem akutne ozljede bubrega, dolazi do aktivacije nekoliko bioloških puteva, biosinteze arginina, metabolizma glioksilata i dikarboksilata, metabolizma arginin i prolina te metabolizma glicina, serina i treonina. Bioinformatičkom obradom seruma kuja s piometrom i početnim razvojem akutne ozljede bubrega ustanovljene su povišene razine L-karnitina, malonata, N-acetil-glutamina i orotata, dok su razine pantotenata, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-citrulina, L-triptofana, glicina, citozina, *trans*-4-hidroksi-L-prolina, citidina, L-serina, *cis*-akomitata i kreatinina bile snižene. Uzrok sniženim vrijednostima aminokiselina L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-citrulina, L-triptofana, glicina i L-serina bi mogao biti učinak endotoksina (lipopolisaharid) gram-negativnih bakterija (*E. coli*) koji utječe na propusnost glomerula i/ili reapsorpciju aminokiselina u tubulima. Piometra kuja uzrokovana *E. coli* može potaknuti prolaznu disfunkciju glomerula i tubula (MADDENS i sur., 2010).

6.1. OPĆE LABORATORIJSKE PRETRAGE PUNE KRVI, SERUMA I MOKRAĆE KUJA S PIOMETROM

Rutinskim laboratorijskim pretragama pune krvi kuja s piometrom evidentirani su sniženi broj eritrocita, hemoglobin i hematokrit te povišeni broj ukupnih leukocita, monocita, nesegmentiranih i segmentiranih neutrofila što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja piometre (HAGMAN, 2022). Evidentiran je također i snižen broj eozinofila u kuja s piometrom, što se razlikuje od rezultata drugih istraživanja piometre koja uglavnom navode eozinofiliju, tj. povišeni broj eozinofila (PAUDEL i sur., 2023). Uzrok sniženom broju eozinofila u kuja s piometrom bi mogao biti povezan s početnom fazom upale. Naime, prema nekim istraživanjima eozinopenija može biti signal prisutne akutne infekcije (LIN i sur., 2021).

U serumu kuja s piometrom su izmjerene snižene koncentracije albumina i ureje. Sniženi albumini su uobičajen nalaz u kuja s piometrom, dok su sniženu ureju naveli samo Kaymaz i suradnici u istraživanju piometre kuja 1999. godine. Razlog snižene koncentracije ureje bi mogao biti smanjen unos proteina kao posljedica slabog apetita tijekom nekoliko dana ili promjene u funkciji jetre. Značajno povišena koncentracija CRP-a u serumu kuja s piometrom je rezultat naveden i u drugim istraživanjima piometre. Uzrok povišenoj koncentraciji CRP-a je vjerojatno upalna bolest, posebno uzrokovana bakterijama, što potvrđuje i povišeni broj ukupnih leukocita i nesegmentiranih neutrofila u istraživanju piometre. S druge strane, značajno povišena aktivnost DGGR-lipaze u kuja s piometrom (unutar referentnog raspona) nije navedena u sklopu drugih istraživanja piometre. Iako je sintetički supstrat DGGR specifičan za DGGR-lipazu, moguće je da na analizu aktivnosti DGGR-lipaze utječu ekstrapankreasne lipaze, kao npr. želučane lipaze i lipoprotein-lipaze (LIM i sur., 2022).

Koncentracija kreatinina u serumu, kao jedan od pokazatelja poremećene funkcije bubrega, je u osamnaest kuja unutar fizioloških granica, dok je u jedne kuje odgovarala III stupnju akutne ozljede bubrega prema klasifikaciji IRIS.

6.2. *NECILJANA METABOLOMSKA ANALIZA SERUMA I MOKRAĆE KUJA S PIOMETROM*

U metabolomu seruma kuja s piometrom detektirane su snižene razine pantotenata. Pantotenat je sastavni dio molekule CoA koja je kofaktor u proizvodnji stanične energije, sintezi i razgradnji proteina, ugljikohidrata i masti te u ciklusu trikarboksilnih kiselina. Snižene razine pantotenata, kao i metabolita povezanih s metabolizmom triptofana, ugljikohidrata i lipida,

zabilježene su u polimikrobnoj sepsi nakon CLP-a u metabolomu seruma miševa s delecijom gena za PPAR α (IWAKI i sur., 2019). CLP na miševima može dovesti do sniženja metabolita povezanih s metabolizmom CoA u mokraći (STANDAGE i sur., 2021). Visoka doza LPS-a dovodi do promjena u metabolizmu pantotenske kiseline i biosinteze CoA, kao i u metabolizmu fenilalanina u kori bubrega, pri čemu se porast pantotenata u serumu može povezati s mehanizmom zaštite stanične membrane i uklanjanjem ROS-a (PING i sur., 2019).

Kod poremećaja funkcije bubrega povećavaju se potrebe organizma za sintezom proteina što može dovesti do sniženih razina aminokiselina u tkivu bubrega i povišenih razina aminokiselina u serumu (IZQUIERDO-GARCIA i sur., 2019; HU i sur., 2023). U serumu pasa s CKD-om se može detektirati nedostatak većine i esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina dok je profil aminokiselina u serumu ljudi karakteriziran uglavnom sniženjem esencijalnih i porastom neesencijalnih aminokiselina (LIPPI i sur., 2022). Istraživanje metaboloma seruma kuja s piometrom je detektiralo snižene razine većine identificiranih aminokiselina. U fiziološkim uvjetima bubrezi sudjeluju u metabolizmu aminokiselina, npr. fenilalanin prelazi u tirozin, a glicin se pretvara u serin. Istraživanja metabolizma aminokiselina u pacijenata s CKD-om sugeriraju da su smanjenje slobodnog tirozina i serina u plazmi uz povećanje omjera fenilalanin/tirozin i glicin/serin povezana s težinom oštećenja bubrežnog tkiva.

Metabolomskim istraživanjem je u serumu kuja s piometrom utvrđena snižena razina glutamina. U tankom crijevu zdravog psa je veća ekstrakcija glutamina (oko 30 %) nego drugih aminokiselina, što se tijekom gladovanja (do 4 dana) progresivno povećava putem nepoznatih biokemijskih mehanizama. U metaboličkoj acidozi značajno raste apsorpcija glutamina u bubrezima psa radi odvijanja bubrežne amonijageneze. Sepsa i teške infekcije uzrokuju značajne promjene u prometu glutamina između organa (KARINCH i sur., 2001) pri čemu jetra postaje glavni „potrošač“ glutamina (AUSTGEN i sur., 1991). Tijekom sepse glutamin iz plazme prelazi u stanicu što može utjecati na metabolizam glutamina, odnosno nastajanje glutamata u mitohondrijima. Glutamin sudjeluje u sintezi antioksidansa glutaciona, smanjuje nastajanje upalnih citokina te ublažava disfunkciju bubrega (ZHANG i sur., 2009; ZHAN i sur., 2021). Snižen glutamin u metabolomu seruma kuja s piometrom bi se mogao povezati s početkom teške infekcije.

U metabolomu mokraće kuja s piometrom su detektirane povišene razine glutamata. Metabolizam L-glutamina i L-glutamata su povezani s rastom stanica, peroksidacijom lipida,

antioksidativnom obranom i protuupalnim mehanizmima (MINJIANG i sur., 2019; QU i sur., 2020). Glutamat služi kao signalni faktor između imunskog i živčanog sustava, a potreban je također za regulaciju glutaciona u zaštiti od oksidativnog stresa (YANG i sur., 2019). Snižen serumski glutamat može ukazivati na ozljede uzrokovane upalnim citokinima i ROS-om što je vjerojatno povezano s oksidativnim stresom (TURNER i sur., 2011). Endotoksemija u štakora je povezana sa smanjenim razinama glutamina i glutamata (BOUTRY i sur., 2012). U plazmi ljudi koji nisu preživjeli septički šok detektirane su niske razine glutamata, kao i nizak omjer glutamata/glutamina (POEZE i sur., 2008), što bi moglo biti posljedica povećane potrošnje ili proizvodnje glutamata i glutamina u organima (DEUTZ, 2008). U kuja s piometrom bi sniženi glutamin u serumu i povišeni glutamat u mokraći mogao više ukazivati na metabolički poremećaj nego na oksidativni stres. Naime, moguće je da u kuja s piometrom nije došlo do oksidativne deaminacije glutamata pri čemu nastaje ureja, za što je odgovoran enzim glutamat-dehidrogenaza u mitohondrijima jetre. Visoka doza LPS-a u štakora je dovela do sistemske upale i ozljeda bubrega i jetre pri čemu je u serumu došlo do porasta glutamina bez usporednog porasta glutamata i glutaciona (GAO i sur., 2021). Autori su pretpostavili da je organizam tijekom ozljede organa pokušao uskladiti protuupalni odgovor.

L-Citrulin uglavnom nastaje iz glutamina u enterocitima pa je koncentracija citrulina u plazmi odraz metaboličke funkcije crijeva, tj. potencijalni marker funkcionalne mase enterocita. Povezanost sniženih razina L-citrulina i akutne disfunkcije crijeva je zabilježena u pasa s parvovirusnim enteritisom (DOSSIN i sur., 2011). Sniženi L-citrulin u serumu kuja s piometrom bi mogao biti posljedica poremećaja u probavnom sustavu koji su veoma često dio kliničke slike piometre. Kod akutnog zatajenja bubrega može doći do smanjene bubrežne sinteze arginina iz citrulina, odnosno do porasta citrulina u serumu (PITON i sur., 2011), što nije evidentirano u metabolomu seruma kuja s piometrom. Različita istraživanja sepse navode i povišene i snižene razine citrulina u serumu (KAO i sur., 2009).

L-arginin se smatra potencijalnim biomarkerom ozljeda bubrega jer su bubrezi jedini organ koji doprinosi ukupnoj količini slobodnog L-arginina u organizmu (SAITOH i sur., 2014; GAO i sur., 2021). Sintaza arginina u bubrezima je smanjena u pacijenata sa zatajenjem bubrega, ali i u kataboličkom stanju, kao što je sepsa. Shodno tome bi sniženi L-arginin u serumu kuja s piometrom mogao biti povezan sa smanjenom sintezom L-arginina u bubrezima uzrokovanom jakim upalom. U ljudi je septički šok u odnosu na SIRS obilježen sniženim argininom i treoninom te povišenim fenilalaninom u serumu (MONTAGUE i sur., 2022). Međutim, budući

da je prekursor za BUN i kreatinin, arginin bi također mogao biti pokazatelj i ozljeda jetre (EU i sur., 2009). Tretiranje eksperimentalnih životinja LPS-om može dovesti do poremećaja metabolizma L-arginina, tj. porasta ureje, kreatinina i metabolita povezanih s argininom (PING i sur., 2019). S druge strane, snižene razine L-arginina u serumu kuja s piometrom bi mogle biti posljedica aktivacije mehanizama koji regeneriraju tkivo endometrija. Naime, *in vitro* dodatak L-arginina humanim stanicama endometrija potiče proliferaciju endometrijskih stanica, regeneraciju epitela endometrija i smanjenje apoptoze (GREEN i sur., 2013).

Ping i suradnici su 2021. godine objavili rezultate metabolomskog istraživanja ozljeda bubrega i jetre štakora koji su žrtvovani dva sata te šest sati nakon jednokratne primjene visoke doze LPS-a. Nakon dva sata je u serumu najznačajnije promijenjen metabolizam arginina i prolina uz sniženi L-citrulin, L-arginin i L-prolin što je u skladu s istraživanjem metaboloma seruma kuja s piometrom. Pritom nije došlo do porasta ureje i kreatinina u serumu, što je sukladno nalazu u serumu kuja s piometrom, ali je učinak LPS-a bio vidljiv patohistološki. Šest sati nakon aplikacije LPS-a u serumu je zabilježen porast pantotenske kiseline, citidina, ali i ureje, kreatinina i kolesterola, dok je u kori bubrega došlo i do promjena u metabolizmu fenilalanina. Rezultati navedenog istraživanja sugeriraju da promjene metaboličkih profila ovise o trajanju izloženosti LPS-u, odnosno da su metabolomskim istraživanjem piometre uglavnom obuhvaćene kuje s ranim metaboličkim promjenama. Prema nekim autorima metabolizam arginina i prolina bi mogao biti usmjeren protiv štetnih učinaka LPS-a (HUAN i sur., 2022), što bi moglo objasniti njegovu aktivaciju u ranoj fazi djelovanja LPS-a.

Metabolizam arginina i prolina je također značajno promijenjen u istraživanju mikrobioma u kroničnom endometritisu žena (CHEN i sur., 2023). L-prolin se također pokazao potencijalnim biomarkerom u stratifikaciji raka endometrija (IHATA i sur., 2014; KNIFIC i sur., 2018) pa bi sniženi L-prolin u serumu kuja s piometrom mogao biti povezan s patološkim promjenama endometrija. U metabolomskom istraživanju piometre je zabilježena vrlo visoka moć L-prolina u razlikovanja kuja s piometrom od zdravih kuja.

L-Prolin i 4-hidroksi-L-prolin su esencijalne komponente kolagena čiju razgradnju mogu ubrzati ROS. Sadržaj hidroksi-prolina u biološkim tekućinama je pokazatelj katabolizma kolagena, posebno degradacije tkiva. Povišene razine hidroksi-prolina u mokraći ukazuju na oštećenje mišića, međutim hidroksi-prolin u mokraći kuja s piometrom nije identificiran. S druge strane, *trans*-4-hidroksi-L-prolin je biomarker za procjenu unosa prerađenog mesa pa bi

njegove snižene razine u serumu kuja s piometrom mogle biti posljedica slabijeg apetita tijekom razvoja piometre.

Geng i suradnici su 2020. godine objavili rezultate metabolomskog istraživanja višednevnog utjecaja niske doze LPS-a na štakore. Svakodnevne aplikacije su nakon dva tjedna, između ostalih metaboličkih puteva, značajno utjecale na metabolizam glioksilata i dikarboksilata, metabolizam glicina, serina i treonina te biosintezu arginina. Pritom su u serumu promijenjeni glicin, D-glukoza, L-glutamat, L-prolin, L-serin, L-treonin, L-triptofan i ureja. Isti metabolički putevi su promijenjeni i u metabolomu seruma kuja s piometrom i s promjenama u funkciji bubrega povezanim s I stupnjem AKI. Prema autorima bi sniženi glicin u serumu i tkivu bubrega mogao biti posljedica teškog sistemskog poremećaja.

U neciljanom metabolomskom istraživanju analiziran je serum krava koje su oboljele od bakterijskog endometritisa u četvrtom tjednu nakon teljenja. Između ostalog je otkriven promijenjeni metabolizam glicina, serina i treonina, koji je također promijenjen i u metabolomu seruma kuja s piometrom. Glicin je osnovna hranjiva tvar za bakterije, dok su serin i treonin prekursori ostalih hranjivih tvari potrebnih bakterijama u proizvodnji nukleotida (GUOSHANG i sur., 2024).

L-Serin u organizmu potječe iz hrane, 3-fosfoglicerata, glicina ili iz razgradnje proteina i fosfolipida. Do sniženog L-serina u metabolomu seruma kuja s piometrom je mogla dovesti proliferacija stanica, uključivanje u proces glukoneogeneze, ali i malnutricija. L-serin je, kao prekursor pirimidina i purina, uključen u staničnu proliferaciju. Također je i prekursor u glukoneogenezi, ali od manje važnosti nego glutamin i alanin (VAN DER POLL i sur., 2005). L-Homoserin je reaktivniji oblik L-serina i mikrobn metabolit pa bi se njegov porast u mokraći mogao povezati s aktivnom bakterijskom upalom u organizmu.

Glicin se sintetizira iz serina, ali može nastati i iz treonina te kolina i hidroksi-prolina metaboličkim putevima koji se odvijaju između jetre i bubrega. Sastavni je dio glutathiona i neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (VAN DER POLL i sur., 2005). Sniženi glicin u serumu kuja s piometrom bi mogao biti povezan s nastajanjem glutathiona, ali i s prisutnom bakterijskom infekcijom. Snižene razine glicina u serumu i tkivu bubrega mogu značiti da je došlo do teškog sistemskog poremećaja (GENG i sur., 2020). Glicin je povezan sa smanjenjem smrtnosti i ozljeda bubrega i jetre nastalih djelovanjem LPS-a (HUANG i sur., 2019).

L-Treonin je esencijalna aminokiselina, važna u sintezi proteina. U pasa se ne razgrađuje u mukozu crijeva već u jetri gdje se pretvara u glicin i potom u L-serin. Mikroorganizmi (*E. coli*) sintetiziraju L-treonin iz aspartata. U mokraći kuja s piometrom je L-treonin povišen što bi moglo biti povezano s aktivnom bakterijskom upalom u organizmu.

Nastajanje L-karnitina je povezano s razgradnjom esencijalne aminokiseline lizina u čemu bubreg ima glavnu ulogu. L-Karnitin sudjeluje u metabolizmu lipida, β -oksidaciji masnih kiselina, ali i metabolizmu razgranatih aminokiselina (L-valin, L-leucin, L-izoleucin). U serumu kuja s piometrom je povišen L-karnitin što je sukladno rezultatima neciljanog metabolomskog istraživanju AKI i CKD u ljudi gdje su zabilježeni povišeni serumski L-karnitin, acetil-karnitin i drugi kratkolančani acil-karnitini (HU i sur., 2023). Pritom se teži poremećaj metabolizma masnih kiselina očitovao u grupi ispitanika s AKI, a L-karnitin (i L-fenilalanin) je pokazao dobre predispozicije ($AUC > 0,8$) za razlikovanje AKI od CKD. L-Karnitin se unosi i hranom pa je kod malnutricije potaknuta endogena sinteza L-karnitina. Povišeni L-karnitin u serumu kuja s piometrom bi mogao biti rezultat endogene sinteze, tj. razgradnje lizina, a ne unosa prehranom. Međutim, porast L-karnitina bi također mogao ukazivati na zaštitni odgovor tkiva koji se ne odnosi isključivo na bubrege. Neki istraživači smatraju da porast L-karnitina i ostalih oblika karnitina nije povezan isključivo s bolestima bubrega, već je dio zaštitnog odgovora tkiva na ozljede (HU i sur., 2023). Tijekom AKI je smanjena oksidacija masnih kiselina jer se značajno smanjuju aktivnosti enzima koji sudjeluju u oksidaciji masnih kiselina u mitohondrijima i peroksisomima (SUN i sur., 2012; XU i sur., 2023). U miševa s delecijom gena za PPAR α je CLP pogoršao funkciju bubrega, smanjio oksidaciju masnih kiselina i snizio razinu L-karnitina (IWAKI i sur., 2019). Ekstrakt biljke *Rhizoma coptidis* može potaknuti oksidaciju masnih kiselina posredovanjem PPAR α i usporiti razvoj fibroze bubrega (ZHENG i sur., 2021).

U serumu kuja s piometrom su sniženi citozin i citidin, međuprodukti metabolizma pirimidina koji imaju važnu ulogu u proliferaciji, sintezi i razgradnji nukleotida. Citozin je sastavni dio citidina. Serumski citidin i citozin su povišeni u istraživanju AKI štakora inducirane visokom dozom LPS-a (GAO i sur., 2021). Visoke razine citozina su prisutne u mokraći ljudi oboljelih od sindroma imunoinfektivnosti. Citidin je bio također bio snižen u metabolomskom

istraživanju utjecaja hidrolizata bjelanjka jajeta na ozljede bubrega i jetre štakora izazvane LPS-om (HUAN i sur., 2022).

Orotat, prekursor uracila, je povišen u serumu kuja s piometrom i s promjenama u funkciji bubrega povezanim s I stupnjem AKI-a. Izrazito povišena orotična kiselina u serumu i mokraći je posljedica poremećaja ciklusa ureje (nasljednog nedostatka ornitin-transkarbamoilaze) što može dovesti do metaboličke acidoze. Prisutna hiperamonijemija smanjuje α -ketoglutarat što inhibira ciklus trikarboksilnih kiselina. U serumu kuja s piometrom i s promjenama u funkciji bubrega povezanim s I stupnjem AKI-a bi povišen orotat te sniženi citozin i citidin mogli značiti da je postignuta ravnoteža između *de novo* sinteze pirimidinskih baza i ponovnog korištenja slobodnih nukleozida dobivenih razgradnjom nukleotida. Taj metabolički put ne iziskuje mnogo energije pa je posebno važan u tkivima s niskom proliferacijskom aktivnosti gdje *de novo* sinteza nije aktivna.

U mokraći kuja s piometrom je povišena D-glukonska kiselina. Glukonska kiselina nastaje oksidacijom glukoze u metaboličkom putu pentoza-fosfata koji je povezan s lipogenezom te s mobilizacijom i katabolizmom masti. Povišena je u serumu pasa s hipotireoidizmom (MUNOZ-PRIETO A. i sur., 2021) kao jedan od metabolita povezanih s dislipidemijom. U neciljanom metabolomskom istraživanju mokraćne glukonska kiselina je bila jedan od metabolita koji najviše doprinosi razlikovanju kroničnog hepatitisa, urođenog portosistemskog šanta i hepatocelularnog karcinoma u pasa (LAWRENCE i sur., 2019). Povišena D-glukonska kiselina u mokraći kuja s piometrom ukazuje na aktivaciju puta pentoza-fosfata što bi mogao biti jedan od znakova promjena u funkciji bubrega. Međutim, glukonska kiselina može nastati i kada je glukoza u doticaju s blagim oksidansima.

U mokraći kuja s piometrom su povišene razine betaina. Betain ima ključnu ulogu u staničnoj osmoregulaciji u širokom uzlaznom kraku Henleove petlje (KITAMURA i sur., 1998). Održava strukturni i funkcionalni integritet membrane (LI i sur., 2016) i sudjeluje u zaštiti bubrega od rasta bakterija (CHAMBERS, 1995). Štiti stanice od oksidativnog stresa tako što smanjuje peroksidaciju lipida (LIAO i sur., 2016). Betain je pokazao sposobnost suprimiranja NF- κ B i upalnih medijatora, kao što su TNF- α i iNOS (LI i sur., 2016). Izrazit pad razina betaina u serumu, bubrezima i jetri miševa u sepsi izazvanoj LPS-om se može povezati s aktivacijom mehanizma koji ublažava oksidativno oštećenje uzrokovano ROS-om (LIAO i sur., 2016). U

metabolomskom istraživanju sepse miševa je osam sati nakon CLP-a također bilo izmjereno sniženje razina betaina (WALTZ i sur., 2015). Hasson i suradnici su 2022. godine objavili rezultate metabolomskog istraživanja u djece sa sepsom bez AKI i djece sa SI-AKI. Najznačajnije promijenjen je bio metabolizam kolina pri čemu su serumske razine betaina bile snižene što sugerira da bi betain mogao biti važan čimbenik u razlikovanju AKI od sepse. Pad razine betaina u serumu može biti povezan sa slabljenjem obrambenog mehanizma stanice i tubularnom disfunkcijom koja je povezana sa sepsom (IZQUIERDO-GARCIA i sur., 2018). Povišen betain u metabolomu mokraćne kuja s piometrom bi mogao biti povezan s oksidacijom kolina koji je nastao razgradnjom fosfolipida. Također je moguće da se radi o promjenama u funkciji tubula u sklopu razvoja piometre.

Alantoin je kod većine sisavaca međuprodukt metabolizma purina i konačni produkt enzimske oksidacije mokraćne kiseline pa je prisutan u njihovoj mokraći. Povišeni alantoin u mokraći ljudi može ukazivati na prisustvo mikroorganizama. Budući da alantoin nastaje i neenzimski uz visoke razine ROS-a, može biti pokazatelj oksidativnog stresa. U metabolomskom istraživanju AKI-a i sepse (fekalni peritonitis) u štakora gingeroli su poboljšali funkciju bubrega utječući na smanjenje oksidativnog/nitrozativnog stresa i proupalne citokine. Pritom su snizili alantoin u mokraći, što je vjerojatno znak normalizacije stanične funkcije, tj. smanjenja oksidativnog stresa (ADELVANE i sur., 2018). Povišeni alantoin u metabolomu mokraćne kuja s piometrom bi mogao biti povezan s oksidativnim stresom koji je u određenoj mjeri prisutan u svakom upalnom procesu. Također se ne može isključiti da je povišeni alantoin posljedica prisustva mikroorganizama u mokraći kuja s piometrom.

Prema neciljanom metabolomskom istraživanju Zhenga i suradnika iz 2022. godine najznačajniji metabolit u tkivu endometrija kuja s piometrom je kinureninska kiselina, glavni metabolit u metaboličkom putu kinurenina, odnosno L-triptofana. L-Triptofan je važan prekursor u sintezi neurotransmitera, serotonina i melatonina koji sudjeluje u razvoju bolesti živčanog sustava, mentalnih i neurodegenerativnih bolesti, raka te upalnih bolesti (WIRTHGEN i sur., 2017). U serumu kuja s piometrom je snižen L-triptofan što je vjerojatno povezano s razvojem upale. Naime, upalni procesi potiču aktivnost indolamin-2,3-dioksigenaze koja L-triptofan pretvara u kinurenin (FATOKUN i sur., 2013) pa tijekom upalnih procesa, sepse i traumatskih ozljeda u serumu opada triptofan, a raste kinurenin i ostali metaboliti triptofana, kao npr. kinolinska kiselina (DABROWSKI i sur., 2014). Prema nekim istraživanjima triptofan može ublažiti oksidativni stres (NAYAK i BUTTAR, 2016) i povećati

imunost organizma (EMADI, 2011). L-triptofan je pokazao protuupalni učinak tako što je u intestinalnim stanicama spriječio provođenje upalnog signala blokiranjem NF-kB signalnog puta (LIU, 2018). Mnoga istraživanja navode da su razine triptofana usko povezane s težinom AKI. Produkti kinurenina, kao npr. kinolinska kiselina, su također povezani s rizikom od AKI u eksperimentalnih životinja i u pacijenata s teškim simptomima (ANDRIANOVA i sur., 2020; BAJAJ i sur., 2021). U ciljanom metabolomskom istraživanju AKI izazvanoj cisplatinom metabolizam triptofana je bio promijenjen u kori i posebno u srži bubrega (TAN i sur., 2021). U pacijenata sa cirozom jetre u kojih se razvija AKI također se aktivira triptofan-kinureninski metabolički put (BAJAJ i sur., 2021). Oleinska kiselina izolirana iz biljke *Rehmanniae Glutinosae Libosch.* je dovela do porasta L-triptofana i L-fenilalanina, odnosno do ublažavanja upale i oksidativnog stresa kod AKI miševa inducirane LPS-om (ZHANG i sur., 2022). Budući da čak 95 % esencijalne aminokiseline L-triptofana iz hrane ulazi u metabolički put kinurenina (HOFFMAN i sur., 2019), mogući razlog sniženom serumskom L-triptofanu u kuja s piometrom je također malnutricija.

Fenilalanin je esencijalna aminokiselina koja se prevodi u tirozin uz fenilalanin-hidroksilazu (FERNANDEZ-CANON i sur., 2002), enzim koji ima isključiv afinitet za fenilalanin i u sisavaca je najaktivnija u jetri i manje u bubrezima. Kod ozljede bubrega inducirane LPS-om može doći do povišenja fenilalanina i sniženja tirozina u bubrezima tretiranih miševa, što je bilo zabilježeno u istraživanju CKD-a (HUANG i sur., 2015). Bajkalin, flavonoid iz *Scutellariae radix*, je snizio L-fenilalanin, odnosno ublažio ozljede bubrega miša izazvane LPS-om (LIAO i sur., 2016). U metabolomskom istraživanju piometre kuja L-fenilalanin nije promijenjen u serumu, ali su razine L-fenilalanina u mokraći bile značajno povišene što bi moglo upućivati na promjene u funkciji bubrega u sklopu piometre. Integrativna neciljana metabolomska i proteomska analiza je, istražujući sepsu u ljudi, izdvojila metabolizam fenilalanina i biosintezu fenilalanina, tirozina i triptofana kao najizraženiju promjenu u sepsi (CHEN i sur., 2022). GC-MS istraživanje metaboličkih promjena u sepsi ljudi je zabilježilo da povišene razine fenilalanina kod AKI mogu predvidjeti rizik od disfunkcije bubrega tijekom sepse (LIN i sur., 2020). Zanimljivo je što su se u metabolomskom istraživanju piometre kuja značajne promjene metabolizma fenilalanina i biosinteze fenilalanina, tirozina i triptofana očitovale u metabolomu mokraće, a ne u metabolomu seruma. To dodatno upućuje na važnost metabolomskih istraživanja u mokraći, ne samo kao nalaz komplementaran metabolomu seruma, već i kao uvid u promjene u funkciji bubrega.

Cis-akonitat je jedan od međuprodukata metabolizma glioksilata i dikarboksilata, ali i ciklusa trikarboksilnih kiselina, koji ukazuje na promjene u proizvodnji stanične energije. Uključen je u metabolički poremećaj glutaminolizu i neoplastični metabolički put. Povišene razine serumskog *cis*-akonitata u metabolomskom istraživanju AKI inducirane LPS-om u štakora su snižene primjenom ekstrakta bjelanjka jajeta čime je ublažena klinička slika (HUAN i sur., 2022). Uzrok sniženom *cis*-akonitatu u serumu kuja s piometrom i s promjenama u funkciji bubrega povezanim s I stupnjem AKI može biti previše ili premalo piruvata, ali i manjak acetyl-CoA iz oksidacije masnih kiselina. Povišeni *cis*-akonitat u mokraći pasa je naveden kao potencijalni marker CKD-a (FERLIZZA i sur., 2020). Također je i pokazatelj oštećenja tubula koje ima za posljedicu neučinkovitu reapsorpciju koja uzrokuje povišenu koncentraciju *cis*-akonitata (FERLIZZA i sur., 2020). Povišeni *cis*-akonitat u mokraći kuja s piometrom moguće također upućuje na promjene u funkciji bubrega tijekom piometre. U metabolomskom istraživanju seruma kuja s piometrom *cis*-akonitat pokazuje osobine vrlo dobrog biomarkera (AUC >0,8) promjena u funkciji bubrega koje su povezane s I stupnjem AKI.

U metabolomskom istraživanju piometre prije razvoja azotemije su povišene serumske razine malonata. Malonat je međuprodukt biosinteze masnih kiselina pa njegove promjene ukazuju na poremećaj sinteze masnih kiselina. Sinteza masnih kiselina se odvija u mitohondriju gdje iz malonske kiseline nastaje malonil-CoA. Osim u mitohondriju, sinteza masnih kiselina se odvija i u citoplazmi iz acetyl-CoA koji je nastao glikolizom iz piruvata u mitohondrijima. Glikolizom ugljikohidrata nastaje i glicerol koji s tri masne kiseline stvara trigliceride. Sukladno metabolomskom istraživanju piometre malonat je bio povišen u istraživanju AKI štakora inducirane visokom dozom LPS-a (GAO i sur., 2021). Razine serumskog malonata su također bile povišene u istraživanju AKI izazvane LPS-om što je normalizirano nakon primjene ekstrakta bjelanjka jajeta (HUAN i sur., 2022).

Kreatinin nastaje biosintezom iz glicina, arginina i metionina, a djelomično potječe i iz hrane. Psi hranjeni mesnom prehranom (31,4 % proteina) eliminiraju više kreatinina nego psi hranjeni kazeinom (10,4 % proteina) (BRAUN i sur., 2003). U istraživanju metaboloma kuja s piometrom detektirane su snižene razine serumskog kreatinina u fazi promjena u funkciji bubrega povezanim s I stupnjem AKI-a. Većina istraživanja navodi povišene razine kreatinina u serumu koja se odnose na kasnije stadije bubrežnih bolesti. Na dnevnu proizvodnju kreatinina utječu promjene u mišićnoj masi, starenje, ali i CKD i sepsa pa bi razlog sniženom kreatininu u serumu kuja s piometrom mogao biti povezan s jakom upalom, ali i s razlikom u dobroj

strukturi istraživanih skupina kuja. U ljudi s CKD-om dio kreatinina difundira u crijevo gdje se hidrolizira u kreatin, koji se djelomično reapsorbira, a djelomično razgrađuje i izlučuje fecesom, što se ne može isključiti i u pasa s uznapredovalim zatajenjem bubrega (BRAUN i sur., 2003).

U metabolomskom istraživanju piometre kuja u serumu je povišen N-acetil-glutamin u početku I stupnja AKI-a. Nastaje enzimski iz L-glutamina i acetil-CoA, ali je moguća i N-acetilacija slobodnog glutamina. Produkti razgradnje N-acetil-glutamina su N-acetil-L-glutaminska kiselina, glutaminska kiselina i glutamin. N-acetil-glutamin je prisutan u mokraći životinja pa se njegov porast u serumu, kao i drugih N-acetil-aminokiselina, može povezati s poremećajem ekskretorne funkcije bubrega, ali i s upalnim procesom. U istraživanju na pacijentima tretiranim aminoglikozidima ili glikopeptidima je porast N-acetil-glutamina u mokraći ukazao na ozljedu bubrežnih tubula (RACINE i sur., 2004; IZQUIERDO-GARCIA i sur., 2018). U metabolomskom istraživanju SA-AKI u svinja su se nakon i.v. aplikacije žive *E. coli* u serumu povišili glutamin i glukoza, a u mokraći N-acetil-glutamin.

U istraživanju promjena metaboloma seruma kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a rastuća proteinurija, odnosno UPCR, je povezana s padajućim glicinom, L-triptofanom, L-prolinom te rastućim L-karnitinom. Ta povezanost ipak nije statistički značajna između dviju skupina kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a, tj. između skupine s UPCR <0,5 i skupine s UPCR >0,5. Razlog bi mogao biti poremećaj reapsorpcije aminokiselina u tubulima. U istraživanju babezioze pasa neciljanim i ciljanim metabolomskim pristupom je u mokraći zabilježen rastući trend prolina, triptofana i glicina povezan s rastućom vrijednosti UPCR-a (KULEŠ i sur., 2021). Međutim, u metabolomu mokraće kuja s piometrom nije detektiran porast, odnosno aminokiseline nisu identificirane, što kao mogući razlog nudi malnutriciju u sklopu razvoja piometre. Porast L-karnitina detektiran u serumu kuja s piometrom povezan s rastućim UPCR-om naglašava poremećaj u metabolizmu lipida.

U metabolomu mokraće kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a je rastući trend L-glutamata, D-glukonske kiseline i cis-akonitata povezan s rastućim UPCR-om. Iako je korelacija između UPCR-a i cis-akonitata u mokraći umjerena, u metabolomskom istraživanju piometre kuja daje potpuniju informaciju o razvoju početka AKI u piometri jer opada u serumu, a postepeno raste u mokraći s obzirom na rastući UPCR. Cis-akonitat u mokraći pritom pokazuje osobine vrlo dobrog biomarkera početka AKI I u piometri kuja (AUC>0,8).

7. ZAKLJUČCI

1. Neciljanom LC-MS metabolomskom analizom je utvrđeno da se metabolom kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a značajno razlikuje od metaboloma zdravih kuja. Promjene obuhvaćaju biološke puteve koji su povezane s metabolizmom aminokiselina, lipida, ugljikohidrata, nukleinskih kiselina i metabolizmom stanične energije.
2. Prema neciljanom LC-MS metabolomskoj analizi u kuja s piometrom je u serumu najznačajnije promijenjen biološki put biosinteze arginina, a u mokraći put biosinteze fenilalanina, tirozina i triptofana. Na početku I stupnja AKI-a u serumu kuja s piometrom je najznačajnije promijenjen biološki put metabolizma glioksilata i dikarboksilata.
3. Istraživanjem metaboloma seruma kuja s piometrom identificirani su vrlo značajno sniženi metaboliti pantotemat, L-glutamin, L-prolin, L-arginin i L-citrulin. Prema ROC analizi potencijal izvrsnog biomarkera piometre u serumu kuja imaju pantotemat, L-glutamin i L-prolin među kojima najveću moć u razlikovanju skupina ima L-prolin.
4. Analiza metaboloma mokraće kuja s piometrom je utvrdila da su vrlo značajno povišene aminokiseline L-glutamat i L-fenilalanin i da imaju potencijal izvrsnih biomarkera. Veću sposobnost razlikovanja skupina ima L-glutamat.
5. Istraživanjem metaboloma seruma kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a identificiran je 41 metabolit. Pritom su značajno povišeni malonat, N-acetil-glutamin i orotat te značajno sniženi *cis*-akonitat i kreatinin, a potencijal vrlo dobrog biomarkera ima malonat.
6. Analizom metaboloma mokraće kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a identificirano je 12 metabolita. Među njima je vrlo značajno povišen *cis*-akonitat koji također ima potencijal vrlo dobrog biomarkera te najbolju sposobnost razlikovanja skupina.

7. Istraživanje korelacija UPCR-a s metabolitima kod piometre kuja na početku I stupnja AKI-a je otkrilo da prilikom porasta vrijednosti UPCR-a u serumu opadaju razine pantotenata i aminokiselina L-prolina, L-glutamina i glicina, a u mokraći rastu razine L-glutamata, D-glukonske kiseline i *cis*-akonitata.

8. POPIS LITERATURE

ANDRES-HERNANDO, A., N. LI, C. CICERCHI, S. INABA, W. CHEN, C. RONCAL-JIMENEZ, M. T. LE, M. F. WEMPE, T. MILAGRES, T. ISHIMOTO, M. FINI, T. NAKAGAWA, R. J. JOHNSON, M. A. LANASPA (2017): Protective role of fructokinase blockade in the pathogenesis of acute kidney injury in mice. *Nat. Commun.* 8, 1-12.
doi: 10.1038/ncomms14181

ANDRIANOVA, N. V., V. A. POPKOV, N. S. KLIMENKO, A. V. TYAKHT, G. V. BAYDAKOVA, O. Y. FROLOVA, L. D. ZOROVA, I. B. PEVZNER, D. B. ZOROV, E. Y. PLOTNIKOV (2020): Microbiome-Metabolome Signature of Acute Kidney Injury. *Metabolites.* 10(4), 170.
doi: 10.3390/metabo10040142

ANTONOV, A. L., A. S. ATANASOV, I. R. FASULKOV, P. I. GEORGIEV, S. YOTOV, M. KARADAEV, N. V. VASILEV (2015): Influence of some factors on the incidence of pyometra in the bitch. *Bulg. J. Vet. Med.* 18(4), 367-372.
doi:10.15447/bjvm.871

ARENDT, M., A. AMBROSEN, T. FALL, M. KIERCZAK, K. TENGVALL, J. R. S. MEADOWS, A. KARLSSON, A. S. LAGERSTEDT, T. BERGSTROM, G. ANDERSSON, K. LINDBLAD-TOH, R. HAGMAN (2021): The ABCC4 gene is associated with pyometra in golden retriever dogs. *Sci. Rep.* 17;11(1), 16647.
doi:10.1038/s41598-021-95936-1

ARORA, N., J. SANDFORD, G. F. BROWNING, J. R. SANDY, P. J. WRIGHT (2006): A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. *Theriogenology.* 66(6-7), 1530-1536.
doi:10.1016/j.theriogenology.2006.02.019

AUSTGEN, T. R., M. K. CHEN, T. C. FLYNN, W. W. SOUBA (1991): The effects of endotoxin on the splanchnic metabolism of glutamine and related substrates. *J. Trauma.* 31(6), 742-751; discussion 751-752.
doi: 10.1097/00005373-199106000-00003

BAGLEY, R. S., S. A. CENTER, R. M. LEWIS, S. SHIN, S. A. DOUGHERTY, J. F. RANDOLPH, H. ERB (1991): The effect of experimental cystitis and iatrogenic blood contamination on the urine protein/creatinine ratio in the dog. *J. Vet. Intern. Med.* 5(2), 66-70.
doi: 10.1111/j.1939-1676.1991.tb00933.x

BAGRI, H. K., M. SHARMA, M. SETHI, N. SHAH, A. BAISHYA, P. KUMAR, M. BHAKAT, T. K. MOHANTY (2022): An overview on etiopathogenesis of canine pyometra and its management. *The Pharma Innovation Journal.* SP-11(6), 1184-1188

BAJAJ, J. S., G. GARCIA-TSAO, K. R. REDDY, J. G. O'LEARY, H. E. VARGAS, J. C. LAI, P. S. KAMATH, P. TANDON, R. M. SUBRAMANIAN, P. THULUVATH, A. FAGAN, T. SEHRAWAT, R. DE LA ROSA RODRIGUEZ, L. R. THACKER, F. WONG (2021): Admission Urinary and Serum Metabolites Predict Renal Outcomes in Hospitalized Patients With Cirrhosis. *Hepatology.* 74(5), 2699-2713.
doi: 10.1002/hep.31907

BALHARA, N., M. DEVI, A. BALDA, M. PHOUR, A. GIRI (2023): Urine; a new promising biological fluid to act as a non-invasive biomarker for different human diseases. *Urine* 5, 40–52.
doi:10.1016/j.urine.2023.06.001

BARRIOS, C., T. D. SPECTOR, C. MENNI (2015): Blood, urine and faecal metabolite profiles in the study of adult renal disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1-12.
doi: 10.1016/j.abb.2015.10.006

BELLOMO, R., J. A. KELLUM, C. RONCO, R. WALD, J. MARTENSSON, M. MAIDEN, S. M. BAGSHAW, N. J. GLASSFORD, Y. LANKADEVA, S. T. VAARA, A. SCHNEIDER (2017): Acute kidney injury in sepsis. *Int. Care Med.* 43(6), 816-828.
doi: 10.1007/s00134-017-4755-7

BENTLEY, A. M., C. M. OTTO, F. S. SHOFRER (2007): Comparison of dogs with septic peritonitis: 1988–1993 versus 1999–2003. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 17, 391–398.
doi:10.1111/j.1476-4431.2007.00251.x

BEXFIELD, N. H., R. HEIENE, R. J. GERRITSEN, U. RISØEN, K. A. ELIASSEN, M. E. HERRTAGE, A. R. MICHELL (2008): Glomerular filtration rate estimated by 3-sample plasma clearance of iohexol in 118 healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 22(1), 66-73.
doi:10.1111/j.1939-1676.2007.0035.x

BHARGAVA, P., R. G. SCHNELLMANN (2017): Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 629–646.
doi:10.1038/nrneph.2017.107

BIGLIARDI, E., E. PARMIGIANI, S. CAVIRANI, A. LUPPI, L. BONATI & A. CORRADI (2004): Ultrasonography and cystic endometrial hyperplasia - pyometra complex in the bitch. *Repr. Dom. Anim.* 39, 136–140.
doi:10.1111/j.1439-0531.2004.00489.x

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP (2001): Md Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework.
doi:10.1067/mcp.2001.113989

BOASSO, A., G. M. SHEARER (2007): How does indoleamine 2,3-dioxygenase contribute to HIV-mediated immune dysregulation. *Curr. Drug Metab.* 8(3), 217-223.
doi: 10.2174/138920007780362527

BOBULESCU, I. A. (2010): Renal lipid metabolism and lipotoxicity. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19(4), 393-402.
doi:10.1097/MNH.0b013e32833aa4ac

BOELAERT, J., F. LYNEN, G. GLORIEUX, E. SCHEPERS, N. NEIRYNCK, R. VANHOLDER (2017): Metabolic profiling of human plasma and urine in chronic kidney disease by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry: a pilot study. *Anal. Bioanal. Chem.* 409(8), 2201-2211.
doi:10.1007/s00216-016-0165-x

BOUATRA, S., F. AZIAT, R. MANDAL, C. GUO, M. R. WILSON, C. KNOX, T. C. BJORNDahl, R. KRISHNAMURTY, F. SALEEM, P. LIU, Z. T. DAME, J. POELZER, J. HUYNH, F. S. YALLOU, N. PSYCHOGIOS, E. DONG, R. BOGUMIL, C. ROEHRING, D. S. WISHART (2013): The human urine metabolome. *PLoS One*. 4;8(9), 73076.
doi:10.1371/journal.pone.0073076

BOUDONCK, K. J., D. J. ROSE, E. D. KAROLY, D. P. LEE, K. A. LAWTON, P. J. LAPISKAS. (2009): Metabolomics for early detection of drug-induced kidney injury: Review of the current status. *Bioanalysis*. 1(9), 1645-1663.
doi:10.4155/bio.09.142

BOUTRY, C., H. MATSUMOTO, C. BOS, C. MOINARD, L. CYNOBER, Y. YIN, D. TOMé, F. BLACHIER (2012): Decreased glutamate, glutamine and citrulline concentrations in plasma and muscle in endotoxemia cannot be reversed by glutamate or glutamine supplementation: a primary intestinal defect? *Amino Acids*. 43(4), 1485-1498.
doi:10.1007/s00726-012-1221-2

BRAUN, J. P., H. P. LEFEBVRE, A. D. WATSON (2003): Creatinine in the dog: a review. *Vet. Clin. Pathol*. 32(4), 162-179.
doi:10.1111/j.1939-165x.2003.tb00332.x

BREALEY, D., M. BRAND, I. HARGREAVES, S. HEALES, J. LAND, R. SMOLENSKI, N. A. DAVIES, C. E. COOPER, M. SINGER (2002): Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*. 20;360(9328), 219-223.
doi: 10.1016/S0140-6736(02)09459-X

BROOKS, C., Q. WEI, S-G. CHO, Z. DONG (2009): Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *J. Clin. Invest*. 119, 1275–1285.
doi:10.1172/JCI37829

BUGARSKI, M., J. R. MARTINS, D. HAENNI, A. M. HALL (2018): Multiphoton imaging reveals axial differences in metabolic autofluorescence signals along the kidney proximal tubule. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol*. 315, 1613–1625.
doi:10.1152/ajprenal.00165.2018

CALZAVACCA, P., R. G. EVANS, M. BAILEY, R. BELLOMO, C. N. MAY (2015) Cortical and Medullary Tissue Perfusion and Oxygenation in Experimental Septic Acute Kidney Injury. *Crit. Care Med*. 43, 431–439.
doi:10.1097/ccm.0000000000001198

MANRIQUE-CABALLERO, C. L., G. DEL RIO-PERTUZ, H. GOMEZ (2021): Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. *Crit. Care Clin*. 37(2), 279-301.
doi: 10.1016/j.ccc.2020.11.010

CARLOS, G., F. P. DOS SANTOS, P. E. FROEHLICH (2020): Canine metabolomics advances. *Metabolomics*. 16:16.
doi: 10.1007/s11306-020-1638-7

CAVALCANTI DE ANDRADE, A., E. PEREIRA DA SILVA, J. D'ARC DOS SANTOS, K. PESSOA OLIVEIRA, K. P. CHAVES DA SILVA, M. KIKUYO NOTOMI (2023):

Evaluation of kidney injury through early markers in canine pyometra. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 60, 199954.
doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2023.199954

CHAMBERS, S. T. (1995): Betaines: their significance for bacteria and the renal tract. *Clin. Sci. (Lond)* 88(1), 25-27.
doi: 10.1042/cs0880025

CHAWLA, L.S., R. BELLOMO, A. BIHORAC, S. L. GOLDSTEIN, E. D. SIEW, S. M. BAGSHAW, D. BITTLEMAN, D. CRUZ, Z. ENDRE, R. L. FITZGERALD, L. FORNI, S. L. KANE-GILL, E. HOSTE, J. KOYNER, K. D. LIU, E. MACEDO, R. MEHTA, P. MURRAY, M. NADIM, M. OSTERMANN, P. M. PALEVSKY, N. PANNU, M. ROSNER, R. WALD, A. ZARBOCK, C. RONCO, J. A. KELLUM (2017): Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat. Rev. Nephrol.* 13(4), 241-257.
doi: 10.1038/nrneph.2017.2

CHEN, Q., X. LIANG, T. WU, J. JIANG, Y. JIANG, S. ZHANG, Y. RUAN, H. ZHANG, C. ZHANG, P. CHEN, Y. LV, J. XIN, D. SHI, X. CHEN, J. LI, Y. XU (2022): Integrative analysis of metabolomics and proteomics reveals amino acid metabolism disorder in sepsis. *J. Transl. Med.* 20(1), 123.
doi: 10.1186/s12967-022-03320-y

CHEN, Q., X. ZHANG, Q. HU, W. ZHANG, Y. XIE, W. WEI (2023): The alteration of intrauterine microbiota in chronic endometritis patients based on 16S rRNA sequencing analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 22(1), 4.
doi: 10.1186/s12941-023-00556-4

CHEN, Y. M. M., C. S. LEE, P. J. WRIGHT (2006): The roles of progestagen and uterine irritant in the maintenance of cystic endometrial hyperplasia in the canine uterus. *Theriogenology*. 66(6-7), 1537-1544.
doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.019

CHEN, Y. M., P. J. WRIGHT, C. S. LEE, G. F. BROWNING (2003): Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Vet. Microbiol.* 94(1), 57-69.
doi: 10.1016/s0378-1135(03)00063-4

CHENG, S. C., J. QUINTIN, R. A. CRAMER, K. M. SHEPARDSON, S. SAEED, V. KUMAR, E. J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, J. H. MARTENS, N. A. RAO, A. AGHAJANIREFAH, G. R. MANJERI, Y. LI, D. C. IFRIM, R. J. ARTS, B. M. VAN DER VEER, P. M. DEEN, C. LOGIE, L. A. O'NEILL, P. WILLEMS, F. L. VAN DER VEERDONCK, J. W. VAN DER MEER, A. NG, L. A. JOOSTEN, C. WIJMENG, H. G. STUNNENBERG, R. J. XAVIER, M. G. NETEA (2014): mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 345(6204), 1250684.
doi: 10.1126/science.1250684
Erratum in: *Science*. 7;346(6210), aaa1503. Van der Meer, Brian M. J. W. (corrected to van der Veer, Brian M. J. W.)

CHIBA, T., K. D. PEASLEY, K. R. CARGILL, K. V. MARINGER, S. S. BHARATHI, E. MUKHERJEE, Y. ZHANG, A. HOLTZ, N. BASISTY, S. D. YAGOBIAN, B. SCHILLING, E. S. GOETZMAN, S. SIMS-LUCAS (2019): Sirtuin 5 regulates proximal tubule fatty acid oxidation to protect against AKI. *J. Am. Soc. Nephrol* 30, 2384–2398.
doi:10.1681/ASN.2019020163

CHRISTIANS, U., J. KLAWITTER, A. HORNBERGER, J. KLAWITTER (2011): How unbiased is non-targeted metabolomics and is targeted pathway screening the solution? *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12(7), 1053-1066.
doi: 10.2174/138920111795909078

CHRYSOPOLOU, M., M. M. RINSCHEN (2024): Metabolic Rewiring and Communication: An Integrative View of Kidney Proximal Tubule Function. *Annu. Rev. Physiol.* 86, 405–427.
doi:10.1146/annurev-physiol-042222-024724

CIANCOLO, R., J. HOKAMP, M. NABITY (2016): Advances in the evaluation of canine renal disease. *Vet. J.* 215, 21–29.
doi: 10.1016/j.tvjl.2016.04.012

CLARK, J. Z., L. CHEN, C. L. CHOU, H. J. JUNG, J. W. LEE, M. A. KNEPPER (2019): Representation and relative abundance of cell-type selective markers in whole-kidney RNA-Seq data. *Kidney Int.* 95(4), 787-796.
doi: 10.1016/j.kint.2018.11.028

COBRIN, A. R., S. L. BLOIS, S. A. KRUTH, A. C. G. ABRAMS-OGG, C. DEWEY (2013): Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *J. Small Anim. Pract.* 54, 647–655.
doi: 10.1111/jsap.12150

COGGAN, J. A., P. A. MELVILLE, C. M. DE OLIVEIRA, M. FAUSTINO, A. M. MORENO, N. R. BENITES (2008): Microbiological and histopathological aspects of canine pyometra. *Braz. J. Microbiol.* 39(3), 477-483.
doi: 10.1590/S1517-838220080003000012

CONCORDET, D., F. VERGEZ, C. TRUMEL, A. DIQUELOU, D. LANORE, A. LE GARRERES, J. P. PAGES, D. PECHEREAU, C. MEDAILLE, J. P. BRAUN (2008): A multicentric retrospective study of serum/plasma urea and creatinine concentrations in dogs using univariate and multivariate decision rules to evaluate diagnostic efficiency. *Vet. Clin. Pathol.* 37(1), 96-103.
doi: 10.1111/j.1939-165X.2008.00007.x

CORTELLINI, S., A. E. DE CLUE, M. GIUNTI, R. GOGGS, K. HOPPER, J. M. MENARD, R. C. RABELO, E. A. ROZANSKI, C. R. SHARP, D. C. SILVERSTEIN, V. SINNOTT-STUTZMAN, G. STANZANI (2024): Defining sepsis in small animals. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 34(2), 97-109.
doi: 10.1111/vec.13359

CURTHOYS, N. P., O. W. MOE (2014): Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9(9), 1627-1638.
doi: 10.2215/CJN.10391012

D'AMICO, G., C. BAZZI (2003): Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int.* 63(3), 809-825.

doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00840.x

DABROWSKI, R., R. HAGMAN, A. TVARIJONAVICIUTE, J. PASTOR, T. KOCKI, W. A. TURSKI (2015): Serum tryptophan and its metabolites in female dogs undergoing ovariohysterectomy as treatment of pyometra or as elective spay surgery. *Theriogenology*. 83(8), 1279-1286.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.009

DABROWSKI, R., T. KOCKI, M. SZCZUBIAL, W. DABROWSKI, J. PARADA-TURSKA (2013): Kynurenic acid in plasma and endometrium in bitches with pyometra. *Inflammation* 36(1), 131-135.

doi: 10.1007/s10753-012-9527-5

DANILOVA, E. Y., A. O. MASLOVA, A. N. STAVRIANIDI, A. E. NOSYREV, L. D. MALTSEVA, O. L. MOROZOVA (2023): CKD Urine Metabolomics: Modern Concepts and Approaches. *Pathophysiology* 30, 443–466.

doi: 10.3390/pathophysiology30040033

DA SILVA FIGUEIREDO, M., C. MALM, L. DIAS MAMÃO, J. DE OLIVEIRA, J. C. CAMBRAIA VEADO, M. PÁDUA COSTA, P. C. LOPES GURGEL VALENTE, R. DOS SANTOS HORTA, M. LOPES CASTRO, A. GOMES DE CASTRO, L. SBARAINI, E. MATIAS DE SOUZA (2017): Renal injury in female dogs with pyometra. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.47: 05, e20160325.

doi: 10.1590/0103-8478cr20160325

DE OLIVEIRA, E. B., H. F. MONTEIRO, J. M. V. PEREIRA, D. R. WILLIAMS, R. V. PEREIRA, N. SILVA DEL RIO, P. R. MENTA, V. S. MACHADO, F. S. LIMA (2023): Changes in Uterine Metabolome Associated with Metritis Development and Cure in Lactating Holstein Cows. *Metabolites*, 13(11), 1156.

doi: 10.3390/metabo13111156

DE BOSSHERE, H., R. DUCATELLE, H. VERMEIRSCH, W. VAN DEN BROECK, M. CORYN (2001): Cystic endometrial hyperplasia–pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology* 55(7), 1509-1519.

doi: 10.1016/s0093-691x(01)00498-8

DELLEPIANE, S., M. MARENGO, V. CANTALUPPI (2016): Detrimental cross-talk between sepsis and acute kidney injury: new pathogenic mechanisms, early biomarkers and targeted therapies. *Crit. Care* 20:61.

doi: 10.1186/s13054-016-1219-3

DEMIREL, M. A., S. ATALAY VURAL, R. VURAL, O. KUTSAL, Z. GUNEN, S. KUPLULU (2018): Clinical, bacteriological, and histopathological aspects of endotoxic pyometra in bitches. *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.* 24 (5), 663-671.

doi: 10.9775/kvfd.2018.19675

- DETTMER, K., P. A. ARONOV, B. D. HAMMOCK (2007): Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom.* 26(1), 51-78.
doi: 10.1002/mas.20108
- DEUTZ, N. E. (2008): The 2007 ESPEN Sir David Cuthbertson Lecture: amino acids between and within organs. The glutamate-glutamine-citrulline-arginine pathway. *Clin. Nutr.* 27(3), 321-327.
doi: 10.1016/j.clnu.2008.03.010
- DOI, K., A. LEELAHAVANICHKUL, P. S. YUEN, R. A. STAR (2009): Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J. Clin. Invest.* 119(10), 2868-2878.
doi: 10.1172/JCI39421
- DOSSIN, O., S. I. RUPASSARA, H. Y. WENG, D. A. WILLIAMS, P. J. GARLICK, J. P. SCHOEMAN (2011): Effect of parvoviral enteritis on plasma citrulline concentration in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 25(2), 215-221.
doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0671.x
- DURANTON, F., U. LUNDIN, N. GAYRARD, H. MISCHAK, M. APARICIO, G. MOURAD, J.-P. DAURES, K. M. WEINBERGER, A. ARGILES (2014): Plasma and Urinary Amino Acid Metabolomic Profiling in Patients with Different Levels of Kidney Function. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9(1), 37-45.
doi:10.2215/CJN.06000613
- DYSON A., R. BEZEMER, M. LEGRAND, G. BALESTRA, M. SINGER, C. INCE (2011): Microvascular and interstitial oxygen tension in the renal cortex and medulla studied in a 4-h rat model of LPS-induced endotoxemia. *Shock.* 36(1), 83-89.
doi: 10.1097/SHK.0b013e3182169d5a
- EKNOYAN, G. (2002): Emergence of the concept of acute renal failure. *Am. J. Nephrol.* 22(2-3), 225-230.
doi: 10.1159/000063766
- EL-KHOURY, J. M., M. P. HOENIG, G. R. D. JONES, E. J. LAMB. R. P. CHIRAG, N. V. TOLAN, F. P. WILSON (2021): AACC Guidance Document on Laboratory Investigation of Acute Kidney Injury. *American Association for Clinical Chemistry JALM*,1–22.
doi: 10.1093/jalm/jfab020
- ELEFThERIADIS, T., G. PISSAS, M. SOUNIDAKI, N. ANTONIADIS, G. ANTONIADI, V. LIAKOPOULOS, I. STEFANIDIS (2017): Preconditioning of primary human renal proximal tubular epithelial cells without tryptophan increases survival under hypoxia by inducing autophagy. *Int. Urol. Nephrol.* 49, 1297–1307.
doi:10.1007/s11255-017-1596-9
- EMWAS, A. H., C. LUCHINAT, P. TURANO, L. TENORI, R. ROY, R. M. SALEK, D. RYAN, J. S. MERZABAN, R. KADDURAH-DAOUK, A. C. ZERRI, G. A. NAGANA GOWDA, D. RAFTERY, Y. WANG, L. BRENNAN, D. S. WISHART (2015): Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: A review. *Metabolomics* 11(4), 872–

894.

doi: 10.1007/s11306-014-0746-7

ESCOBAR, D. A., A. M. BOTERO-QUINTERO, B. C. KAUTZA, J. LUCIANO, P. LOUGHRAN, S. DARWICHE, M. R. ROSENGART, B. S. ZUCKERBRAUN, H. GOMEZ (2015): Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation protects against sepsis-induced organ injury and inflammation. *J. Surg. Res.* 194 (1), 262–272.
doi:10.1016/j.jss.2014.10.009

EVERTS, B., E. AMIEL, S. C. C. HUANG, A. M. SMITH, C. H. CHANG, W. Y. LAM, V. REDMANN, T. C. FREITAS, J. BLAGIH, G. J. VAN DER WINDT, M. N. ARTYOMOV, R. G. JONES, E. L. PEARCE, E. J. PEARCE (2014): TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKe supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 15, 323–332.
doi: 10.1038/ni.2833

FANI, F., G. REGOLISTI, M. DELSANTE, V. CANTALUPPI, G. CASTELLANO, L. GESUALDO, G. VILLA, E. FIACCADORI (2018): Recent advances in the pathogenetic mechanisms of sepsis-associated acute kidney injury. *J. Nephrol.* 31 (3), 351–359.
doi:10.1007/s40620-017-0452-4

FATOKUN, A. A., N. H. HUNT, H. J. BALL (2013): Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease. *Amino Acids.* 45(6), 1319-1329.
doi: 10.1007/s00726-013-1602-1

FERNIE, A. R., R. N. TRETHEWEY, A. J. KROTZKY, L. WILLMIZER (2004): Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(9), 763-769.
doi: 10.1038/nrm1451

FIENI, F., E. TOPIE, A. GOGNY (2014): Medical treatment for pyometra in dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 49 Suppl 2, 28-32.
doi: 10.1111/rda.12302

FRANSSON, B., A-S. LAGERSTEDT, E. HELLMÉN, P. JONSSON (1997): Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 44(7), 417-426.
doi: 10.1111/j.1439-0442.1997.tb01127.x

FRY, D. E. (2012): Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. *Am. Surg.* 78(1), 1-8.

FUKUDA, S. (2001): Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. *Exp. Anim.* 50(4), 325-329.
doi: 10.1538/expanim.50.325

GAI, Z., T. WANG, M. VISENTIN, G. A. KULLAK-UBLICK, X. FU, Z. WANG (2019): Lipid accumulation and chronic kidney disease. *Nutrients* 11(4), 722.
doi: 10.3390/nu11040722

GAMEIRO, J., J. AGAPITO FONSECA, S. JORGE, J. A. LOPES (2018): Acute Kidney Injury Definition and Diagnosis: A Narrative Review. *J. Clin. Med.* 7(10), 307.
doi: 10.3390/jcm7100307

GAO, Z., X. CHEN (2022): Fatty Acid β -Oxidation in Kidney Diseases: Perspectives on Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front. Pharmacol.* 13, 805281.
doi: 10.3389/fphar.2022.805281

GAO, H., T. YANG, X. CHEN, Y. SONG (2021): Changes of Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney and Liver Injuries in Rats Based on Metabolomics Analysis. *J. Inflamm. Res.* 6;14, 1807-1825.
doi: 10.2147/JIR.S306789

GASSER, B., R. A. RAMIREZ USCATEGUI, M. C. MARONAZI, L. PAVAN, A. P. RODRIGUES SIMOES, F. MARTINATO, P. SILVA, L. ZUCCOLOTTO CRIVELLENTI, M. A. ROSSI FELICIANO (2020): Clinical and ultrasound variables for early diagnosis of septic acute kidney injury in bitches with pyometra. *Scientific RepoRtS* 10(1), 8994.
doi: 10.1038/s41598-020-65902-4

GATTICCHI, L., I. BELLEZZA, R. DEL SORDO, M. J. PEIRCE, A. SIDONI, R. ROBERTI, A. MINELLI (2015): The Tm7sf2 Gene Deficiency Protects Mice against Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury. *PLoS One* 10(11), e0141885.
doi: 10.1371/journal.pone.0141885

GAUTHIER, T., W. CHENC (2022): Modulation of Macrophage Immunometabolism: A New Approach to Fight Infections. *Front. Immunol.* 13, 780839.
doi: 10.3389/fimmu.2022.780839

GBUREK, J., H. BIRN, P. J. VERROUST, B. GOJ, C. JACOBSIN, S. K. MOESTRUP, T. E. WILNOW, E. I. CHRISTENSEN (2003): Renal uptake of myoglobin is mediated by the endocytic receptors megalin and cubilin. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285(3), 451-458.
doi: 10.1152/ajprenal.00062.2003

GEFFRE, A., K. FRIEDRICHS, K. HARR, D. CONCORDET, C. TRUMEL, J. P. BRAUN (2009): Reference values: a review. *Vet. Clin. Pathol.* 38(3), 288-298.
doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00179.x

GENG, C., Y. GUO, C. WANG, C. CUI, W. HAN, D. LIAO, P. JIANG (2020): Comprehensive Evaluation of Lipopolysaccharide-Induced Changes in Rats Based on Metabolomics. *J. Inflamm. Res.* 13, 477-486.
doi: 10.2147/JIR.S266012

GIKA, H. G., G. A. THEODORIDIS, R. S. PLUMB, I. D. WILSON (2014): Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87, 12–25.
doi: 10.1016/j.jpba.2013.06.032

GIORI, L., F. M. TRICOMI, A. ZATELLI, X. ROURA, S. PALTRINIERI (2011): High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis on

urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(4), 682-690.

doi: 10.1177/1040638711407900

GONSALEZ, S. R., A. L. CORTÊS, R. C. D. SILVA, J. LOWE, M. C. PRIETO, L. D.

SILVA LARA (2019): Acute kidney injury overview: From basic findings to new prevention and therapy strategies. *Pharmacol. Ther.* 200, 1-12.

doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.04.001

GOWDA, G. A., D. DJUKOVIC (2014): Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Meth. Mol. Biol.* 1198, 3-12.

doi: 10.1007/978-1-4939-1258-2_1

GRANADOS, J. C., A. K. NIGAM, K. T. BUSH, N. JAMSHIDI, S. K. NIGAM (2021): A key role for the transporter OAT1 in systemic lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 296, 100603.

doi: 10.1016/j.jbc.2021.100603

GRAUER, G. F. (2005): Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. *J. Small Anim. Pract.* 46(10), 469-478.

doi: 10.1111/j.1748-5827.2005.tb00275

GREEN, J.M., J. M. FEUGANG, K. E. PFEIFFER, J. V. STOKES, S. D. BOWERS, P. L.

RYAN (2013): L-Arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 26;11, 15.

doi: 10.1186/1477-7827-11-15

GU, M., M. TAN, L. ZHOU, X. SUN, Q. LU, M. WANG, H. JIANG, Y. LIANG, Q. HOU, X. XUE, Z. XU, C. DAI (2022): Protein phosphatase 2A α modulates fatty acid oxidation and glycolysis to determine tubular cell fate and kidney injury. *Kidney Int.* 102(2), 321-336.

doi: 10.1016/j.kint.2022.03.024

GUPTA, A. K., A. J. DHAMI, S. B. PATEL, R. G. SHAH (2013): Evaluation of clinical biochemistry of blood in bitches affected with pyometra. *Ind. J. Anim. Reprod.* 34, 26-30.

HAGMAN, R., C. GREKO (2005): Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. *Vet. Rec.* 157(7):193-196.

doi: 10.1136/vr.157.7.193

HAGMAN, R., H. KINDAHL, B. A. FRANSSON, A. BERGSTRÖM, B. S. HOLST, A. S. LAGERSTEDT (2006): Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2 α metabolite analysis.

Theriogenology 66(2), 198-206.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.11.002

HAGMAN, R., A. S. LAGERSTEDT, Å. HEDHAMMAR, A. EGENVALL (2011): A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology*.

75(7), 1251-1257.

doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.038

- HAGMAN, R (2014): Diagnostic and prognostic markers for uterine diseases in dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 49 (Suppl 2), 16-20.
doi: 10.1111/rda.12331
- HAGMAN, R. (2017): Molecular aspects of uterine diseases in dogs. *Reprod. Dom. Anim.* 52 (Suppl. 3), 37–42.
doi: 10.1111/rda.13039
- HAGMAN, R. (2022): Pyometra in Small Animals 2.0. *Vet. Clin. Small Anim.* 52, 631–657.
doi: 10.1016/j.cvsm.2022.01.004
- HALL, A. M., S. DE SEIGNEUX (2022): Metabolic mechanisms of acute proximal tubular injury. *Pflügers Archiv – Europ. J. Phys.* 474, 813-827.
doi: 10.1007/s00424-022-02701-y
- HAN, S. H., L. MALAGA-DIEGUEZ, F. CHINGA, H. M. KANG, J. TAO, K. REIDY, K. SUSZTAK (2015): Deletion of Lkb1 in Renal Tubular Epithelial Cells Leads to CKD by Altering Metabolism. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27(2), 439-453.
doi: 10.1681/ASN.2014121181
- HARLEY, L., C. LANGSTON (2012): Proteinuria in dogs and cats. *Can Vet J.* 2012 Jun;53(6):631-8.
- HARZANDI, A., S. LEE, G. BIDKHORI, S. SAHA, B. M. HENDRY, A. MARDINOGLU, S. SHOAIE, C. C. SHARPE (2021): Acute kidney injury leading to CKD is associated with a persistence of metabolic dysfunction and hypertriglyceridemia. *iScience.* 24(2), 102046.
doi: 10.1016/j.isci.2021.102046
- HASSON, D. C., M. WATANABE-CHAILLAND, L. ROMICK-ROSENDALE, A. KOTERBA, D. S. MINER, P. LAHNI, Q. MA, S. L. GOLDSTEIN, P. DEVARAJAN, S. W. STANDAGE (2022): Choline supplementation attenuates experimental sepsis-associated acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 323(3), 255-271.
doi: 10.1152/ajprenal.00033.2022
- HE, F. F., Y. M. WANG, Y. Y. CHEN, W. HUANG, Z. Q. LI, C. ZHANG (2022): Sepsis-induced AKI: From pathogenesis to therapeutic approaches. *Front. Pharmacol.* 15;13, 981578.
doi: 10.3389/fphar.2022.981578
- HEIENE, R., L. MOE, G. MOLMEN (2001): Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. *Res. Vet. Sci.* 70, 129–137.
doi: 10.1053/rvsc.2000.0451
- HEIENE, R., V. KRISTIANSEN, J. TEIGE, J. H. JANSEN (2007): Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. *Acta Vet. Scand.* 49(1), 13.
doi: 10.1186/1751-0147-49-13
- HIMMELFARB, J., E. McMONAGLE, S. FREEDMAN, J. KLENZAK, E. McMENAMIN, P. LE, L. B. PUPIM, T. A. IKIZLER, The PICARD Group (2004): Oxidative stress is

increased in critically ill patients with acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(9), 2449-2456.

doi: 10.1097/01.ASN.0000138232.68452.3B

HOCHER, B., J. ADAMSKI (2017): Metabolomics for clinical use and research in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 13(5), 269-284.

doi: 10.1038/nrneph.2017.30

HOKAMP J. A., M. B. NABITY (2016): Renal biomarkers in domestic species. *Vet. Clin. Pathol.* 45(1), 28-56.

doi: 10.1111/vcp.12333

HOKAMP, J.A., R. E. CIANCOLO, M. M. BOGGESS, G. E. LEES, S. L. BENALI, M. KOVARSKY, M. B. NABITY (2016): Correlation of urine and serum biomarkers with renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 30(2), 591-601.

doi: 10.1111/jvim.13832

HORNE, A. W., S. J. STOCK, A. E. KING (2008): Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 135(6), 739-749.

doi: 10.1530/REP-07-0564

HOSTE, E. A., G. CLERMONT, A. KERSTEN, R. VENKATARAMAN, D. C. ANGUS, D. DE BACQUER, J. A. KELLUM (2006): RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit. Care* 10(3), 73.

doi: 10.1186/cc4915

HOTCHKISS, R. S., A. STRASSER, J. E. McDUNN, P. E. SWANSON (2009): Cell death. *N. Engl. J. Med.* 361(16), 1570-1583.

doi: 10.1056/NEJMr0901217

HOUTEN, S. M., S. VIOLANTE, F. V. VENTURA, R. J. WANDERS (2016): The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 23-44.

doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105045

HSIAO, H. W., K. L. Tsai, L. F. WANG, Y. H. CHEN, P. C. CHIANG, S. M. CHUANG, C. HSU (2012): The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis. *Shock*. 37(3), 289-296.

doi:10.1097/SHK.0b013e318240b52a

HU, Q., Y. QIN, S. JI, X. SHI, W. DAI, G. FAN, S. LI, W. XU, W. LIU, M. LIU, Z. ZHANG, Z. YE, Z. ZHOU, J. YANG Q. ZHUO, X. YU, M. LI, X. XU (2021): MTAP Deficiency–Induced Metabolic Reprogramming Creates a Vulnerability to Cotargeting De Novo Purine Synthesis and Glycolysis in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 81, 4964–4980.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0414

HUAN, G., Y. TAO, W. YU, Z. JINGHUI, Z. YUEMING, S. YANQUING (2022): Egg white protein hydrolysate ameliorated sepsis-induced inflammatory injuries in kidney and liver based on metabolomics analysis. *Biomed. Pharmacother.* 153, 113442.

doi: 10.1016/j.biopha.2022.113442

HUANG, N., Y. WANG, G. ZHAN, F. YU, S. LI, D. HUA, R. JIANG, S. LI, Y. WU, L. YANG, B. ZHU, F. HUA, A. LUO, C. YANG (2019): Contribution of skeletal muscular glycine to rapid antidepressant effects of ketamine in an inflammation-induced mouse model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 236(12), 3513-3523.

doi: 10.1007/s00213-019-05319-8

HUI, S., A. J. COWAN, X. ZENG, L. YANG, T. TESLAA, X. LI, C. BARTMAN, Z. ZHANG, C. JANG, L. WANG, W. LU, J. ROJAS, J. BAUR, J. D. RABINOWITZ (2020): Quantitative Fluxomics of Circulating Metabolites. *Cell Metab*. 32(4), 676-688.

doi: 10.1016/j.cmet.2020.07.013

HUKRIEDE, N., D. E. SORANNO, V. SANDER, T. PERREAU, M. C. STARR, P. S. T. YUEN, L. J. SISKIND, M. P. HUTCHENS, A. J. DAVIDSON, D. M. BURMEISTER, S. FAUBEL, M. P. DE CAESTECKER (2022): Experimental models of acute kidney injury for translational research. *Nat. reviews | Nephrology* 18(5), 277-293.

doi: 10.1038/ s41581-022-00539-2

HUMPHREYS, B. D., M. T. VALERIUS, A. KOBAYASHI, J. W. MUGFORD, S. SOEUNG, J. S. DUFFIELD, A. P. McMAHON, J. V. BONVENTRE (2008): Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem. Cell*. 2(3), 284-291.

doi: 10.1016/j.stem.2008.01.014

HYTONEN, M. K., H. LOHI (2016): Canine models of human rare disorders. *Rare Dis*. 4(1), e1241362.

doi: 10.1080/21675511.2016.1241362

IDROVO, J. P., W. L. YANG, J. NICASTRO, G. F. COPPA, P. WANG (2012): Stimulation of carnitine palmitoyltransferase 1 improves renal function and attenuates tissue damage after ischemia/reperfusion. *J. Surg. Res*. 177(1), 157–164.

doi:10.1016/j.jss.2012.05.053

IHATA, Y., E. MIYAGI, R. NUMAZAKI, T. MURAMATSU, A. IMAIZUMI, H. YAMAMOTO, M. YAMAKADO, N. OKAMOTO, F. HIRAHARA (2014): Amino acid profile index for early detection of endometrial cancer: verification as a novel diagnostic marker. *Int. J. Clin. Oncol*. 19(2), 364-372.

doi: 10.1007/s10147-013-0565-2

ISAKA, Y., T. KIMURA, Y. TAKABATAKE (2011): The protective role of autophagy against aging and acute ischemic injury in kidney proximal tubular cells. *Autophagy* 7(9), 1085–1087.

doi: 10.4161/auto.7.9.16465

IWAKI, T., B. G. BENNION, E. K. STENSON, J. C. LYNN, C. OTINGA, D. DJUKOVIC, D. RAFTERY, L. FEI, H. R. WONG, W. C. LILES, S. W. STANDAGE (2019): PPAR α contributes to protection against metabolic and inflammatory derangements associated with acute kidney injury in experimental sepsis. *Physiol. Rep*. 7(10), e14078.

doi: 10.14814/phy2.14078

- IZQUIERDO-GARCIA, J. L., N. NIN, P. CARDINAL-FERNANDEZ, Y. ROJAS, M. DE PAULA, R. GRANADOS, L. MARTINEZ-CARO, J. RUIZ-CABELLO, J. A. LORENTE (2019): Identification of novel metabolomic biomarkers in an experimental model of septic acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 316(1), 54-62.
doi: 10.1152/ajprenal.00315.2018
- JACOB, F., D. J. POLZIN, C. A. OSBORNE, J. D. NEATON, C. A. KIRK, T. A. ALLEN, L. L. SWANSON (2005): Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226(3), 393-400.
doi: 10.2460/javma.2005.226.393
- JANG, H. S., M. R. NOH, J. KIM, B. J. PADANILAM (2020): Defective Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Lipotoxicity in Kidney Diseases. *Front. Med. (Lausanne)*. 7,65.
doi: 10.3389/fmed.2020.00065
- JANG, H. R., H. RABB (2015): Immune cells in experimental acute kidney injury. *Nat. Rev. Nephrol.* 11(2), 88-101.
doi: 10.1038/nrneph.2014.180
- JENA, B., K. S. RAO, K. C. S. REDDY, K. B. P. RAGHAVEND (2013): Physiological and haematological parameters of bitches affected with pyometra. *Vet. World* 6(7): 409-412.
doi: 10.5455/vetworld.2013.409-412
- JEON, S. H., M. Y. LEE, M. M. RAHMAN, S. J. KIM, G. B. KIM, S. Y. PARK, C. U. HONG, S. Z. KIM, J. S. KIM, H. S. KANG (2009): The antioxidant, taurine reduced lipopolysaccharide (LPS)-induced generation of ROS, and activation of MAPKs and Bax in cultured pneumocytes. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 22(6), 562-566.
doi: 10.1016/j.pupt.2009.07.004
- JEON, S. J., F. CUNHA, A. VIEIRA-NETO, R. C. BICALHO, S. LIMA, M. L. BICALHO, K. N. GALVAO (2017): Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows. *Microbiome* 5(1), 109.
doi: 10.1186/s40168-017-0328-9
- JIN, L., Y. ZHOU (2019): Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol. Lett.* 17(5), 4213-4221.
doi: 10.3892/ol.2019.10112
- JITPEAN, S., B. STRÖM HOLST, U. EMANUELSON, O. HOGLUND, A. PETTERSSON, C. ALNERYD-BULL, R. HAGMAN (2014): Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC Vet. Res.* 10,6.
doi: 10.1186/1746-6148-10-6
- JOHNSON, C. H., J. IVANISEVIC, G. SIUZDAK (2016): Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 17(7), 451-459.
doi: 10.1038/nrm.2016.25

- KALAKECHE, R., T. HATO, G. RHODES, K. W. DUNN, T. M. EL-ACHKAR, Z. PLOTKIN, R. M. SANDOVAL, P. C. DAGHER (2011): Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *J. Am. Soc Nephrol.* 22, 1505–1516.
doi: 10.1681/ASN.2011020203
- KALIM, S., E. P. RHEE (2016): An overview of renal metabolomics. *Kidney Int.* 91(1), 61-69
doi:10.1016/j.kint.2016.08.021
- KALANTARI, S., M. NAFAR (2019): An update of urine and blood metabolomics in chronic kidney disease. *Biomark. Med.* 13(7), 577-597.
doi: 10.2217/bmm-2019-0008
- KANG, H. M., S. H. AHN, P. CHOI, Y. A. KO, S. H. HAN, F. CHINGA, A. S. PARK, J. TAO, K. SHARMA, J. PULLMAN, E. P. BOTTINGER, I. J. GOLDBERG, K. SUSZTAK (2015): Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat. Med.* 21(1), 37-46.
doi: 10.1038/nm.3762
- KAO, C. C., V. BANDI, K. K. GUNTUPALLI, M. WU, L. CASTILLO, F. JAHOR (2009): Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. *Clin. Sci. (Lond)* 117(1), 23-30.
doi: 10.1042/CS20080444
- KARINCH, A. M., M. PAN, C. M. LIN, R. STRANGE, W. W. SOUBA (2001): Glutamine metabolism in sepsis and infection. *J. Nutr.* 131(9 Suppl), 2535-2538, discussion 2550-2551.
doi: 10.1093/jn/131.9.2535S
- KAYMAZ, M. B., A. BASTAN, N. ERUNAL, S. ASLAN, M. FINDIK (1999): The Use of Laboratory Findings in the Diagnosis of CEH-Pyometra Complex in the Bitch. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 23(2), 127-133.
- KAUKONEN, K. M., M. BAILEY, D. PILCHER, D. J. COOPER, R. BELLOMO (2015): Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 372(17), 1629–1638.
doi: 10.1056/NEJMoa1415236
- KEIR, I., J. A. KELLUM (2015): Acute kidney injury in severe sepsis: Pathophysiology, diagnosis, and treatment recommendations. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 25(2), 200–209.
doi: 10.1111/vec.12297
- KELLUM, J. A., N. LEVIN, C. BOUMAN, N. LAMEIRE (2002): Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr. Opin. Crit. Care* 8(6), 509-514.
doi: 10.1097/00075198-200212000-00005
- KHAMIS, M. M., D. J. ADAMKO, A. EL-ANEED (2017): Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrom. Rev.* 36(2), 115-134.
doi: 10.1002/mas.21455

KNIFIC, T., K. VOJK, Š. SMRKOLJ, C. PREHN, J. ADAMSKI, T. L. RIŽNER (2018): Models including plasma levels of sphingomyelins and phosphatidylcholines as diagnostic and prognostic biomarkers of endometrial cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 178, 312-321.

doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.01.012

KOSAKI, K., S. KUMAMOTO, K. TOKINOYA, Y. YOSHIDA, T. SUGAYA, T. MURASE, S. AKARI, T. NAKAMURA, Y. NABEKURA, K. TAKEKOSHI, S. MAEDA (2022): Xanthine oxidoreductase activity in marathon runners: potential implications for marathon-induced acute kidney injury. *J. Appl. Physiol.* 133(1), 1-10.

doi: 10.1152/jappphysiol.00669.2021

KOUNATIDIS, D., N. G. VALLINAOU, S. PSALLIDA, F. PANAGOPOULOS, E. MARGELLOU, D. TSILINGIRIS, I. KARAMEPELA, T. STRATIGOU, M. DALAMAGA (2024): Sepsis-Associated Acute Kidney Injury: Where Are We Now? *Medicina (Kaunas)*. 60(3), 434.

doi: 10.3390/medicina60030434

KREKELER, N., K. M. LODGE, G. A. ANDERSON, G. F. BROWNING, J. A. CHARLES, P. J. WRIGHT (2012): Effect of simulated stages of the canine oestrous cycle on *Escherichia coli* binding to canine endometrium. *Reprod. Domest. Anim.* 47 Suppl 6, 331-334.

doi: 10.1111/rda.12101

KREKELER, N., M. S. MAREDA, G. F. BROWNING, K. M. HOLDEN, J. A. CHARLES, P. J. WRIGHT (2013): The role of Type 1, P and S fimbriae in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium. *Vet. Microbiol.* 164(3-4), 399-404.

doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.028

KRUPA, A., M. M. KRUPA, K. PAWLAK (2022): Indoleamine 2,3 dioxygenase 1-the potential link between the innate immunity and the ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury? *Int. J. Mol. Sci.* 23(11), 6176.

doi:10.3390/ijms23116176

KULEŠ, J., I. RUBIĆ, B. BEER LJUBIĆ, P. BILIĆ, R. BARIĆ RAFAJ, M. BRKLJAČIĆ, R. BURCHMORE, D. ECKERSALL, V. MRLJAK (2021): Combined Untargeted and Targeted Metabolomics Approaches Reveal Urinary Changes of Amino Acids and Energy Metabolism in Canine Babesiosis With Different Levels of Kidney Function. *Front Microbiol.* 2021 Sep 17;12:715701.

doi: 10.3389/fmicb.2021.715701

KUMAR, A., A. SAXENA. (2018): Canine pyometra: Current perspectives on causes and management—A review. *Ind. J. Vet. Sci. Biotech.* 14(01), 52-56.

doi:10.21887/ijvsbt.v14i1.12998

KUPLULU, S., M. R. VURAL, A. DEMIREL, M. POLAT, A. AKCAY (2009): The comparative evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. *Acta Vet. Beograd*, 59(2-3), 193-204.

doi: 10.2298/AVB0903193K

KUWABARA, S., E. GOGGINS, M. D. OKUSA (2022): The pathophysiology of Sepsis-associated AKI. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1050–1069.
doi:10.2215/CJN.00850122

LAN, R., H. GENG, P. K. SINGHA, P. SAIKUMAR, E. P. BOTTINGER, J. M. WEINBERG, M. A. VENKATACHALAM (2016): Mitochondrial Pathology and Glycolytic Shift during Proximal Tubule Atrophy after Ischemic AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27(11), 3356-3367.
doi: 10.1681/ASN.2015020177

LANASPA, M. A., T. ISHIMOTO, C. CICERCHI, Y. TAMURA, C. A. RONCAL-JIMENEZ, W. CHEN, K. TANABE, A. ANDRES-HERNANDO, D. J. ORLICKY, E. FINOL, S. INABA, N. LI, C. J. RIVARD, T. KOSUGI, L. G. SANCHEZ-LOZADA, J. M. PETRASH, Y. Y. SAUTIN, A. A. EJAZ, W. KITAGAWA, G. E. GARCIA, D. T. BONTHRON, A. ASIPU, C. P. DIGGLE, B. ROFRIGUEZ-ITURBE, T. NAKAGAWA, R. J. JOHNSON (2014): Endogenous fructose production and fructokinase activation mediate renal injury in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25(11), 2526-2538.
doi: 10.1681/ASN.2013080901

LANGENBERG, C., L. WAN, M. EGI, C. N. MAY, R. BELLOMO (2007): Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Int. Care Med.* 33(9), 1614–1618.
doi:10.1007/s00134-007-0734-8

LAWRENCE, Y. A., B. C. GUARD, J. M. STEINER, J. S. SUCHODOLSKI, J. A. LIDBURY (2019): Untargeted metabolomic profiling of urine from healthy dogs and dogs with chronic hepatic disease. *PLoS ONE* 14(5), e0217797.
doi:10.1371/journal.pone.0217797

LEE, Y. J., C. C. CHANG, J. P. CHAN, W. L. HSU, K. W. LIN, M. L. WONG (2011): Prognosis of acute kidney injury in dogs using RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage renal failure)-like criteria. *Vet. Rec.* 168(10), 264.
doi: 10.1136/vr.c6234

LEE, S. H., J. W. KIM, B. C. LEE, H. J. OH (2020): Age-specific variations in hematological and biochemical parameters in middle- and large-sized of dogs. *J. Vet. Sci.* 21(1), e7.
doi: 10.4142/jvs.2020.21.e7

LEES, G. E. (2004): Early diagnosis of renal disease and renal failure. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 34(4), 867-885.
doi: 10.1016/j.cvsm.2004.03.004

LEES, G.E., S. A. BROWN, J. ELLIOT, G. E. GRAUER, S. L. VADEN (2005): American College of Veterinary Internal Medicine, 2005. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J. Vet. Intern. Med.* 19(3), 377-385.
doi: 10.1892/0891-6640(2005)19[377:aamopi]2.0.co;2.

LEGOUIS, D., S. E. RICKSTEN, A. FAIVRE, T. VERISSIMO, K. GARIANI, C. VERNEY, P. GALICHON, L. BERCHTOLD, E. FERAILLE, M. FERNANDEZ, S. PLACIER, K.

KOPPITCH, A. HERTIG, P. Y. MARTIN, M. NAESENS, J. PUGIN, A. P. McMAHON, P. E. CIPPA, S. DE SEIGNEUX (2020): Altered proximal tubular cell glucose metabolism during acute kidney injury is associated with mortality. *Nat. Metab.* 2(8), 732-743.

doi: 10.1038/s42255-020-0238-1.

Erratum in: *Nat. Metab.* 2(9), 989.

doi: 10.1038/s42255-020-00283-6

LEISMAN, D. E., T. D. FERNANDES, V. BIJOL, M. N. ABRAHAM, J. R. LEHMAN, M. D. TAYLOR, C. CAPONE, O. YAIPAN, R. BELLOMO, C. S. DEUTSCHMAN (2021): Impaired angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney Int.* 99(1), 148-160.

doi: 10.1016/j.kint.2020.07.047

LEVENTHAL, J. S., J. NI, M. OSMOND, K. LEE, G. L. GUSELLA, F. SALEM, M. J. ROSS (2016): Autophagy Limits Endotoxemic Acute Kidney Injury and Alters Renal Tubular Epithelial Cell Cytokine Expression. *PLoS One.* 11(3), e0150001.

doi: 10.1371/journal.pone.0150001

LEVY, M. M., M. P. FINK, J. C. MARSHALL, E. ABRAHAM, D. ANGUS, D. COOK, J. COHEN, S. M. OPAL, J. L. VINCENT, G. RAMSAY (2003): SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* 31(4), 1250-1256.

doi: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B

LI, Y., N. NOURBAKHS, H. PHAM, R. THAM, J. E. ZUCKERMAN, P. SINGH (2020): Evolution of altered tubular metabolism and mitochondrial function in sepsis-associated acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 319(2), 229-244.

doi: 10.1152/ajprenal.00390.2019

Erratum in: *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 1;320(5), 1019.

doi: 10.1152/ajprenal.00390.2019_COR

LI, Z., S. LU, X. LI (2021): The role of metabolic reprogramming in tubular epithelial cells during the progression of acute kidney injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 78(15), 5731–5741.

doi:10.1007/s00018-021-03892-w

LI, P., S. T. LIAO, J. S. WANG, Q. ZHANG, D. Q. XU, Y. LV, M. H. YANG, L. Y. KONG (2017): Protection by Huang-Lian-Jie-Du decoction and its constituent herbs of lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *FEBS Open Bio.* 7(2), 221-236.

doi: 10.1002/2211-5463.12178

LI, P., G. WU (2023): Amino acid nutrition and metabolism in domestic cats and dogs. *J. Animal Sci. Biotechnol.* 14(19).

doi: 10.1186/s40104-022-00827-8

LIANG, J., Y. LIU (2023): Animal Models of Kidney Disease: Challenges and Perspectives, *Kidney* 360 4(10), 1479–1493.

doi:10.34067/KID.0000000000000227

- LIAO, S., P. LI, J. WANG, Q. ZHANG, D. XU, M. YANG, L. KONG (2016): Protection of baicalin against lipopolysaccharide induced liver and kidney injuries based on ¹H NMR metabolomic profiling. *Toxicol. Res. (Camb)*. 5(4), 1148-1159.
doi: 10.1039/c6tx00082g
- LIM, S. Y., J. M. STEINER, H. CRIDGE (2022): Understanding lipase assays in the diagnosis of pancreatitis in veterinary medicine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 260(11), 1249-1258.
doi: 10.2460/javma.22.03.0144
- LIN, S. H., J. FAN, J. ZHU, Y. S. ZHAO, C. J. WANG, M. ZHANG, F. XU (2020): Exploring plasma metabolomic changes in sepsis: a clinical matching study based on gas chromatography-mass spectrometry. *Ann. Transl. Med.* 8(23), 1568.
doi: 10.21037/atm-20-3562
- LIN, Y., J. RONG, Z. ZHANG (2021): Silent existence of eosinopenia in sepsis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 21(1), 471.
doi: 10.1186/s12879-021-06150-3
- LIPPI, I., F. PERONDI, A. PIERINI, F. BARTOLI, E. GORI, C. MARITI, V. MARCHETTI (2022): Essential and Non-Essential Amino Acids in Dogs at Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Vet. Sci.* 9(7), 331.
doi: 10.3390/vetsci9070331
- LIU, G., X. WU, G. JIA, X. CHEN, H. ZHAO, J. WANG, C. WU, J. CAI (2016): Arginine: New Insights into Growth Performance and Urinary Metabolomic Profiles of Rats. *Molecules* 21(9), 1142.
doi: 10.3390/molecules21091142
- LIU, J., G. ZHOU, X. WANG, D. LIU (2022): Metabolic reprogramming consequences of sepsis: adaptations and contradictions. *Cell. Mol. Life Sci.* 79(8), 456.
doi: 10.1007/s00018-022-04490-0
- LIU, J. X., C. YANG, W. H. ZHANG, H. Y. SU, Z. J. LIU, Q. PAN, H. F. LIU (2019): Disturbance of mitochondrial dynamics and mitophagy in sepsis-induced acute kidney injury. *Life Sci.* 235(5), 116828.
doi:10.1016/j.lfs.2019.116828
- LOPEZ-LOPEZ, A., A. LOPEZ-GONZALVEZ, T. C. BARKER-TEJEDA, C. BARBAS (2018): A review of validated biomarkers obtained through metabolomics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 18(6), 557-575.
doi: 10.1080/14737159.2018.1481391
- LUCIANI, A., C. SIRAC, S. TERRY, V. JAVAUGUE, J. A. PRANGE, S. BENDER, A. BONAUD, M. COGNE, P. AUCOUTURIER, P. RONCO, F. BRIDOUX, O. DEVUYST (2016): Impaired lysosomal function underlies monoclonal light chain-associated renal fanconi syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 2049–2061.
doi: 10.1681/ASN.2015050581

MADDENS, B., S. DAMINET, P. SMETS, E. MEYER (2010): *Escherichia coli* Pyometra Induces Transient Glomerular and Tubular Dysfunction in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 24(6), 1263-1270.

doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0603.x

MADDOX, D. A., J. F. GENNARI (1987): The early proximal tubule: a high-capacity delivery-responsive reabsorptive site. *Am. J. Physiol.* 252(4 Pt 2), 573-584.

doi: 10.1152/ajprenal.1987.252.4.F573

MAHIEU, N. G., G. J. PATTI (2017): Systems-Level Annotation of a Metabolomics Data Set Reduces 25000 Features to Fewer than 1000 Unique Metabolites. *Anal. Chem.* 89(19), 10397-10406.

doi: 10.1021/acs.analchem.7b02380

MAIDEN, M. J., S. OTTO, J. K. BREALEY, M. E. FINNIS, M. J. CHAPMAN, T. R. KUCHEL, C. H. NASH, J. EDWARDS. R. BELLOMO (2016): Structure and function of the kidney in septic shock. A prospective controlled experimental study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194(6), 692–700.

doi:10.1164/rccm.201511-2285OC

MAKRIS, K., L. SPANOU (2016): Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin. Biochem. Rev.* 37(2), 85-98

MARTENSSON, J., R. BELLOMO (2015): Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Critical care clinics* 31, 649–660.

doi:10.1016/j.ccc.2015.06.003

MARX, D., J. METZGER, M. PEJCHINOVSKI, R. B. GIL, M. FRANTZI, A. LATOSINSKA, I. BELCZAKA, S. S. HEINZMANN, H. HUSI, J. ZOIDAKIS, M. KLINGELE, S. HERGET-ROSENTHAL (2018): Proteomics and Metabolomics for AKI Diagnosis. *Seminars in Nephrology*, 38(1), 63–87.

doi: 10.1016/j.semnephrol.2017.09.007

MEDAILLE, C., C. TRUMEL, D. CONCORDET, F. VERGEZ, J. P. BRAUN (2004): Comparison of plasma/serum urea and creatinine concentrations in the dog: a 5-year retrospective study in a commercial veterinary clinical pathology laboratory. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 51(3), 119-123.

doi: 10.1111/j.1439-0442.2004.00616.x

MEDINA-BASTIDAS, D., I. CAMACHO-ARROYO, E. GARCIA-GOMEZ (2022): Current findings in endometrial microbiome: impact on uterine diseases. *Reproduction* 163(5), 81–96.

doi: 10.1530/REP-21-0120

MEYER, C., M. STUMVOLL, J. DOSTOU, S. WELLE, M. HAYMOND, J. GERICH (2002): Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282(2), 428-434.

doi: 10.1152/ajpendo.00116.2001

MISBACH, C., V. CHETBOUL, D. CONCORDET, C. MEDAILLE, P. GRUET, C. SPERANZA, A. C. HOFFMANN, A. ROCHA, D. BALOUKA, A. M. PETIT, E.

- TREHIOU-SECHI, J. L. POUCHELON, H. P. LEFEBVRE (2014): Basal plasma concentrations of routine variables and packed cell volume in clinically healthy adult small-sized dogs: effect of breed, body weight, age, and gender, and establishment of reference intervals. *Vet. Clin. Pathol.* 43(3), 371-380.
doi: 10.1111/vcp.12162
- MÓDIS, K., D. GERO, N. NAGY, P. SZOLECZKY, Z. D. TÓTH, C. SZABÓ (2009): Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis. *Br. J. Pharmacol.* 158(6), 1565–1578.
doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00432.x
- MOLDAL, E.R., M. J. KJELGAARD-HANSEN, M. E. PEETERS, A. NODTVEDT, J.KIRPENSTEIJN (2018): C-reactive protein, glucose and iron concentrations are significantly altered in dogs undergoing open ovariohysterectomy or ovariectomy. *Acta Vet. Scand.* 60(1), 32.
doi: 10.1186/s13028-018-0384-6
- MOLEMA, G., J. G. ZIJLSTRA, M. VAN MEURS, J. KAMPS (2022): Renal microvascular endothelial cell responses in sepsis-induced acute kidney injury. *Nat. Rev. Nephrol.* 18(2), 95–112.
doi:10.1038/s41581-021-00489-1
- MONTAGUE, B., A. SUMMERS, R. BHAWAL, E. T. ANDERSON, S. KRAUS-MALETT, S. ZHANG, R. GOGGS (2022): Identifying potential biomarkers and therapeutic targets for dogs with sepsis using metabolomics and lipidomics analyses. *PLoS One.* 17(7), e0271137.
doi: 10.1371/journal.pone.0271137
- MUÑOZ-PRIETO, A., L. G. GONZÁLEZ-AROSTEGUI, I. RUBIĆ, J. J. CERÓN, A. TVARIJONAVICIUTE, A. HORVATIĆ, V. MRLJAK (2021): Untargeted metabolomic profiling of serum in dogs with hypothyroidism. *Res. Vet. Sci.* 136, 6-10.
doi: 10.1016/j.rvsc.2021.01.023
- MYERS, M. J., E. R. SMITH, P. G. TURFLE (2017): Biomarkers in Veterinary Medicine. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5, 65–87.
doi: 10.1146/annurev-animal-021815-111431
- NABITY, M. B., G. E. LEES, M. M. BOGGESS, M. YERRAMILI, E. OBARE, M. YERRAMILI, A. RAKITIN, J. AGUIAR, R. RELFORD (2015): SDMA assay validation, stability, and evaluation as a marker for early detection of chronic kidney disease in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29(4), 1036-1044.
doi: 10.1111/jvim.12835
- HUI, N. X., M. HARIADI, H. PRIMARITZKY (2017): A Retrospective Study of Canine Pyometra in Segar Veterinary Hospital Kuala Lumpur, Malaysia. Year 2012-2016 in The Veterinary Medicine International Conference 2017, *KnE Life Sci.* 3(6), 153–165.
doi: 10.18502/cls.v3i6.1124
- NISHIMURA, K., A. FUKUDA, K. HISATAKE (2019): Mechanisms of the metabolic shift during somatic cell reprogramming. *Int. J. Mol. Sci.* 20(9), 2254.
doi:10.3390/ijms20092254

NISKANEN, M., M. V. THRUSFIELD (1998): Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. *Vet. Rec.* 143(18), 493-498.
doi: 10.1136/vr.143.18.493

NIVY, R., N. CHAIM, E. HANAEL, G. ABELLS SUTTON, Y. BRUCHIM, I. AROCH, G. SEGEV (2021): Prospective evaluation of 5 urinary biomarkers as predictors of acute kidney injury in nonazotemic, hospitalized dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 35(6), 2812-2820.
doi: 10.1111/jvim.16308

O'NEILL, L. A. J., R. J. KISHTON, J. RATHMELL (2016): A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 553–565.
doi:10.1038/nri.2016.70

OBERT, L. A., S. A. ELMORE, D. ENNULAT, K. S. FRAZIER (2021): A Review of Specific Biomarkers of Chronic Renal Injury and Their Potential Application in Nonclinical Safety Assessment Studies. *Tox. Path.* Vol. 49(5), 996-1023.
doi: 10.1177/0192623320985045

OLIVEIRA, F.R.M.B, J. ASSREUY, R. SORDI (2022): The role of nitric oxide in sepsis-associated kidney injury. *Biosci. Rep.* 42(7), BSR20220093.
doi: 10.1042/BSR20220093

OTTKA, C., K. VAPALAHTI, A.-M. MAATTA, N. HUUSKONEN, S. SARPANEN, L. JALKANEN, H. LOHI (2020): High serum creatinine concentration is associated with metabolic perturbations in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 35(1), 405–414.
doi: 10.1111/jvim.16011

PARIKH, S. M., Y. YANG, L. HE, C. TANG, M. ZHAN, Z. DONG (2015): Mitochondrial function and disturbances in the septic kidney. *Semin. Nephrol.* 35, 108–119.
doi: 10.1016/j.semnephrol.2015.01.01

PATRA, K. C., N. HAY (2014): The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39(8), 347–354.
doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005

PAUDEL, M., S. KAFLE, T. R. GOMPO, K. B. KHATRI, A. ARYAL (2023): Microbiological and hematological aspects of canine pyometra and associated risk factors. *Heliyon* 9(12), 22368.
doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22368

PEERAPORNATANA, S., C. L. MANRIQUE-CABALLERO, H. GÓMEZ, J. A. KELLUM (2019): Acute kidney injury from sepsis: Current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.* 96(5), 1083-1099.
doi: 10.1016/j.kint.2019.05.026

PING, F., Y. GUO, Y. CAO, J. SHANG, S. YAO, J. ZHANG, Y. LI (2019): Metabolomics Analysis of the Renal Cortex in Rats With Acute Kidney Injury Induced by Sepsis. *Front. Mol. Biosci.* 6, 152.
doi: 10.3389/fmolb.2019.00152

- PING, F., Y. LI, Y. CAO, J. SHANG, Z. ZHANG, Z. YUAN, W. WANG, Y. GUO (2021): Metabolomics Analysis of the Development of Sepsis and Potential Biomarkers of Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 6628847.
doi: 10.1155/2021/6628847
- PITON, G., C. MANZON, B. CYPRIANI, F. CARBONNEL, G. CAPELLIER (2011): Acute intestinal failure in critically ill patients: is plasma citrulline the right marker? *Int. Care Med.* 37(6), 911-917.
doi: 10.1007/s00134-011-2172-x
- POEZE, M., Y. C. LUIKING, P. BREEDVELD, S. MANDERS, N. E. DEUTZ (2008): Decreased plasma glutamate in early phases of septic shock with acute liver dysfunction is an independent predictor of survival. *Clin. Nutr.* 27(4), 523-530.
doi: 10.1016/j.clnu.2008.04.006
- POLZIN, D. J. (2010): Chronic kidney disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. St Louis, MO: Saunders Elsevier; 2010, pp. 1990–2021.
- POST, E. H., J. A. KELLUM, R. BELLOMO, J. L. VINCENT (2017): Renal perfusion in sepsis: From macro- to microcirculation. *Kidney Int.* 91(1), 45–60.
doi: 10.1016/j.kint.2016.07.032
- POSTON, J. T., J. L. KOYNER (2019): Sepsis associated acute kidney injury. *BMJ* 364, k4891.
doi:10.1136/bmj.k4891
- PRAPAIWAN, N., S. MANEE-IN, E. OLANRATMANEE, S. SRISUWATANASAGUL (2017): Expression of oxytocin, progesterone, and estrogen receptors in the reproductive tract of bitches with pyometra. *Theriogenology* 89, 131-139.
doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.10.016
- PRENDERGAST, G.C., M. Y. CHANG, L. MANDIK-NAYAK, R. METZ, A. J. MULLER (2011): Indoleamine 2,3-dioxygenase as a modifier of pathogenic inflammation in cancer and other inflammation-associated diseases. *Curr. Med. Chem.* 18(15), 2257-2262.
doi: 10.2174/092986711795656072
- PRETZER, S. D. (2008): Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology* 70, 359–363.
doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.028
- PUSP, A., A. KUMARI, R. TIWARY, B. KUMAR, M. M. ANSARI, R. KUMAR, BHAVNA (2023): Haemodynamic and Haemato-Biochemical Changes with Ketamine, Propofol and Ketofol as Constant Rate Infusion Anesthesia for Elective Ovariectomy in Dogs. *Ind. J. Anim. Res.*
doi: 10.18805/IJAR.B-5065
- QU, X., H. GAO, J. SUN, L. TAO, Y. ZHANG, J. ZHAI, Y. SONG, T. HU, Z. LI (2020): Identification of key metabolites during cisplatin-induced acute kidney injury using an HPLC-TOF/MS-based non-targeted urine and kidney metabolomics approach in rats. *Toxicology*. 431, 152366.

doi: 10.1016/j.tox.2020.152366

RACINE, S. X., P. LE TOUMELIN, F. ADNET, Y. COHEN, M. CUPA, E. HANTZ, L. LE MOYEC (2004): N-acetyl functions and acetate detected by nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine to detect renal dysfunction following aminoglycoside and/or glycopeptide antibiotic therapy. *Nephron Physiol.* 97(4), 53-57.

doi: 10.1159/000079179

RAMACHANDRAN, G (2014): Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence* 5(1), 213-218.

doi: 10.4161/viru.27024

RIMER, D., H. CHEN, M. BAR-NATHAN, G. SEGEV (2022): Acute kidney injury in dogs: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and outcome. *J. Vet. Intern. Med.* 36(2), 609–618.

doi: 10.1111/jvim.16375

RODRIGUES, F. A. P., A. D. D. C. SANTOS, P. H. Q. S. DE MEDEIROS, M. M. G. PRATA, T. C. S. SANTOS, J. A. DA SILVA, G. A. C. BRITO, A. A. DOS SANTOS, E. R. SILVEIRA, A. Â. M. LIMA, A. HAVT (2018): Gingerol suppresses sepsis-induced acute kidney injury by modulating methylsulfonylmethane and dimethylamine production. *Sci. Rep.* 8(1), 12154.

doi: 10.1038/s41598-018-30522-6

RODRIGUEZ-ITURBE, B., J. M. MUSSER (2008): The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19(10), 1855-1864.

doi: 10.1681/ASN.2008010092

RONCO, C., R. BELLOMO, J. A. KELLUM. (2019): Acute kidney injury. *Lancet* 394(10212), 1949-1964.

doi: 10.1016/S0140-6736(19)32563-2

RORTVEIT, R., B. K. SAEVIK, A. V. EGGERTSDOTTIR, E. SKANCKE, F. LINGAAS, S. I. THORESEN, HJ. H. JANSEN (2015): Age-related changes in hematologic and serum biochemical variables in dogs aged 16-60 days. *Vet. Clin. Pathol.* 44(1), 47-57.

doi: 10.1111/vcp.12220

ROSEN, S., N. H. SAMUEL (2001): Difficulties in understanding human “acute tubular necrosis”: limited data and flawed animal models. *Kidney Int.* 60(4), 1220–1224.

doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00930.x

ROSS, L. (2011): Acute Kidney Injury in Dogs and Cats. *Vet. Clin. Small Anim.* 41(1), 1–14.

doi:10.1016/j.cvsm.2010.09.003

ROSSET, E., B. RANNOU, G. CASSELAUX, K. CHALVET-MONFRAY, S. BUFF (2012): Age-related changes in biochemical and hematologic variables in Borzoi and Beagle puppies from birth to 8 weeks. *Vet. Clin. Pathol.* 41(2), 272-282.

doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.00415.x

- RUAUX, C. G., P. C. CARNEY, J. S. SUCHODOLSKI, J. M. STEINER (2012): Estimates of biological variation in routinely measured biochemical analytes in clinically healthy dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 41(4), 541-547.
doi: 10.1111/j.1939-165x.2012.00473.x
- RUBIO, M., K. SATUE, J. M. CARRILLO, A. HERNANDEZ-GUERRA, B. CUERVO, D. CHICHARO, E. DAMIA, A. DEL ROMERO, J. SOPENA (2022): Changes in Hematological and Biochemical Profiles in Ovariohysterectomized Bitches Using an Alfaxalone–Midazolam–Morphine–Sevoflurane Protocol. *Animals* 12(7), 914.
doi:10.3390/ani12070914
- SAITOH, W., S. YAMAUCHI, K. WATANABE, W. TAKASAKI, K. MORI (2014): Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats. *J. Toxicol. Sci.* 39(1), 41-50.
doi: 10.2131/jts.39.41
- SANCHO-MARTINEZ, S. M., A. G. CASANOVA, A. G. DUWEL, K. RIVERO-GARCIA, T. GARCIA-GARRIDO, A. I. MORALES, C. MARTINEZ-SALGADO, F. J. LOPEZ-HERNANDEZ, P. FRAILE (2023): Identification of Pre-Renal and Intrinsic Acute Kidney Injury by Anamnestic and Biochemical Criteria: Distinct Association with Urinary Injury Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* 24(3), 1826.
doi: 10.3390/ijms24031826
- SCHRÖCKSNADL, K., B. WIRLEITNER, C. WINKLER, D. FUCHS (2006): Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta.* 364(1-2), 82-90.
doi: 10.1016/j.cca.2005.06.013
- SEELY, K. A., K. A. SELLY, J. H. HOLTHOFF, S. T. BURNS, Z. WANG, K. M. THAKALI, N. GOKDEN, S. W. RHEE, P. R. MAYEUX (2011): Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 301(1), 209–217.
doi:10.1152/ajprenal.00687.2010
- SHAO, H. B., L. Y. CHU, Z. H. LU, C. M. KANG (2008): “Primary Antioxidant Free Radical Scavenging and Redox Signaling Pathways in Higher Plant Cells”. *Int. J. Biol. Sci.* 4(1), 8-14.
doi:10.7150/ijbs.4.8
- SIMON, N., A. HERTIG (2015): Alteration of fatty acid oxidation in tubular epithelial cells: from acute kidney injury to renal fibrogenesis. *Front. Med.* 2, 52.
doi: 10.3389/fmed.2015.00052
- SINDELAR, M., G. J. PATTI (2020): Chemical Discovery in the Era of Metabolomics. *J. Am. Chem. Soc.* 142(20), 9097–9105.
doi: 10.1021/jacs.9b13198
- SINGER, M., C. S. DEUTSCHMANN, C. W. SEYMOUR, M. SHANKAR-HARI, D. ANNANE, M. BAUER, R. BELLOMO, G. R. BERNARD, J.-D. CHICHE, C. M. COOPERSMITH, R. S. HOTCHKISS, M. M. LEVY, J. C. MARSHALL, G. S. MARTIN, S. M. OPAL, G. D. RUBENFELD, T. VAN DER POLL, J.-L. VINCENT, D. C. ANGUS

(2016): The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315 (8), 801–810.
doi:10.1001/jama.2016.0287

SINGH, P., M. D. OKUSA (2011): The role of tubuloglomerular feedback in the pathogenesis of acute kidney injury. *Contr. Nephrol.* 174, 12–21.
doi:10.1159/000329229

SMITH, J. A., L. J. STALLONS, R. G. SSHNELLMAN (2014): Renal cortical hexokinase and pentose phosphate pathway activation through the EGFR/Akt signaling pathway in endotoxin-induced acute kidney injury. *Am. J. Phys. Ren. Phys.* 307(4), 435–44.
doi: 10.1152/ajprenal.00271.2014

SOARES, S., L. C. R. SOUZA, M. T. D. CRONIN, A. M. WAAGA-GASSER, M. F. GROSSI, G. R. FRANCO, C. A. TAGLIATI (2020): Biomarkers and in vitro strategies for nephrotoxicity and renal disease assessment. *J. Nephrol. Renal Dis.* 5(1), 1-14.
doi: 10.15761/NRD.1000162

SOTO-HEREDERO, G., M. M. GOMEZ DE LAS HERAS, E. GABANDE-RODRIGUEZ, J. OLLER, M. MITTELBRUNN (2020): Glycolysis– a key player in the inflammatory response. *FEBS J.* 287(16), 3350–3369.
doi: 10.1111/febs.15327

STANDAGE, S. W., S. XU, L. BROWN, Q. MA, A. KOTERBA, P. LAHNI, P. DEVARAJAN, M. A. KENNEDY (2021): NMR-based serum and urine metabolomic profile reveals suppression of mitochondrial pathways in experimental sepsis-associated acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 320(5), 984-1000.
doi: 10.1152/ajprenal.00582.2020

STRÖM HOLST, B., B. LARSSON, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, A. S. LAGERSTEDT, C. LINDE-FORSBERG (2001): Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. *J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 48(10), 587-592.
doi: 10.1046/j.1439-0442.2001.00388.x

SUCHODOLSKI, J. S. (2022): Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Vet. Clin. Pathol.* 50 (Suppl. 1), 6–17.
doi: 10.1111/vcp.13031

SUMMERS, A. M., N. VEZZI, T. GRAVELYN, C. CULLER, J. GUILLAUMIN (2021): Clinical features and outcome. Of septic shock in dogs: 37cases (2008-2015). *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. 31(3), 360-370.
doi: 10.1111/vec.13038

SUN, L., X. YANG, Z. YUAN, H. WANG (2020): Metabolic reprogramming in immune response and tissue inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40(9), 1990–2001.
doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314037

SUN, J., M. SHANNON, Y. ANDO, L. K. SCHNACKENBERG, N. A. KHAN, D. PORTILLA, R. D. BEGER (2012): Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: a pilot study. *J. Chrom. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-894, 107-13.

doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.042

SUN, J., J. ZHANG, J. TIAN, G. M. VIRZI, K. DIGVIJAY, L. CUETO, Y. YIN, M. H. ROSNER, C. RONCO (2019): Mitochondria in sepsis-induced AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* 30 (7), 1151–1161.
doi:10.1681/ASN.2018111126

TAN, B., J. CHEN, S. QIN, C. LIAO, Y. ZHANG, D. WANG, S. LI, Z. ZHANG, P. ZHANG, F. XU (2021): Tryptophan Pathway-Targeted Metabolomics Study on the Mechanism and Intervention of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury in Rats. *Chem. Res. Toxicol.* 34(7), 1759-1768.
doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00110

THOEN, M. E., M. E. KERL. (2011): Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. 21(6), 648-657.
doi:10.1111/j.1476-4431.2011.00689.x

TOKARZ, J., J. ADAMSKI, T. L. RIŽNER (2020): Metabolomics for Diagnosis and Prognosis of Uterine Diseases? A Systematic Review. *J. Pers.* 10(4), 294.
doi: 10.3390/jpm10040294

TOROSYAN, R., S. HUANG, P. V. BOMMI, R. TIWARI, S. Y. AN, M. SCHONFELD, G. RAJENDRAN, M. A. KAVANAUGH, B. GIBBS, A. D. TRUAX, S. BOHNEY, M. W. CALCUTT, E. W. KERR, R. LEONARDI, P. GAO, N. S. CHANDEL, P. P. KAPITSINOU (2021): Hypoxic preconditioning protects against ischemic kidney injury through the IDO1/kynurenine pathway. *Cell Rep.* 36(7), 109547.
doi: 10.1016/j.celrep.2021.109547

TRAN, M., D. TAM, A. BARDIA, M. BHASIN, G. C. ROWE, A. KHER, Z. K. ZSENGELLER, M. R. AKHAVAN-SHARIF, E. V. KHANKIN, M. SAINTGENIEZ, S. DAVID, D. BURSTEIN, S. A. KARUMANCHI, I. E. STILLMAN, Z. ARANY, S. M. PARIKH (2011): PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* 121(19), 4003–4014.
doi: 10.1172/JCI58662

VADEN, S. L., B. M. PRESSLER, M. R. LAPPIN, W. A. JENSEN (2004): Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. *Vet. Clin. Pathol.* 33(1), 14-19.
doi:10.1111/j.1939-165x.2004.tb00343.x

VAIRAKKANI, R., M. E. FERNANDO, T. Y. RAJ (2020): Metabolome and Microbiome in Kidney Diseases. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 31(1), 1-9.
doi:10.4103/1319-2442.279927

VAN DE POLL, M. C. G., Y. C. LUIOKING, C. H. C. DEJONG, P. B. SOETERS (2005): Amino acids: Specific functions. In B. Caballero, L. Allen, & A. Prentice (Eds), *Encyclopedia of human nutrition*, 2nd edition, pp. 92-100. Elsevier Ltd.
doi: 10.1016/B0-12-226694-3/02012-3

VAN DER SLIKKE, E. C., B. S. STAR, M. VAN MEURS, R. H. HENNING, J. MOSER, H. R. BOUMA (2021). Sepsis is associated with mitochondrial DNA damage and a reduced mitochondrial mass in the kidney of patients with sepsis-AKI. *Crit. Care* 25(1), 36.
doi: 10.1186/s13054-020-03424-1

VAUPEL, P., H. SCHMIDBERGER, A. MAYER (2019): The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int. J. Radiat. Biol.* 95(7), 912–919.
doi: 10.1080/09553002.2019.1589653

VERISSIMO, T., A. FAIVRE, A. RINALDI, M. LINDENMEYER, V. DELITSIKOU, C. VEYRAT-DUREBEX, C. HECKENMEYER, M. FERNANDEZ, L. BERCHTOLD, D. DALGA, C. COHEN, M. NAESENS, S. E. RICKSTEN, P. Y. MARTIN, J. PUGIN, F. MERLIER, K. HAUPT, J. M. RUTKOWSKI, S. MOLL, P. E. CIPPA, D. LEGOUIS, S. DE SEIGNEUX (2022): Decreased renal gluconeogenesis is a hallmark of chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 33(4), 810-827.
doi: 10.1681/ASN.2021050680

VERMA, S. K., B. A. MOLITORIS (2015): Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. *Seminars in nephrology* 35(1), 96–107.
doi: 10.1016/j.semnephrol.2015.01.010

VERSTEGEN, J., G. DHALIWALD, K. VERSTEGEN-ONCLIN (2008): Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*. 70(3), 364-374.
doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.036

VIAANT, M. R., C. LUDWIG, S. RHODES, U. L. GÜNTHER, D. ALLAWAY (2007): Validation of a urine metabolome fingerprint in dog for phenotypic classification. *Metabolomics*, 3(4), 453–463.
doi: 10.1007/s11306-007-0092-0

WALTZ, P., E. CARCHMAN, H. GOMEZ, B. ZUCKERBRAUN (2016): Sepsis results in an altered renal metabolic and osmolyte profile. *J. Surg. Res.* 202(1), 8-12.
doi: 10.1016/j.jss.2015.12.011

WANG, L., X. XING, X. ZENG, S. R. JACKSON, T. TESLAA, O. AL-DALAHMAH, L. Z. SAMARAH, K. GOODWIN, L. YANG, M. R. McREYNOLDS, X. LI, J. J. WOLFF, J. D. RABINOWITZ, S. M. DAVIDSON (2022): Spatially resolved isotope tracing reveals tissue metabolic activity. *Nat. Methods*. 19(2), 223-230.
doi: 10.1038/s41592-021-01378-y

WANG, W., S. JITTIKANONT, S. A. FALK, P. LI, L. FENG, P. E. GENGARO, B. D. POOLE, R. P. BOWLER, B. J. DAY, J. D. CRAPO, R. W. SCHRIER (2003): Interaction amount nitric oxide, reactive oxygen species and antioxidants during endotoxaemia-related acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284(3), 532-537.
doi: 10.1152/ajprenal.00323.2002

WASUNG, M. E., L. S. CHAWLA, M. MADERO (2015): Biomarkers of renal function, which and when? *Clin. Chim. Acta* 438, 350–357.
doi: 10.1016/j.cca.2014.08.039

WIRTHGEN, E., A. HOEFLICH, A. REBL, J. GÜNTHER (2018): Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions. *Front. Immunol.* 8, 1957.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01957

WU, G., F. W. BAZER, T. A. DAVIS, S. W. KIM, P. LI, J. MARC RHOADS, M. CAREY SATTERFIELD, S. B. SMITH, T. E. SPENCER, Y. YIN (2009): Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 37(1), 153-168.
doi: 10.1007/s00726-008-0210-y

WU, T., Y. CHEN, M. YANG, S. WANG, X. WANG, M. HI, X. CHENG, J. WAN, Y. HU, Y. DING, X. ZHANG, M. DING, Z. HE, H. LI, X.-J. ZHANG (2023): Comparative plasma and urine metabolomics analysis of juvenile and adult canines. *Front. Vet. Sci.* 9, 1037327.
doi: 10.3389/fvets.2022.1037327

XU, B., W. LI, Y. ZHANG, Y. CHEN, J. FENG, X. SONG (2023): Untargeted and spatial-resolved metabolomics characterize serum and tissue-specific metabolic reprogramming in acute kidney injury. *Heliyon*. 9(11), 21171.
doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e21171

XU, C., A. CHANG, B. K. HACK, M. T. EADON, S. L. ALPER, P. N. CUNNINGHAM (2014): TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. *Kidney Int.* 85(1), 72–81.
doi:10.1038/ki.2013.286

YAMADA, H., J. NAKADA, C. AIZAWA, H. ENDOU (1986): Intra- and inter-nephron heterogeneity of gluconeogenesis in the rat: effects of chronic metabolic acidosis and potassium depletion. *Pflugers Arch.* 407(1), 1–7.
doi: 10.1007/BF00580712

YAMAMOTO, T., Y. TAKABATAKE, S. MINAMI, S. SAKAI, R. FUJIMURA, A. TAKAHASHI, T. NAMBA-HAMANO, J. MATSUDA, T. KIMURA, I. MATSUI, J. Y. KAIMORI, H. TAKEDA, M. TAKAHASHI, Y. IZUMI, T. BAMBIA, T. MATSUSAKA, F. NIIMURA, M. YANAGITA, Y. ISAKA (2021): Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. *Autophagy*. 17(7), 1700-1713.
doi: 10.1080/15548627.2020.1782034

YANG, J., R. ZHOU, Z. MA (2019): Autophagy and energy metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1206, 329–357.
doi:10.1007/978-981-15-0602-4_16

YOON, H. Y., J. Y. BYUN, K. H. PARK, B. S. MIN, J. H. KIM. (2017): Sterile pyometra in two dogs. *Immune Netw.* 17(2), 128-131.
doi: 10.4110/in.2017.17.2.128

- ZAGER, R. A., K. M. BURKHART, A. C. JOHNSON, B. M. SAKS (1999): Increased proximal tubular cholesterol content: implications for cell injury and “acquired cytoresistance”. *Kidney Int.* 56(5), 1788–1797.
doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00745.x
- ZAGER, R. A., A. C. JOHNSON, K. BECKER (2014): Renal cortical pyruvate depletion during AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25(5), 998–1012.
doi:10.1681/ASN.2013070791
- ZANG, X., M. E. MONGE, F. M. FERNANDEZ (2019): Mass Spectrometry-Based Non-targeted Metabolic Profiling for Disease Detection: Recent Developments. *Trends Analyt. Chem.* 118, 158-169.
doi: 10.1016/j.trac.2019.05.030
- ZARAGOZA, C., R. BARRERA, F. CENTENO, J. A. TAPIA, M. C. MANE (2003): Canine pyometra: a study of the urine proteins by SDS–PAGE and Western blot. *Theriogenology* 61, 1259-1272. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.07.019
- ZHAN, F., X. WANG, J. ZHANG, S. YI, P. HE (2021): Glutamine alleviates the renal dysfunction associated with gentamicin-induced acute kidney injury in Sprague-Dawley rats. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69(1), 323-329.
doi: 10.1002/bab.2111
- ZHANG, F., X. WANG, L. PAN, W. WANG, N. LI, J. LI (2009): Glutamine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Nutrition.* 25(6), 692-698.
doi: 10.1016/j.nut.2008.11.032
- ZHAO, L., Y. HAO, S. TANG, X. HAN, R. LI, X. ZHOU (2023): Energy metabolic reprogramming regulates programmed cell death of renal tubular epithelial cells and might serve as a new therapeutic target for acute kidney injury. *Front. Cell Dev. Biol.* 11, 1276217.
doi: 10.3389/fcell.2023.1276217
- ZHENG, Y., X. SHI, J. HOU, S. GAO, Y. CHAO, J. DING, L. CHEN, Y. QIAN, G. SHAO, Y. SI, W. CHEN (2021): Integrating metabolomics and network pharmacology to explore *Rhizoma Coptidis* extracts against sepsis-associated acute kidney injury. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1164, 122525.
doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122525
- ZHENG, H.-H., C.-T. DU, Y.-Z. ZHANG, C.YU, R.-L. HUANG, X.-Y. TANG, G.-H. XIE (2022): Identification of Canine Pyometra-Associated Metabolites Using Untargeted Metabolomics. *Int. J. Mol. Sci.* 23(22), 14161.
doi: 10.3390/ijms232214161
- ZHU, Y., T. LI, S. RAMOS DA SILVA, J. J. LEE, C. LU, H. EOH, J. U. JUNG, S. J. GAO (2017): A Critical Role of Glutamine and Asparagine γ -Nitrogen in Nucleotide Biosynthesis in Cancer Cells Hijacked by an Oncogenic Virus. *mBio.* 8(4), e01179-17.
doi: 10.1128/mBio.01179-17
- ZINI, E., U. BONFANTI, A. ZATELLI (2004): Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and

comparison with renal histologic findings in dogs. Am. J. Vet. Res. 65(7), 964-971.
doi: 10.2460/ajvr.2004.65.964

9. POPIS KRATICA

ADH – antidiuretski hormon

AKI – akutna ozljeda bubrega (engl. *Acute Kidney Injury*)

AKIN – Mreža akutne ozljede bubrega (engl. *The Acute Kidney Injury Network*)

ANOVA – analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)

ARF – akutno zatajenje bubrega (engl. *Acute Renal Failure*)

ATP - adenozin-trifosfat

CD 36 – klaster diferencijacije 36 (engl. *Cluster of Differentiation 36*)

CE – kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*)

CI – interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*)

CLP – podvezivanje i punkcija cekuma (engl. *Cecal Ligation and Puncture*)

CEH – cistična hiperplazija endometrija (engl. *Cystic Endometrial Hyperplasia*)

CoA – koenzim A

DAMP – molekularne čestice povezane s oštećenjem (engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

FABP – protein koji vezuje masne kiseline (engl. *Fatty Acid Binding Protein*)

Fischer's LSD — Fischerova metoda najmanje značajne razlike (engl. *Fisher's Least Significant Difference Method*)

FDR – mjera lažno otkrivenih rezultata (engl. *False Discovery Rate*)

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

GC-MS – plinska kromatografija i spektrometrija masa (engl. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)

GFR – stupanj glomerularne filtracije (engl. *Glomerular Filtration Rate*)

HILIC – tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

IRIS – Međunarodno udruženje za pitanja bubrega (engl. *The International Renal Interest Society*)

KDIGO – udruženje Bolest bubrega/Poboljšanje globalnih ishoda (engl. *The Kidney Disease / Improving Global Outcomes*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LC-MS – tekućinska kromatografija i spektrometrija masa (engl. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)

LDH – laktat-dehidrogenaza

MODS – sindrom višestrukog zatajenja organa (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*)

MS – spektrometrija masa (engl. *Mass Spectrometry*)

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

NADPH – reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NLR – receptori slični oligomerizacijskoj domeni koja vezuje nukleotide (engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)

NF- κ B – nuklearni faktor kapa B (engl. *Nuclear Factor kappa B*)

PAMP – molekularne čestice povezane s patogenim uzročnikom (engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

OAT – prijenosnik organskih aniona (engl. *Organic Anion Transporter*)

OCT – prijenosnik organskih kationa (engl. *Organic Cation Transporter*)

PCA – analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*)

PLS-DA – djelomična diskriminantna analiza najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares - Discriminant Analysis*)

RIFLE – (engl. *Risk-Injury-Failure-Loss-End stage kidney disease*)

ROS – reaktivne vrste kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SIRS – sindrom sistemskog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

SDMA – simetrični dimetil-arginin (engl. *Symmetric Dimethylarginine*)

SOD – superoksid-dismutaza

SOFA – procjena sekvencijalnog zatajenja organa (engl. *Sequential Organ Failure Assesment*)

TLR - receptor sličan *Toll*-u (engl. *Toll-like receptor*)

TNF- α - čimbenik tumorske nekroze α (engl. *Tumor Necrosis Factor alpha*)

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

UPLC – ultra učinkovita tekućinska kromatografija (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*)

UPCR – omjer ukupnih proteina i kreatinina u mokraći (engl. *Urine Protein to Creatinine Ratio*)

USG – specifična težina mokraće (engl. *Urine Specific Gravity*)

VIP – projekcija važnosti varijable (engl. *Variable Importance in Projection*)

10. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

10.1. ŽIVOTOPIS

Dora Ivšić Škoda je rođena 7. ožujka 1972. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole 1986. godine odlučuje se za srednjoškolsko obrazovanje u Obrazovnom centru za jezike u Zagrebu. Godine 1990. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu na kojem je 1999. godine diplomirala smjer Medicinske biokemije. Stažirala je u Općoj bolnici „Dr. Ivo Pedišić“ u Sisku i položivši Državni ispit godine 2003. stekla Licencu za samostalan rad. Godine 2004. zapošljava se na određeno vrijeme u Specijalnoj bolnici za kronične bolesti dječje dobi u Gornjoj Bistri kao zamjena voditeljice Općeg laboratorija. Na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu radi od 2007. godine u laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti kao tehnički suradnik na radnom mjestu voditelja laboratorija. Poslijediplomski Doktorski studij iz veterinarskih znanosti je upisala 2012. godine.

Udana je i majka petero djece.

10.2. POPIS RADOVA

a) Radovi u časopisima / Znanstveni i pregledni radovi

GRDEN, D., J. GOTIĆ, I. ŠMIT, M. CRNOGAJ, N. BRKLJAČA BOTTEGARRO, K. ŠIMONJI, D. IVŠIĆ ŠKODA, B. BEER LJUBIĆ, N. KUČER (2020): EKG u hrvatskog posavca i lipicanca – frekvencija i ritam // Veterinarska stanica, 51 (2020), 1;33-45

GREGURIĆ GRAČNER, G., Ž. PAVIČIĆ, J. GRIZELJ, D. IVŠIĆ ŠKODA, A. DOVČ, S. ŽUŽUL, M. BENIĆ, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ (2019): Corticosterone values and blood biochemistry in a model of streptozotocin-induced diabetes: the influence of dietary n6/n3 ratio // Veterinarski arhiv, 89 (2019), 6, 885-894. doi: 10.24099/vet.arhiv.0364

MESARIĆ, J., I. KIŠ. L. ARAČIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, J. FORŠEK, V. MATIJATKO, M. TORTI, M. BRKLJAČIĆ, V. MRLJAK (2013): Žučne kiseline u pasa i mačaka, osnove

fiziologije i laboratorijskih metoda za određivanje žučnih kiselina u biološkim uzorcima // Veterinarska stanica, 44 (2013), 6;469-474

b) Radovi u zbornicima skupova / Znanstveni radovi u zbornicima skupova

KUČER, N., H. TKALČEVIĆ, I. JOVIĆ, M. BRKLJAČIĆ, M. CRNOGAJ, J. GOTIĆ, G. JURKIĆ KRSTESKA, I. ŠMIT, I. MAYER, D. GRDEN, K. ŠIMONJI, N. LEMO, I. KIŠ, V. MATIJATKO, D. POTOČNJAK, J. FORŠEK, B. BEER LJUBIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, V. BENKO, F. PEK, R. BARIĆ RAFAJ (2016): Liječenje pasa oboljelih od malignog limfoma - iskustvo klinike. Zbornik radova, 6. Hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 26.-29. listopada, Opatija, Hrvatska, str. 495-506.

ŽIVIČNJAK, T., F. MARTINKOVIĆ, LJ. PINTER, D. IVŠIĆ ŠKODA (2014): Canine leishmaniasis in Croatia – an update // Infectious and parasitic diseases of animals 5th International Scientific Proceedings of scientific contributions and abstracts. 2014. Str. 448-450

c) Sažeci sa skupova / Sažeci u zbornicima i časopisima

EFENDIĆ, M., B. BEER LJUBIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, V. ĐURIĆ, E. PONGRAC, G. JURKIĆ, V. MATIJATKO, M. BRKLJAČIĆ, N. KUČER, M. TORTI et al. (2023): A challenging case of canine Angiostrongylosis – a case report // Book of Abstracts of 10th International Congress Veterinary Science and Profession /Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023. Str. 98-98

BEER LJUBIĆ, B., M. CRNOGAJ, V. ĐURIĆ, D. GRDEN, L. EĆIMOVIĆ, G. JURKIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, M. TORTI, J. ALADROVIĆ (2021): Is it possible to use EDTA plasma as a sample for biochemical analyses in veterinary laboratory diagnostics? // Book of Abstracts of the 9th International Congress Veterinary Science and Profession. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2021. Str. 86-86

ĐURIĆ, V., N. KUČER, M. BRKLJAČIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, I. KIŠ, T. DODIG, L. EĆIMOVIĆ, N. SUBAŠIĆ, B. BEER LJUBIĆ (2021): What hematological parameters in dogs are affected when the blood is lipemic? // Book of Abstracts of the 9th International Congress

Veterinary Science and Profession. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2021. Str. 87-87

EĆIMOVIĆ, L., I. ŠMIT, V. ĐURIĆ, J. GOTIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, I. FILIPČIĆ, K. ŠIMONJI, B. BEER LJUBIĆ (2021): Does storage of blood in EDTA tube affect hematologic parameters or not? // Book of Abstracts of the 9th International Congress Veterinary Science and Profession. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2021. Str. 85-85

IVŠIĆ ŠKODA D., V. ĐURIĆ, L. EĆIMOVIĆ, D. GRAČNER, I. JOVIĆ, M. EFENDIĆ, E. MADUNA, B. BEER LJUBIĆ (2021): Reliability of analysis of canine urine preserved with boric acid // Book of Abstracts of the 9th International Congress Veterinary Science and Profession. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2021. Str. 100-100

BENKO, V., D. IVŠIĆ 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 etiologic factors. Zbornik sažetaka, 8. međunarodni kongres „Veterinarska znanost i struka“, 10.-12. Listopada 2019., Zagreb, Hrvatska, str. 141.

IVŠIĆ ŠKODA, D., V. BENKO, LJ. DUKARIĆ (2019): Comparison of standard clotting tests in dogs between QuickVet and ACL analyzers // Book of Abstracts of the 8th International Congress Veterinary Science and Profession. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2019. Str. 142-142

d) Druga sudjelovanja na skupovima

BARIĆ RAFAJ, R., J. KULEŠ, I. RUBIĆ, D. IVŠIĆ ŠKODA, N., KUČER, V. MRLJAK (2022): Proteomic characterisation of feline obesity // 4th International Symposium on Frontiers in Molecular Science: Biochemistry, Molecular Biology and éDruggability of Proteins Firenca, Italija, 06.09.2022-09.09. 2022.

e) Sudjelovanje na radionicama:

Post-genomic era of Molecular -Biology: Proteomics ERA II, Veterinarski fakultet u Zagrebu, 14.-16. studenog, 2017.

11. PRILOG

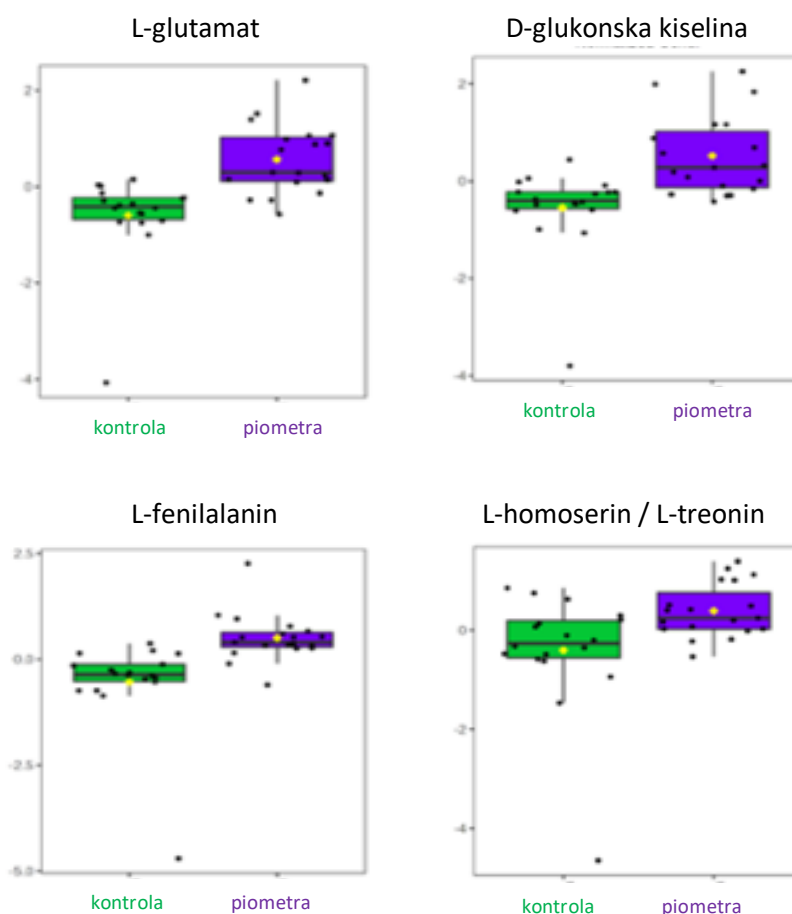
NECILJANA METABOLOMSKA ANALIZA MOKRAĆE S *OUTLIEROM*

a) ISTRAŽIVANJE PIOMETRE KUJA

Tablica 1.

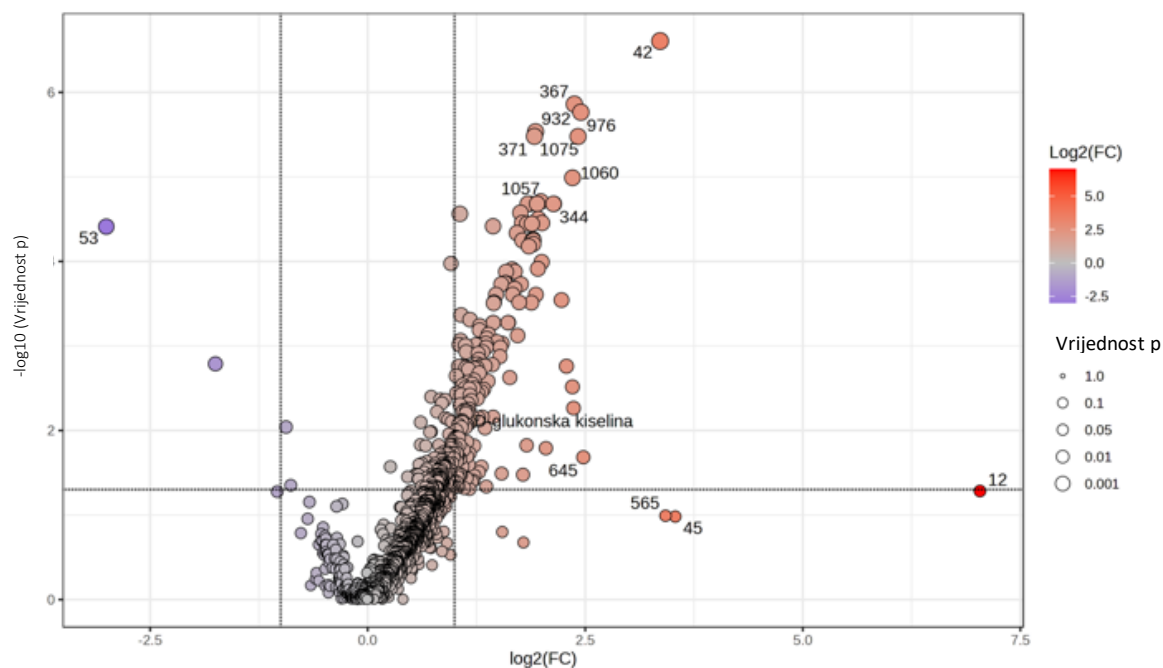
Tablični prikaz metabolita (N=4) identificiranih u mokraći čiji su intenziteti prema *t*-testu značajno ($p \leq 0,05$) promijenjeni u skupini kuja s piometrom (N=19) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja s *outlierom* (N=19).

Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Log ₂ (FC)	Vrijednost p
L-glutamat	148,0604	660,68	2,28	1,33E-04
D-glukonska kiselina	195,0513	648,4	2,37	5,84E-04
L-fenilalanin	164,0719	515,77	1,27	8,47E-04
L-homoserin / L-treonin	118,0513	675,9	0,66	1,38E-02



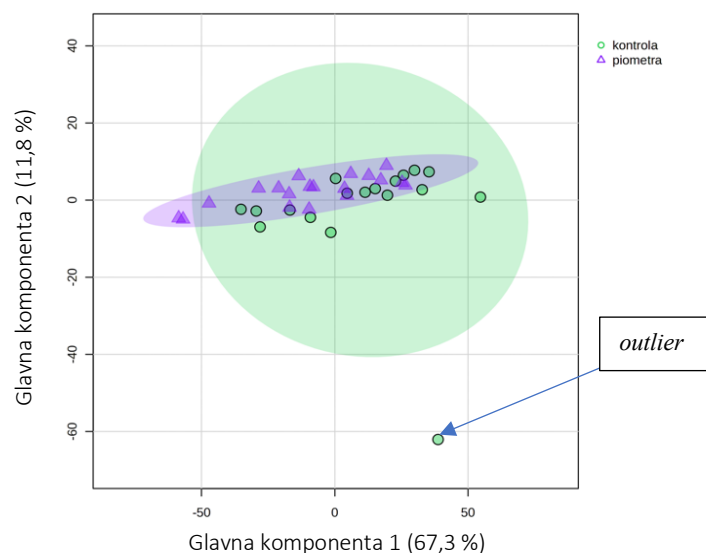
Slika 1.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita (N=4) identificiranih u mokraći čiji su intenziteti prema *t*-testu statistički značajno promijenjeni u kuja s piometrom (ljubičasti pravokutnik) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja s *outlierom* (zeleni pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Crna vodoravna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)



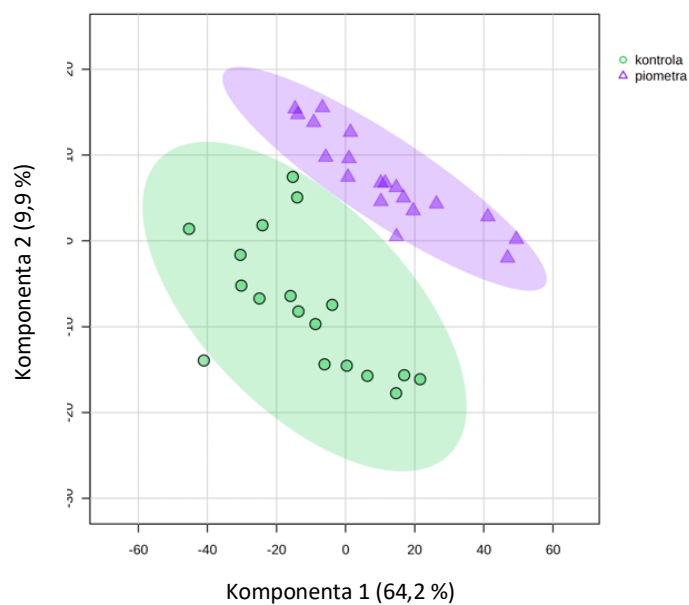
Slika 2.

Grafički prikaz *Volcano* analize intenziteta svih pikova detektiranih u mokraći kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja s *outlierom*. Pik je značajnije promijenjen ($FC \geq 2,0$; $t\text{-test} \leq 0,05$), što je udaljeniji od sjecišta (0,0). Najznačajnije promijenjeni pikovi (N=15) su obilježeni brojem pika iz kromatograma.



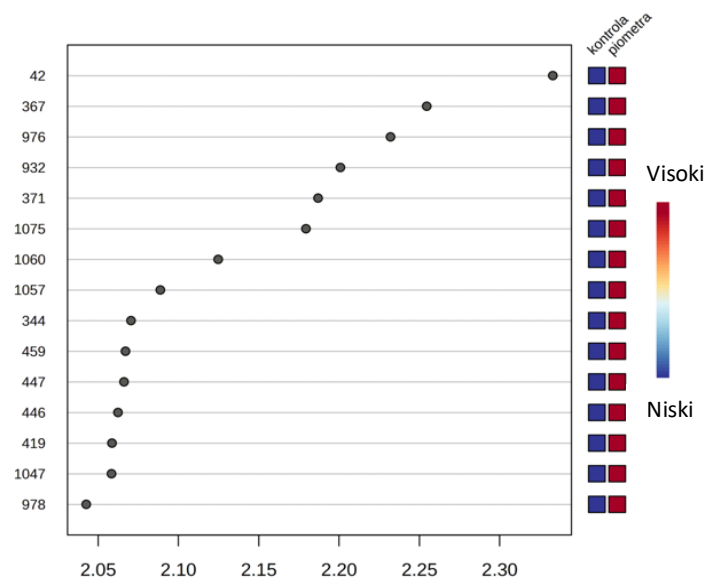
Slika 3.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u mokraći kuja s piometrom (ljubičasti trokutići) i kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni kružići).



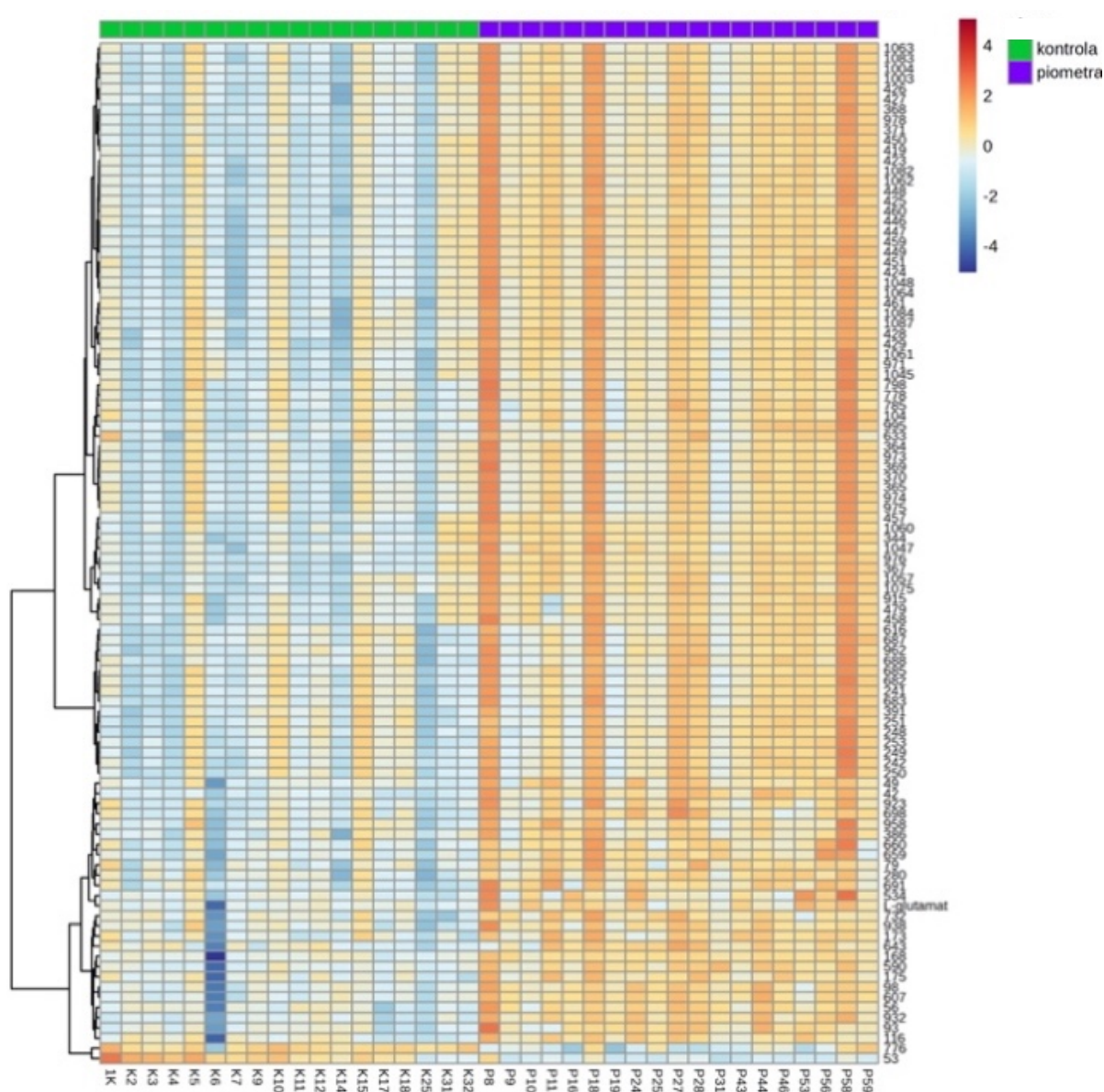
Slika 4.

Grafički prikaz PLS-DA analize intenziteta pikova detektiranih u mokraći skupine kuja s piometrom (ljubičasti trokutići) i kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni kružići).



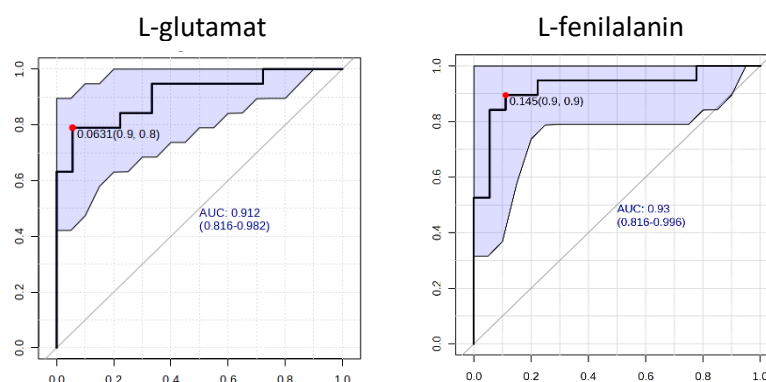
Slika 5.

Grafički prikaz VIP analize mokraće kuja s piometrom i kontrolne skupine kuja. Prikazani su pikovi (N=15) čiji intenziteti najviše doprinose razlikovanju navedenih skupina. (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)



Slika 6.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja statistički najznačajnije promijenjenih pikova (N=100) u mokraći prema rezultatima *t*-testa između kuja s piometrom (ljubičasti panel) i kontrolne skupine kuja (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazani tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)



Slika 7.

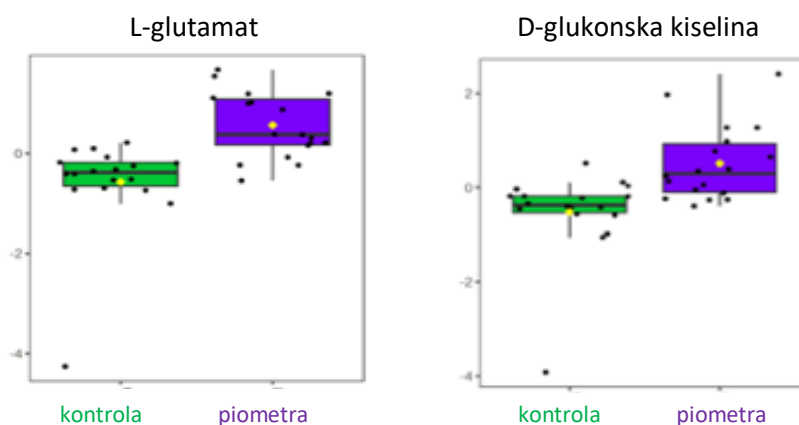
Grafički prikaz ROC krivulja metabolita identificiranih u mokraći čiji su intenziteti statistički značajno promijenjeni u kuja s piometrom u odnosu na kontrolnu skupinu kuja. Prikazani su AUC i 95 % CI. L-Glutamat i L-fenilalanin ostvaruju AUC >0,8. (Os apscisa predstavlja lažno pozitivne vrijednosti, tj. specifičnost, a os ordinata prave pozitivne vrijednosti, tj. osjetljivost.)

b) ISTRAŽIVANJE POČETKA RAZVOJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA U PIOMETRI KUJA

Tablica 2.

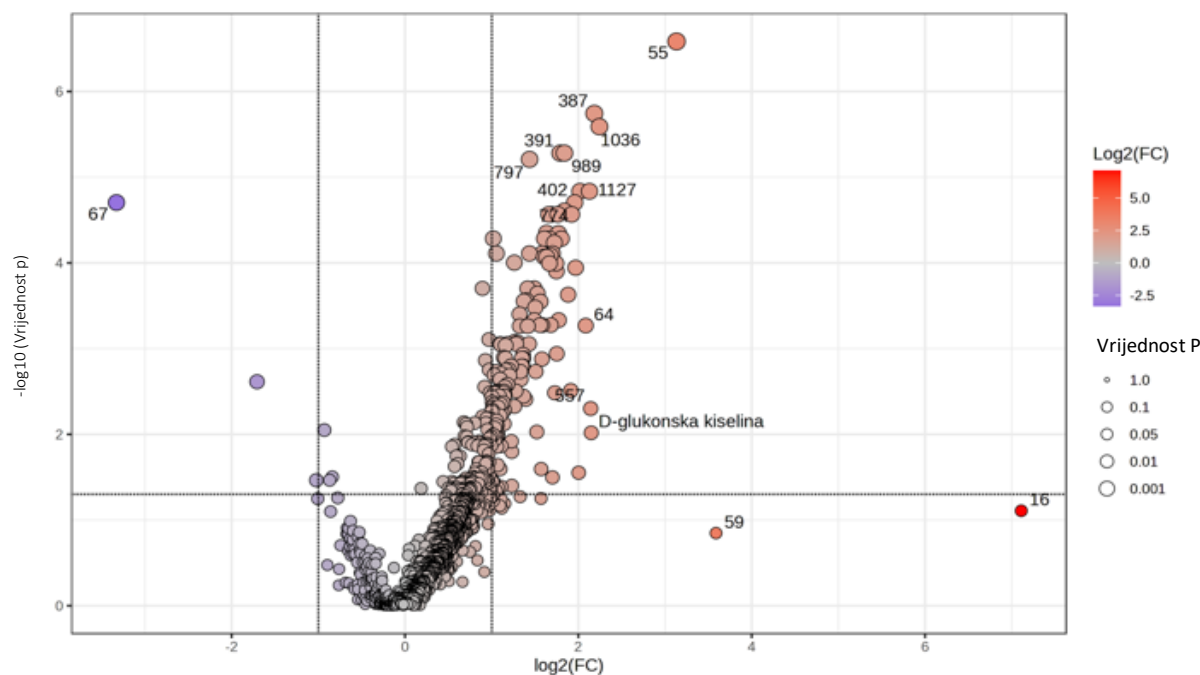
Tablični prikaz metabolita identificiranih u mokraći (N=2) čiji su intenzitei prema *t*-testu statistički značajno promijenjeni u skupini kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a u odnosu na kontrolnu skupinu kuja s *outlierom*.

Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Log ₂ (FC)	Vrijednost p
L-glutamat	148,0604	660,74	1,91	2,41E-04
D-glukonska kiselina	195,0513	648,16	2,15	1,13E-03



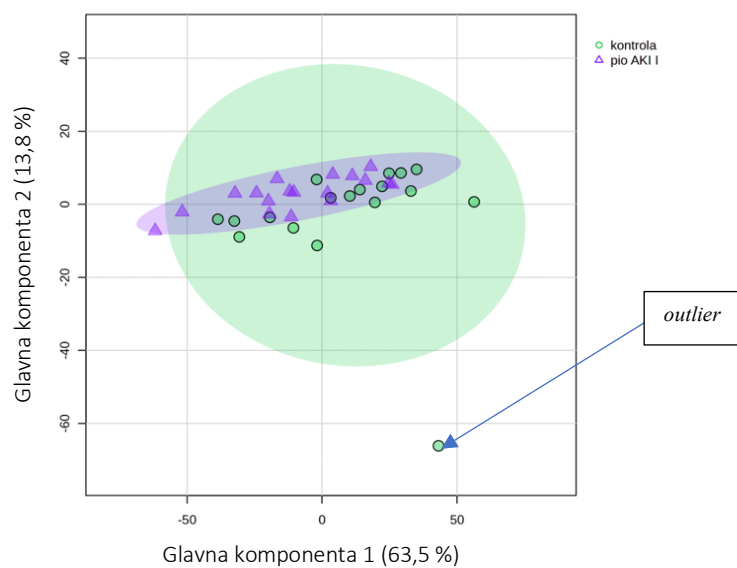
Slika 8.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita identificiranih u mokraći koji su prema *t*-testu statistički značajno promijenjeni u kuja s piometrom na početku I stupnja AKI (ljubičasti pravokutnik) u odnosu na kontrolnu skupinu kuja s *outlierom* (zeleni pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Vodoravna crna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)



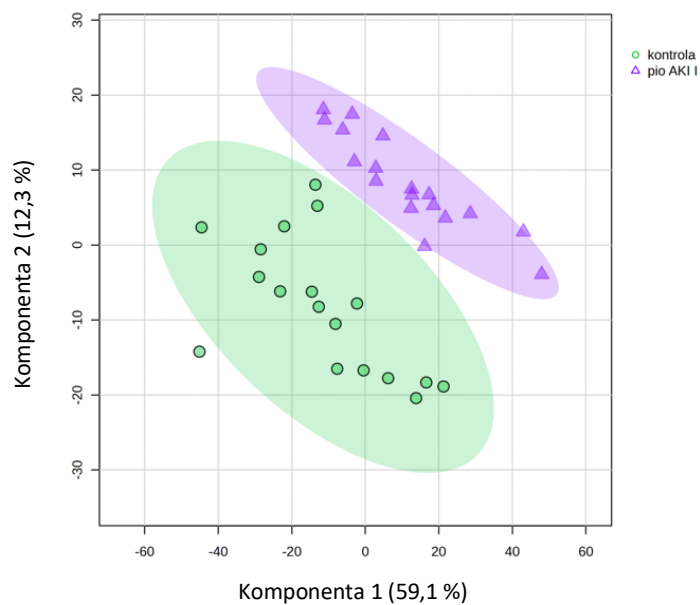
Slika 9.

Grafički prikaz *Volcano* analize intenziteta svih pikova u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI u odnosu na kontrolnu skupinu kuja s *outlierom*. Pik je statistički značajnije promijenjen ($FC \geq 2,0$; $t\text{-test} \leq 0,05$), što je udaljeniji od 0,0. Statistički najznačajnije promijenjeni pikovi su obilježeni brojem pika iz kromatograma.



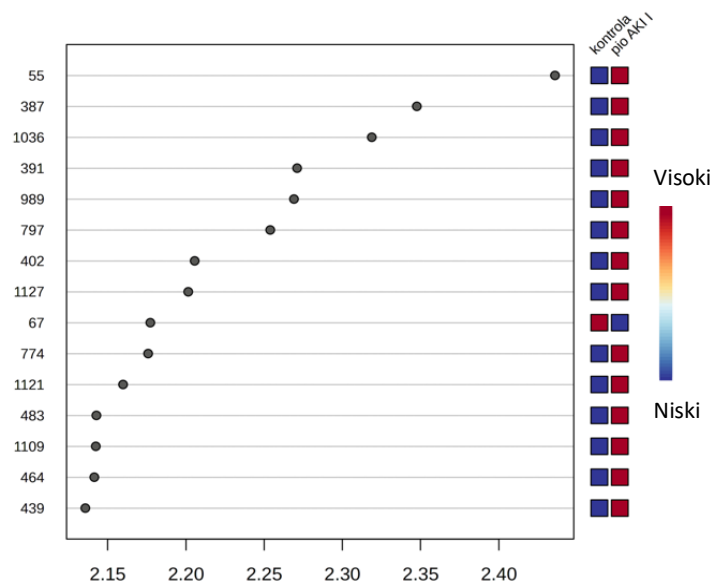
Slika 10.

Grafički prikaz PCA analize intenziteta pikova u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (ljubičasti trokutići) i kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni kružići).



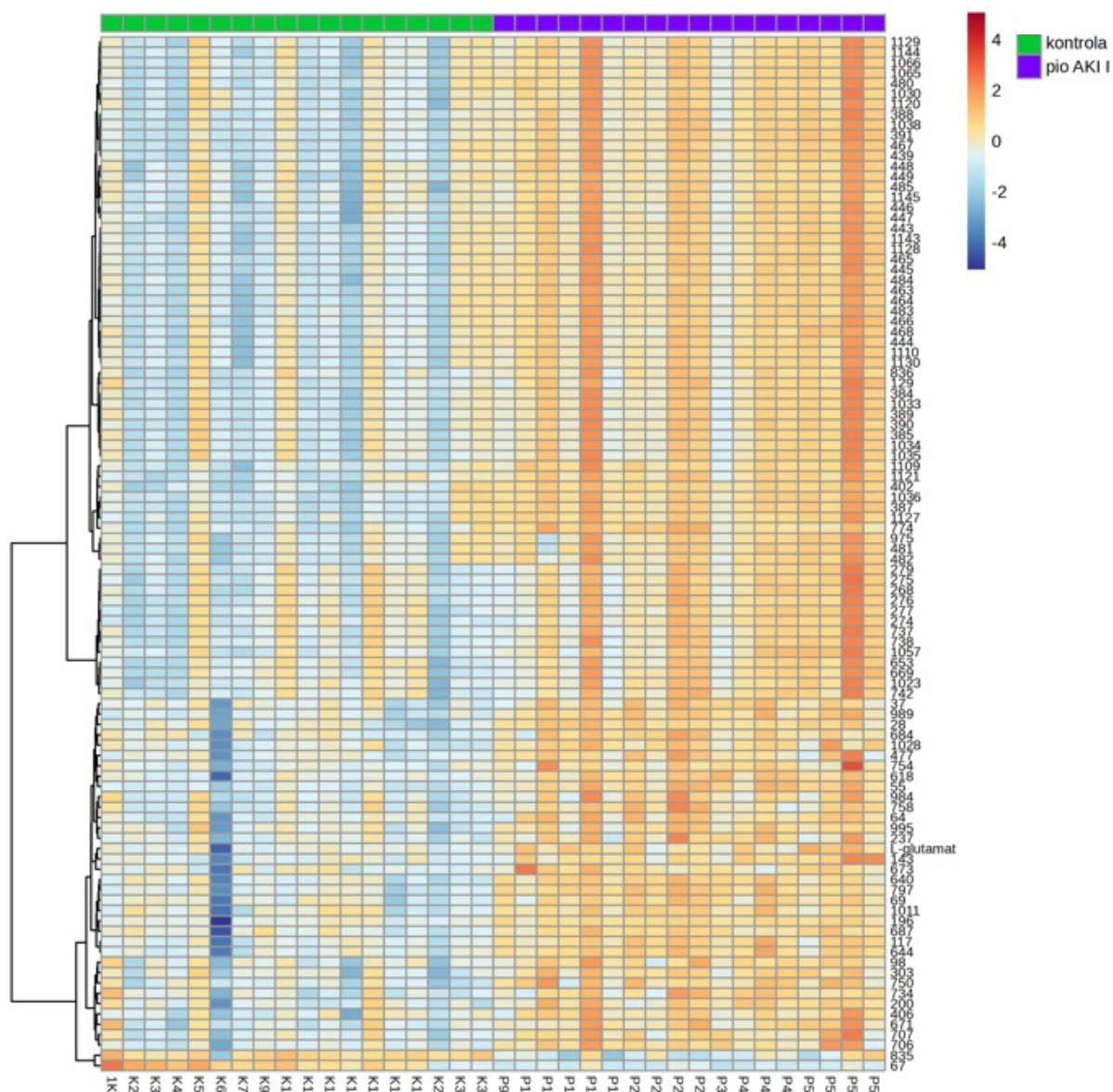
Slika 11.

Grafički prikaz PLS-DA analize mokraće kuja s piometrom na početku I stupnja AKI (ljubičasti trokutići) i kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni kružići).



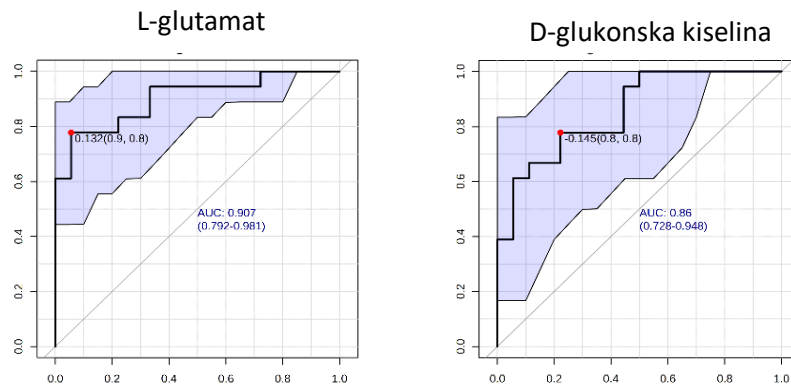
Slika 12.

Grafički prikaz VIP analize mokraće kuja s piometrom na početku I stupnja AKI i kontrolne skupine kuja s *outlierom*. Prikazani su statistički najznačajniji pikovi (N=15) koji najviše doprinose razlikovanju navedenih skupina. (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)



Slika 13.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja statistički najznačajnije promijenjenih pikova u mokraći (N=100) prema rezultatima t -testa između kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a (ljubičasti panel) i kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazani tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.)



Slika 14.

Prikazani su statistički značajno promijenjeni ($p < 0,05$) metaboliti u mokraći kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a koji ostvaruju $AUC > 0,8$; L-glutamat, D-glukonska kiselina.

c) ISTRAŽIVANJE POVEZANOSTI PROTEINURIJE I POČETKA RAZVOJA AKUTNE OZLJEDE BUBREGA U PIOMETRI KUJA

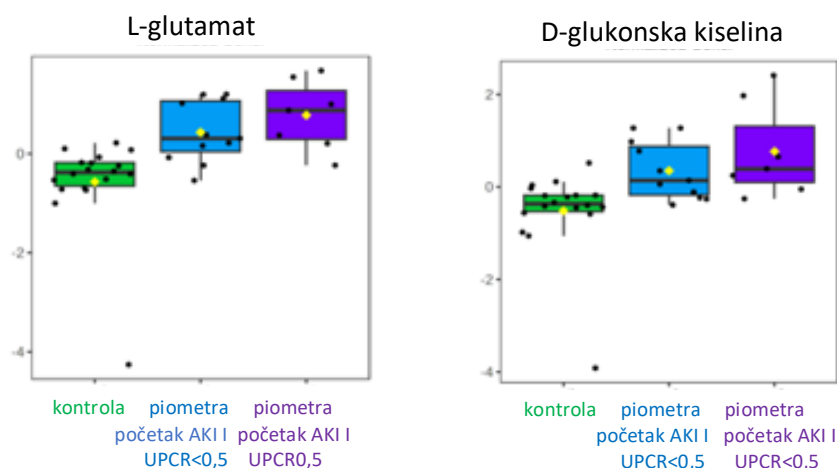
Tablica 3.

Tablični prikaz metabolita identificiranih ($N=2$) u mokraći koji su prema rezultatima ANOVA i *post-hoc* analize značajno promijenjeni ($p < 0,05$) između kontrolne skupine kuja s *outlierom*, kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI-a i $UPCR < 0,5$ i kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI-a i $UPCR > 0,5$.

Metabolit	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Vrijednost p	Fischerov LSD
L-glutamat	148,0604	660,74	9,10E-04	a, b
D-glukonska kiselina	195,0513	648,16	3,31E-03	a, b

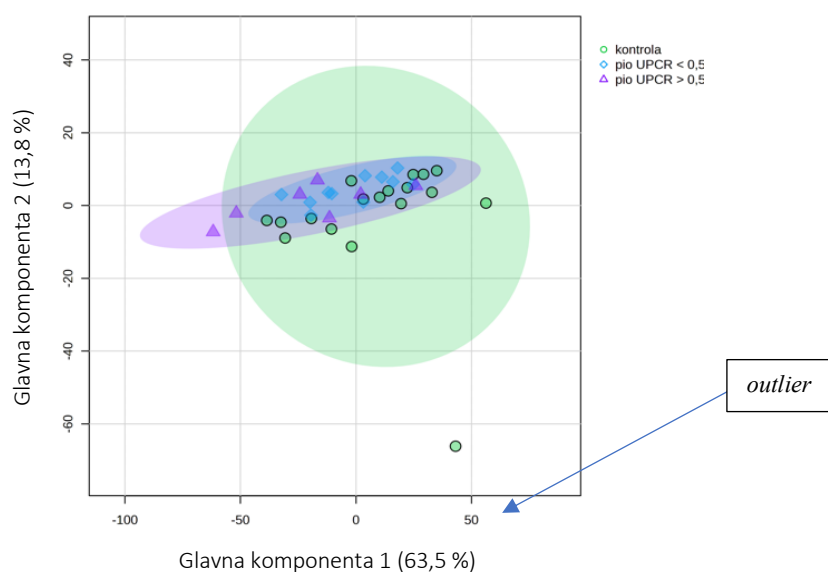
(LSD, *Fisher's Least Significant Difference Method* – Fischerova metoda najmanje značajne razlike)

a - pio $UPCR < 0,5$ – kontrola; b - pio $UPCR > 0,5$ – kontrola



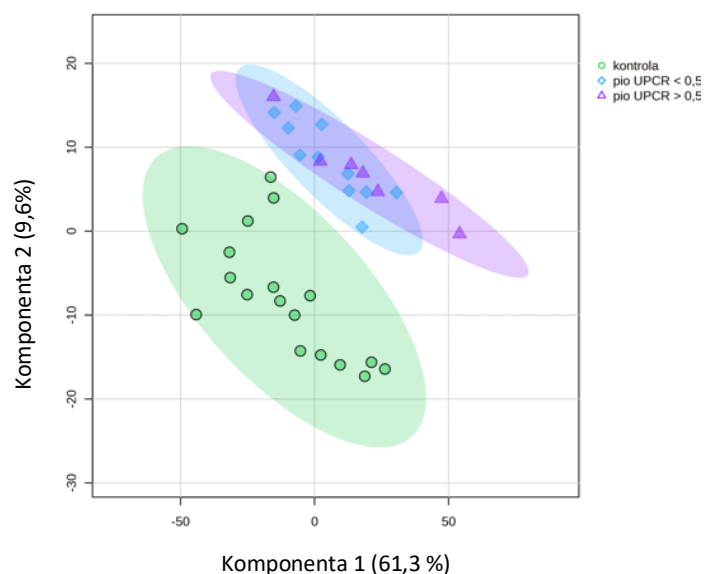
Slika 15.

Grafički *box and whisker* prikaz metabolita identificiranih u mokraći čiji su intenziteti prema ANOVA i *post-hoc* analizi statistički značajno promijenjeni između kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni pravokutnik), kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR <0,5 (plavi pravokutnik) i kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR >0,5 (ljubičasti pravokutnik). Prikazani su relativni intenziteti podataka nakon normalizacije. (Duljina pravokutnika je proporcionalna standardnoj devijaciji. Crna vodoravna linija predstavlja medijan, a žuta točka aritmetičku sredinu.)



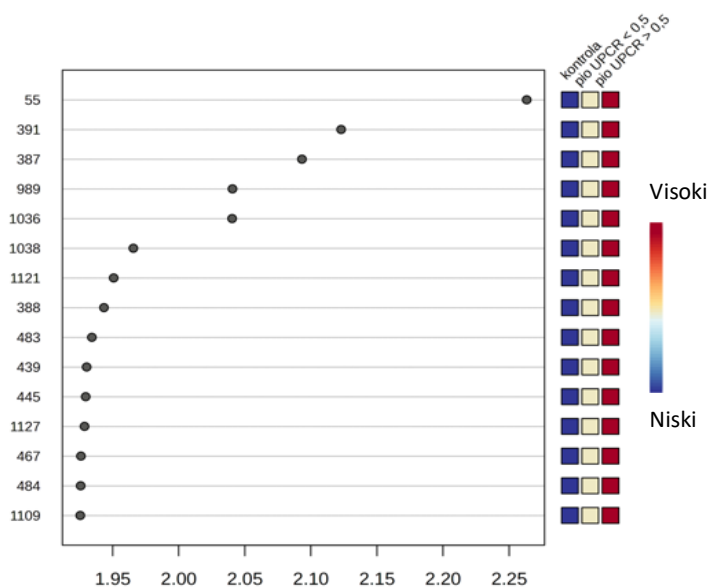
Slika 16.

Grafički prikaz PCA analize mokraće kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni kružići), kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR <0,5 (plavi rombići) i kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR >0,5 (ljubičasti trokutići).



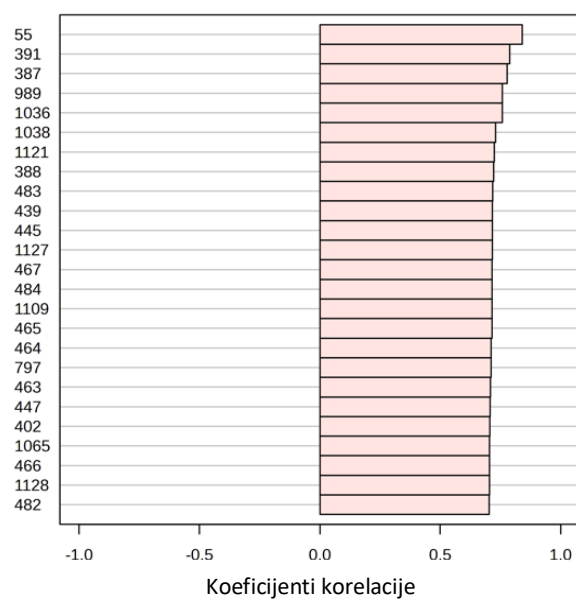
Slika 17.

Grafički prikaz PLS-DA analize mokraća kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni kružići), kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR <0,5 (plavi rombići) i kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR >0,5 (ljubičasti trokutići).



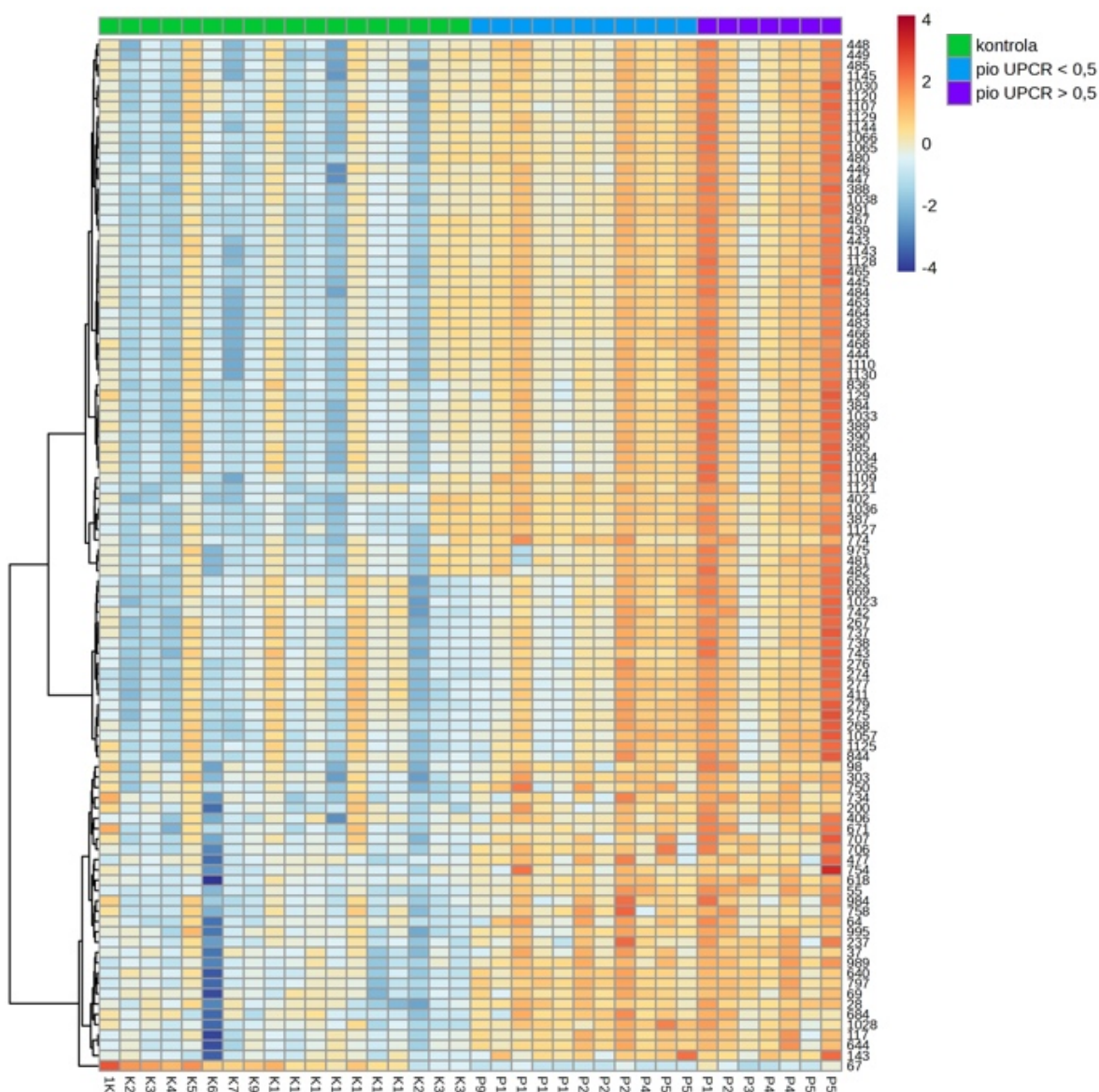
Slika 18.

Grafički prikaz VIP analize intenziteta pikova detektiranih u mokraći kontrolne skupine kuja s *outlierom*, kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR <0,5 i kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR >0,5. Prikazani su pikovi (N=15) koji najviše doprinose razlikovanju navedenih skupina. (Relativni intenziteti su naznačeni bojom kvadratića u priloženom kazalu.)



Slika 19.

Grafički prikaz analize korelacije intenziteta (mz/rt) pikova (N=25) u mokraći s vrijednostima UPCR-a kontrolne skupine kuja s *outlierom*, kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR <0,5 i kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR >0,5.



Slika 20.

Grafički prikaz analize hijerarhijskog grupiranja najznačajnije promijenjenih pikova u mokraći (N=100) prema ANOVA i *post hoc* analizi između kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR >0,5 (ljubičasti panel), kuja s piometrom, početkom I stupnja AKI i UPCR <0,5 (plavi panel) i kontrolne skupine kuja s *outlierom* (zeleni panel). (Prema priloženom kazalu su povišeni intenziteti prikazani tonovima crvene i žute boje, a sniženi intenziteti tonovima plave boje.

12. DODATAK

Tablica I. Karakteristike kuja iz kontrolne skupine.

	Pasmina	Životna dob (godine)	Tjelesna masa (kg)
K1	mješanac	1,0	13,0
K2	argentinski pas	1,0	30,4
K3	maltezer	2,5	5,7
K4	križanac	3,5	6,1
K5	shiba inu	0,5	7,2
K6	križanac	2,5	13,6
K7	lagotto romagnolo	1,5	13,0
K9	križanac	0,5	16,6
K10	lagotto romagnolo	0,5	16,0
K11	lagotto romagnolo	0,5	11,9
K12	mađarska vižla	1,5	19,7
K14	križanac	1,5	10,0
K15	labrador retriever	1,0	24,0
K17	tornjak	1,0	35,0
K18	shi-tzu	1,0	7,2
K25	mješanac	1,0	10,0
K31	mješanac	1,0	7,0
K32	mješanac	1,5	6,0
Aritmetička sredina		1,0	14,0
Medijan		1,0	28,0
Najniža vrijednost		0,5	5,7
Najviša vrijednost		3,5	35,0
Standardna devijacija		0,5	8,5

Tablica II. Vrijednosti pokazatelja kompletne krvne slike izmjerene u punoj krvi kontrolne skupine kuja.

	ERITROCITI X 10 ⁹ /L	HEMOGLOBIN g/L	HEMATOKRIT %	MCV fl.	MCH pg	MCHC g/L	RDW %	TROMBOCITI X 10 ⁹ /L	MPV fl.	LEUKOCITI X 10 ⁹ /L	SEGMENTIRANI NEUTROFILI % (apsolutni broj)	LIMFOCITI % (apsolutni broj)	MONOCITI % (apsolutni broj)	EOZINOFILI % (apsolutni broj)	NESEGMENTIRANI NEUTROFILI % (apsolutni broj)	BAZOFILI % (apsolutni broj)
Referentni raspon	5,5–8,5	120–180	37–55	60–77	19–23	320–360	/	200–500	7–11	6,0–17,0	60–77 (3,80– 11,50)	12–33 (1,00–4,80)	3–10 (0,15–1,35)	2–10 (0,10–1,25)	0–1 (0–0,30)	0–1 (0–0,30)
K1	7,0	173	50	72	25	344	15	259	9	7,7	57 (4,39)	38 (2,93)	2 (0,15)	3 (0,23)	0 (0)	0 (0)
K2	7,5	171	50	67	23	341	14	304	10	9,9	75 (7,43)	15 (1,49)	6 (0,59)	4 (0,40)	0 (0)	0 (0)
K3	5,5	140	40	72	25	351	16	182	10	7,9	55 (4,35)	22 (1,74)	4 (0,32)	9 (0,71)	0 (0)	0 (0)
K4	6,5	137	40	62	21	341	16	311	9	6,5	76 (4,94)	18 (1,17)	2 (0,13)	3 (0,20)	1 (0,07)	0 (0)
K5	6,7	143	42	62	21	344	16	261	10	8,0	63 (5,04)	30 (2,40)	2 (0,16)	5 (0,40)	0 (0)	0 (0)
K6	7,5	179	52	69	24	345	15	188	8	5,5	71 (3,91)	18 (0,99)	5 (0,28)	6 (0,33)	0 (0)	0 (0)
K7	7,1	174	51	72	25	341	15	361	9	8,7	54 (4,70)	36 (3,13)	6 (0,52)	4 (0,35)	0 (0)	0 (0)
K9	6,6	158	45	68	24	352	14	258	8	6,1	59 (3,60)	32 (1,95)	3 (0,18)	6 (0,37)	0 (0)	0 (0)
K10	5,4	127	37	70	24	340	16	270	10	7,3	78 (5,69)	18 (1,31)	1 (0,07)	3 (0,22)	0 (0)	0 (0)
K11	5,4	139	40	75	26	347	15	282	9	6,8	75 (5,10)	16 (1,09)	3 (0,20)	1 (0,07)	0 (0)	0 (0)
K12	7,8	186	54	69	24	344	15	251	9	8,1	61 (4,94)	30 (2,43)	3 (0,24)	6 (0,49)	0 (0)	0 (0)
K14	6,5	150	44	67	23	342	15	280	11	7,9	66 (5,21)	32 (2,53)	1 (0,08)	0 (0)	0 (0)	1 (0,08)
K15	6,6	155	46	69	24	340	16	210	8	5,4	51 (2,75)	39 (2,10)	4 (0,22)	6 (0,32)	0 (0)	0 (0)
K17	6,8	168	48	71	25	347	15	307	8	7,9	66 (5,21)	21 (1,66)	2 (0,16)	11 (0,87)	0 (0)	0 (0)
K18	5,3	130	37	69	25	354	15	373	9	5,5	57 (3,14)	38 (2,09)	4 (0,22)	0 (0)	1 (0,06)	0 (0)
K25	6,3	152	44	69	24	349	16	422	9	10,6	59 (6,25)	24 (2,54)	3 (0,32)	12 (1,27)	1 (0,11)	1 (0,11)
K31	7,5	169	49	66	23	341	17	262	10	9,9	51 (5,05)	33 (3,27)	4 (0,40)	12 (1,19)	0 (0)	0 (0)
K32	6,9	146	43	63	21	340	17	124	12	7,4	62 (4,59)	22 (1,63)	9 (0,67)	7 (0,52)	0 (0)	0 (0)
Najmanja vrijednost	5,3	127	37	62	21	340	14	124	8	5,4	51 (2,8)	15 (1,0)	1 (0,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Najviša vrijednost	7,8	186	54	75	26	354	17	422	12	10,6	78 (7,4)	39 (3,3)	9 (0,7)	12 (1,3)	1 (0,1)	1 (0,1)
Aritmetička sredina	6,6	155	45	68	24	345	15	273	9	7,6	63 (4,8)	27 (2,0)	4 (0,3)	5 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
Medijan	6,7	154	45	69	24	344	15	266	9	7,8	62(4,9)	27 (2,0)	3 (0,2)	6 (0,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Standardna devijacija	0,8	14	5	4	2	5	1	71	1	1,5	9 (1,1)	8 (0,7)	2 (0,2)	4 (0,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Kolmogorov- Smirnov test	0,17	0,15	0,11	0,17	0,24	0,18	0,25	0,16	0,23	0,15	0,13 (0,18)	0,16 (0,10)	0,19 (0,19)	0,16 (0,21)	0,50 (0,49)	0,54 (0,54)

(Vrijednosti Kolmogorov-Smirnov testa za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu su u *kurzivu*. Vrijednosti pokazatelja koje su izvan referentnog raspona su u *kurzivu*.)

Tablica III. Vrijednosti biokemijskih pokazatelj izmjerene u serumu kontrolne skupine kuja.

	Ureja	Kreatinin	Proteini uk.	Albumin	Bilirubin uk.	Glukoza	AST	ALT	γ GT	ALP	CK	DGGR lipaza	cCRP	Kalcij uk.	Fosfat anorg.	Trigliceridi	Kolesterol uk.	Natrij	Kalij	Klorid	LDH	Magnezij uk.	Željezo
Referentni raspon	3,3-8,3 mmol/L	44-140 μ mol/L	55-75 g/L	26-33 g/L	-8,6 μ mol/L	3,6-6,5 mmol/L	-82 U/L	-88 U/L	-6 U/L	20-156 U/L	-160 U/L	-120 U/L	-10,7 mg/L	2,1-3,1 mmol/L	0,7-2,1 mmol/L	0,2-1,3 g/L	3,5-7,1 g/L	140-155 mmol/L	3,6-5,8 mmol/L	90-110 mmol/L	45-233 U/L	0,8-1,1 mmol/L	μ mol/L
K1	5,5	69	64	32	1,1	6,1	24	53	5	33	98	43	1,6	2,6	1,5	0,4	6,9	146	5,0	116	54	0,8	26,4
K2	3,9	75	68	32	1,7	4,9	31	36	4	57	109	40	1,0	2,6	1,8	0,4	4,7	149	4,2	119	108	0,8	22,6
K3	7,0	72	68	25	1,7	4,9	24	30	6	10	65	26	3,4	2,1	1,3	0,4	4,0	147	3,5	124	57	0,7	50,7
K4	8,0	77	63	33	1,7	6,7	25	41	8	20	100	21	1,0	2,5	1,0	0,3	3,9	145	4,0	113	61	0,7	33,8
K5	5,0	95	54	29	2,0	5,2	33	58	5	53	143	29	1,0	2,0	1,7	0,5	4,2	146	4,2	121	24	0,7	29,6
K6	6,8	87	66	34	2,6	6,1	23	33	5	16	62	43	1,7	2,5	1,0	0,6	6,0	145	4,7	116	63	0,8	32,7
K7	4,9	70	62	32	2,1	9,4	24	40	8	18	112	24	1,0	2,5	1,3	0,5	6,9	148	4,7	116	140	0,9	30,8
K9	6,4	105	56	30	1,8	4,8	30	47	4	32	170	91	1,0	2,5	1,3	0,4	4,5	145	4,3	114	105	0,7	40,3
K10	4,7	53	50	26	1,1	7,0	18	30	5	15	107	36	2,5	2,3	1,6	0,6	3,7	149	3,9	120	59	0,7	23,7
K11	6,1	65	53	29	1,3	7,9	20	28	4	45	92	34	1,0	2,5	1,4	0,7	5,8	146	4,4	116	72	0,7	32,2
K12	5,4	90	54	28	1,9	7,6	30	21	4	23	77	25	1,0	2,4	1,6	0,3	4,2	146	4,9	115	46	0,8	24,5
K14	8,0	44	66	37	1,9	7,3	21	30	5	68	137	26	1,6	2,8	2,3	0,6	8,0	148	4,5	115	62	0,8	31,9
K15	4,8	86	59	32	2,9	6,6	58	48	6	48	137	125	1,0	2,4	1,7	0,5	8,1	146	4,8	117	24	0,7	45,7
K17	6,0	88	65	30	1,3	6,3	28	33	2	35	153	23	1,0	2,6	1,6	0,5	5,1	148	4,5	118	46	0,8	25,9
K18	7,5	55	53	26	2,0	4,6	19	16	4	44	115	60	3,2	2,4	2,1	1,3	7,3	144	3,7	114	83	0,7	28,8
K25	8,7	69	62	27	2,1	9,6	32	43	6	30	101	80	4,3	2,3	1,7	0,4	3,3	143	4,3	118	76	0,7	21,8
K31	3,5	60	55	31	1,9	5,0	39	52	4	35	144	36	1,0	2,6	2,0	0,5	4,2	145	4,9	113	231	0,8	31,7
K32	6,9	109	59	26	1,3	8,5	41	25	5	42	233	59	2,4	2,5	1,5	0,7	7,4	144	4,7	110	143	1,0	13,9
Najmanja vrijednost	3,5	44	50	25	1,1	4,6	18	16	2	10	62	21	1,0	2,0	1,0	0,3	3,3	143	3,5	110	24	0,6	13,9
Najviša vrijednost	8,7	109	68	31	2,9	9,6	58	58	8	68	233	125	4,3	2,8	2,3	1,3	8,1	149	5,0	124	231	1,0	50,7
Aritmetička sredina	6,1	76	60	29,9	1,8	6,6	29	37	5	35	120	46	1,7	2,5	1,6	0,5	5,5	146	4,4	116	81	0,8	30,4
Medijan	6,1	74	61	30,0	1,9	6,5	27	35	5	34	111	36	1,0	2,5	1,6	0,5	4,9	146	4,5	116	63	0,8	30,2
Standardna devijacija	1,5	18	6	3,2	0,5	1,6	10	12	2	16	41	28	1,0	0,2	0,3	0,2	1,6	2	0,4	3	50	0,1	8,7
Kolmogorov-Smirnov test	0,10	0,10	0,15	0,13	0,15	0,14	0,17	0,13	0,22	0,10	0,16	0,26	0,31	0,22	0,14	0,23	0,18	0,19	0,15	0,16	0,20	0,25	0,18

(Vrijednosti Kolmogorov-Smirnov testa za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu su u *kurzivu*. Vrijednosti pokazatelja koje su izvan referentnog raspona su u *kurzivu*.)

Tablica IV. Biokemijski i fizikalni pokazatelji izmjereni u mokraći kontrolne skupine kuja.

	Proteini ukupni	Kreatinin	UPCR	Glukoza	Ureja	Natrij	Osmolalnost	USG
	mg/L	mmol/L	/	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mOsmol/kg	/
K1	0,054	7,61	0,06	0,185	415,2	34,1	0,700	1,018
K2	0,274	38,74	0,06	0,886	1298,8	34,6	1,904	1,049
K3	0,221	23,20	0,08	0,422	919,7	103,1	1,361	1,035
K4	0,175	35,63	0,04	0,727	1371,5	301,5	2,217	1,052
K5	0,084	9,70	0,08	0,143	259,1	62,7	0,484	1,013
K6	0,152	27,57	0,05	0,536	795,5	206,4	1,514	1,037
K7	0,178	31,90	0,05	0,883	957,3	70,2	1,703	1,045
K9	0,140	27,49	0,05	0,419	895,0	50,3	1,270	1,034
K10	0,039	5,32	0,06	0,110	242,8	105,0	0,561	1,014
K11	0,188	26,78	0,06	0,516	1055,4	92,5	1,638	1,042
K12	0,231	28,64	0,07	0,675	804,5	30,2	1,187	1,033
K14	0,918	39,83	0,20	1,367	1489,1	105,0	2,419	1,064
K15	0,101	9,75	0,09	0,114	255,3	117,0	0,595	1,015
K17	0,045	6,00	0,06	0,169	361,4	311,2	1,078	1,022
K18	0,070	7,73	0,08	0,260	598,6	72,7	0,969	1,024
K25	0,154	23,15	0,06	0,688	1598,1	193,7	2,455	1,056
K31	0,167	20,23	0,07	0,555	797,2	241,1	1,463	1,036
K32	0,149	18,29	0,07	0,354	581,3	201,2	1,357	1,034
Najniža vrijednost	0,039	5,32	0,04	0,110	242,8	30,2	0,484	1,013
Najviša vrijednost	0,918	39,83	0,20	1,367	1598,1	311,2	2,455	1,064
Aritmetička sredina	0,186	21,53	0,07	0,501	816,4	129,6	1,382	1,035
Medijan	0,153	23,18	0,06	0,469	800,9	104,1	1,359	1,034
Standardna devijacija	0,195	11,56	0,04	0,334	428,7	90,5	0,607	0,015
Kolmogorov- Smirnov test	0,30	0,18	0,29	0,12	0,10	0,22	0,09	0,12

(Vrijednosti Kolmogorov-Smirnov testa za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu su u *kurzivu*.)

Tablica V. Vrijednosti pokazatelja rutinske analize mokraće (test-traka, sediment) izmjerene u kontrolnoj skupini kuja.

	boja	izgled	glukoza	bilirubin	ketoni	hemoglobin	pH	proteini	urobilinogen	nitriti	Leukocitna esteraza	leukociti	eritrociti	Pločasti epitel	Male epitelne stanice	Hijalini cilindri	Nehijalini cilindri	bakterije	kristali	sol	sluz	lipidi
K1	žuta	bistar	neg	neg	neg	neg	7,0	neg	norm	neg	neg	rijetki			rijetke							
K2	Int. žuta	Vrlo blago zamućen	neg	Blago povišen	neg	neg	6,0	0,3	norm	neg	neg	pokoji			0-1			rijetke				1+
K3	Int. žuta	mutan	neg	povišen	neg	trag	7,0	0,3	norm	neg	neg	1-3	2-4		0-2			nešto				2+
K4	Int. žuta	Vrlo blago zamućen	neg	Blago povišen	neg	neg	7,0	0,3	norm	neg	neg	pokoji			pokoja			nešto		1+	1+	nešto
K5	žuta	bistar	neg	neg	neg	neg	8,5	neg	norm	neg	neg	0-1										nešto
K6	žuta	mutan	neg	Blago povišen	neg	neg	7,5	1,0	norm	neg	neg	0-1							Struvit 1+			2+
K7	Int. žuta	zamućen	neg	Blago povišen	neg	neg	6,0	0,3	norm	neg	neg	pokoji	0-1		pokoja							2+
K9	žuta	Vrlo blago zamućen	neg	neg	neg	trag	7,0	0,3	norm	neg	neg	0-1	2-4		Pokoja prijelazna							1+
K10	žuta	Blago zamućen	neg	neg	neg	neg	7,0	neg	norm	neg	neg	pokoji			pokoja			rijetke		1+		1+
K11	žuta	mutan	neg	Blago povišen	neg	neg	8,5	1,0	norm	neg	neg	0-2						1+				2+
K12	Int. žuta	mutan	neg	povišen	neg	neg	7,0	1,0	norm	neg	neg	1-2	1-2		0-1			nešto	Struvit 2+			3+
K14	Int. žuta	Vrlo blago zamućen	neg	neg	neg	neg	6,0	1,0	norm	neg	neg	pokoji			Pokoja prijelazna							1+
K15	žuta	bistar	neg	neg	neg	neg	7,5	neg	norm	neg	neg	pokoji			Pokoja prijelazna							nešto
K17	žuta	bistar	neg	neg	neg	neg	6,0	neg	norm	neg	neg	pokoji			Pokoja prijelazna							nešto
K18	žuta	bistar	neg	neg	neg	neg	5,5	neg	norm	neg	neg	pokoji										nešto
K25	žuta	bistar	neg	neg	neg	neg	6,5	trag	norm	neg	neg	0-1	pokoji		Pokoja prijelazna			rijetke				
K31	žuta	Vrlo blago Zamućen	neg	neg	neg	trag	7,0	trag	norm	neg	neg	0-1	2-4		0-2 prijelazne			rijetke				
K32	žuta	Vrlo blago zamućen	neg	neg	neg	neg	8,5	1,0	norm	neg	neg	pokoji	rijetki		Pokoja prijelazna			rijetke	Pokoji struvit	nešto		nešto

Tablica VI. Karakteristike kuja iz skupine oboljelih od piometre.

	Pasma	Životna dob (godine)	Tjelesna masa (kg)	Temperatura (°C)	Srčani otkucaji / min	Frekvencija disanja / min	Piometra
P8	mješanac	6,5	17,5	36,4	132	48	otvorena
P9	maltezer	13,5	4,5	38,5	124	20	otvorena
P10	njemački ovčar	8,5	34,7	38,9	100	32	otvorena
P11	američki staford	5,5	21,7	39,1	100	/	otvorena
P16	francuski buldog	3,5	9,7	38,5	/	/	otvorena
P18	bobtail	9,5	43,2	39,4	100	/	otvorena
P19	američki buldog	10,5	38,0	39,2	128	32	otvorena
P24	maltezer	8,5	5,4	38,5	132	28	otvorena
P25	zlatni retriver	10,5	26,6	38,7	120	24	otvorena
P27	križanac	5,5	16,1	38,3	120	/	otvorena
P28	zlatni retriver	10,5	27,8	39,1	/	/	otvorena
P31	križanac	8,5	24,5	39,4	124	22	otvorena
P43	krvosljednik	7,0	20,0	/	/	/	zatvorena
P44	američki staford	11,0	26,2	37,5	80	/	otvorena
P46	irski seter	9,0	26,4	38,2	112	/	zatvorena
P53	mješanac	9,0	27,1	38,9	116	/	otvorena
P56	francuski buldog	10,0	10,3	40,0	112	24	otvorena
P58	njemačka doga	6,0	58,0	40,7	160	16	otvorena
P59	šarplaninac	7,5	53,0	39,0	/	/	otvorena
Najniža vrijednost		3,5	4,5				
Najviša vrijednost		13,5	58,0				
Aritmetička sredina		8,7	25,8				
Medijan		9,0	26,2				
Standardna devijacija		4,3	14,7				

Tablica VII. Mikrobiološki nalazi mokraće i obrisaka maternice te patohistološki nalazi maternice skupine kuja oboljelih od piometre.

	Urinokultura	Obrisak maternice	Patohistološka dijagnoza maternice
P8	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	/
P9	negativna	<i>Pasteurella species</i>	/
P10	negativna	β -hemolitični <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia coli</i>	/
P11	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	/
P16	negativna	<i>Escherichia coli</i>	/
P18	negativna	<i>Escherichia coli</i>	+
P19	<i>Escherichia coli</i>	β -hemolitični <i>Streptococcus species</i>	+
P24	hemolitična <i>Escherichia coli</i>	hemolitična <i>Escherichia coli</i>	+
P25	negativna	<i>Escherichia coli</i>	cistična hiperplazija endometrija, gnojna upala
P27	negativna	<i>Escherichia coli</i>	+
P28	negativna	hemolitična <i>Escherichia coli</i>	+
P31	negativna	<i>Escherichia coli</i>	cistična hiperplazija endometrija, jaki difuzni kronični gnojni endometritis - piometra
P43	<i>Enterococcus species</i>	<i>Escherichia coli</i>	kronični gnojni difuzni endometritis – piometra, cistična hiperplazija endometrija jačeg stupnja
P44	negativna	<i>Klebsiella species</i>	kronični gnojni difuzni endometritis težeg stupnja - piometra
P46	negativna	<i>Pseudomonas species</i>	kronični gnojni difuzni endometritis – piometra, cistična hiperplazija slabijeg stupnja
P53	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	gnojni difuzni endometritis težeg stupnja - piometra
P56	negativna	<i>Staphylococcus species</i>	gnojni difuzni endometritis težeg stupnja - piometra
P58	negativna	<i>Escherichia coli</i>	gnojni difuzni endometritis težeg stupnja - piometra
P59	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	gnojni difuzni endometritis težeg stupnja - piometra

Tablica VIII. Vrijednosti pokazatelja kompletne krvne slike izmjerene u punoj krvi skupine kuja oboljelih od piometre.

	ERITROCITI X 10 ¹² /L	HEMOGLOBIN g/L	HEMATOKRIT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/L	RDW %	TROMBOCITI X 10 ⁹ /L	MPV fL	LEUKOCITI X 10 ⁹ /L	SEGMENTIRANI NEUTROFILI % (apsolutni broj)	LIMFOCITI % (apsolutni broj)	MONOCITI % (apsolutni broj)	EOZINOFILI % (apsolutni broj)	NESEGMENTIRANI NEUTROFILI % (apsolutni broj)	BAZOFILI % (apsolutni broj)
Referentni raspon	5,5–8,5	120–180	37–55	60–77	19–23	320–360	/	170–500	7–11	6–17	60–77 (3,00– 11,50)	12–33 (1,00– 4,80)	3–10 (0,15– 1,35)	2–10 (0,10– 1,25)	0–1 (0–0,30)	0–1 (0–0,30)
P8	2,6	62	17	65	24	364	17	191	12	60,5	40 (24,2)	4 (2,42)	17 (10,3)	0 (0)	39 (23,6)	0 (0)
P9	5,0	115	33	66	23	350	16	698	10	6,2	62 (3,84)	29 (1,8)	7 (0,4)	1 (0,1)	1 (0,1)	0 (0)
P10	4,4	106	30	67	24	361	17	356	11	22,6	64 (14,46)	9 (2,0)	7 (1,6)	11 (2,5)	9 (2,0)	0 (0)
P11	2,9	68	19	65	23	356	17	131	12	19,9	30 (5,97)	7 (1,4)	13 (2,6)	1 (0,2)	49 (9,8)	0 (0)
P16	8,1	205	56	69	25	365	16	170	11	13,0	63 (8,19)	8 (1,0)	11 (1,4)	0 (0)	18 (2,3)	0 (0)
P18	6,7	162	47	70	24	348	15	163	12	24,2	56 (13,55)	23 (5,6)	11 (2,7)	0 (0)	10 (2,4)	0 (0)
P19	3,6	96	26	73	27	363	16	589	11	31,0	76 (23,56)	8 (2,5)	12 (3,7)	0 (0)	4 (1,2)	0 (0)
P24	5,5	128	36	65	23	357	16	155	11	21,1	60 (12,66)	12 (2,5)	8 (1,7)	3 (0,6)	17 (3,6)	0 (0)
P25	6,6	146	43	66	22	337	16	359	9	9,7	80 (7,76)	10 (1,0)	5 (0,5)	2 (0,2)	3 (0,3)	0 (0)
P27	3,6	86	25	69	24	346	16	119	12	60,8	63 (38,30)	2 (1,2)	4 (2,4)	0 (0)	31 (18,9)	0 (0)
P28	5,5	124	37	66	23	339	17	196	11	20,0	57 (11,4)	9 (1,8)	8 (1,6)	2 (0,4)	24 (4,8)	0 (0)
P31	1,7	41	11	68	25	363	16	197	9	9,4	39 (3,67)	11 (1,0)	9 (0,9)	1 (0,1)	40 (3,8)	0 (0)
P43	5,1	119	33	65	23	359	15	499	8	21,2	68 (14,42)	7 (1,5)	7 (1,5)	2 (0,4)	16 (3,4)	0 (0)
P44	5,1	115	33	65	23	346	19	243	12	12,6	64 (8,06)	13 (1,6)	8 (1,0)	1 (0,1)	14 (1,8)	0 (0)
P46	7,3	173	50	69	24	347	14	252	10	8,2	74 (6,07)	7 (0,6)	14 (1,2)	0 (0)	5 (0,4)	0 (0)
P53	6,1	142	41	68	23	343	16	168	11	20,4	61 (12,44)	10 (2,0)	11 (2,2)	0 (0)	18 (3,7)	0 (0)
P56	5,4	139	40	73	26	349	14	374	8	14,9	62 (9,24)	23 (3,4)	4 (0,6)	0 (0)	11 (1,6)	0 (0)
P58	6,9	146	43	63	21	337	18	201	11	35,2	8 (2,82)	3 (1,1)	11 (3,9)	0 (0)	78 (27,5)	0 (0)
P59	6,2	152	44	71	25	347	15	301	10	17,2	58 (9,98)	26 (4,5)	8 (1,4)	6 (1,0)	2 (0,3)	0 (0)
Najniža vrijednost	1,7	41	11	63	21	337	14	119	8	6,2	8 (2,8)	2 (0,6)	4 (0,4)	0 (0)	1 (0,1)	0
Najviša vrijednost	8,1	205	56	73	27	365	19	698	12	60,8	80 (38,3)	29 (5,6)	17 (10,3)	11 (2,5)	78 (27,5)	0
Aritmetička sredina	5,2	122	35	68	24	351	16	282	11	22,5	57 (12,2)	12 (2,1)	9 (2,2)	2 (0,3)	21 (5,9)	0
Medijan	5,4	124	36	67	24	349	16	201	11	20,0	62 (10,0)	9 (1,8)	8 (1,6)	1 (0,1)	16 (2,4)	0
Standardna devijacija	1,7	40	12	3	1	9	1	162	1	15,4	17 (8,6)	8 (1,3)	3 (2,2)	3 (0,6)	20 (8,2)	0
Kolmogorov- Smirnov test	0,14	0,11	0,12	0,18	0,19	0,14	0,22	0,22	0,26	0,25	0,26 (0,23)	0,22 (0,19)	0,16 (0,26)	0,28 (0,31)	0,23 (0,34)	0

(Vrijednosti Kolmogorov-Smirnov testa za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu su u *kurzivu*. Vrijednosti pokazatelja koje su izvan referentnog raspona su u *kurzivu*.)

Tablica IX. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja izmjerenih u serumu skupine kuja oboljelih od piometre.

	Ureja	Kreatinin	Proteini uk.	Albumin	Bilirubin uk.	Glukoza	AST	ALT	γGT	ALP	CK	DGGR lipaza	cCRP	Kalcij uk.	Fosfat anorg.	Trigliceridi	Kolesterol uk.	Natrij	Kalij	Klorid	LDH	Magnezij uk.	Željezo
Referentni raspon	3,3-8,3 mmol/L	44-140 μmol/L	55-75 g/L	26-33 g/L	-8,6 μmol/L	3,6-6,5 mmol/L	-82 U/L	-88 U/L	-6 U/L	20-156 U/L	-160 U/L	-120 U/L	-10,7 mg/L	2,1-3,1 mmol/L	0,7-2,1 mmol/L	0,2-1,3 g/L	3,5-7,1 g/L	140-155 mmol/L	3,6-5,8 mmol/L	90-110 mmol/L	45-233 U/L	0,8-1,1 mmol/L	μmol/L
P8	19,6	292	43	11	13,7	3,7	180	21	3	282	3351	498	68,1	2,0	4,1	0,6	3,6	144	4,4	105	467	1,2	9,8
P9	7,0	59	60	28	1,1	5,6	17	23	6	22	129	48	3,4	2,4	1,7	0,6	5,9	145	4,5	112	120	1,0	34,0
P10	2,6	59	68	22	1,0	2,9	34	11	1	56	153	54	60,0	2,3	1,3	0,7	4,1	145	4,4	114	347	0,7	18,3
P11	5,0	85	59	21	1,4	6,3	14	9	2	78	26	402	191,5	2,3	2,2	0,6	6,9	141	5,0	107	70	0,9	21,9
P16	3,1	52	40	18	1,1	4,5	18	14	1	44	37	57	164,5	1,8	1,0	0,5	4,4	126	3,5	98	61	0,7	16,3
P18	3,2	86	67	26	1,3	6,1	66	18	6	166	685	49	263,1	2,6	1,3	1,6	9,9	149	4,8	117	291	0,8	30,7
P19	4,5	86	70	25	1,6	5,2	45	60	18	220	586	157	248,2	2,5	1,2	0,9	8,6	145	4,5	118	128	1,0	11,3
P24	3,7	49	70	25	1,2	3,9	31	20	4	81	94	50	153,5	2,4	1,2	1,1	5,6	150	4,1	117	112	0,9	30,1
P25	5,9	109	65	29	1,2	5,7	16	28	3	152	43	68	207,7	2,7	1,0	0,8	11,4	149	4,4	117	69	0,8	16,6
P27	2,2	68	41	17	0,9	5,3	37	14	1	33	136	43	132,3	2,1	1,2	0,9	8,0	147	3,8	122	70	0,5	21,2
P28	3,6	72	85	18	2,1	4,2	48	17	5	113	191	227	75,0	2,3	1,9	1,4	5,7	152	4,3	120	214	0,9	37,3
P31	7,0	70	50	15	2,0	4,9	27	10	3	20	92	28	109,3	2,0	1,7	0,5	2,5	128	3,8	105	51	0,5	11,7
P43	3,8	61	78	22	1,2	4,1	18	12	2	75	23	41	126,2	2,3	1,1	0,5	4,9	137	4,2	110	41	0,8	13,9
P44	2,7	54	79	24	1,0	3,4	39	46	3	39	137	86	105,8	2,5	1,9	0,7	6,0	147	4,9	114	190	0,7	17,5
P46	3,4	73	72	31	3,1	5,7	35	47	5	130	210	160	49,4	2,7	1,8	0,9	10,8	158	4,4	122	67	0,9	57,6
P53	3,7	69	72	26	5,5	5,5	50	38	4	234	242	37	78,7	2,5	1,2	0,8	8,2	156	3,9	117	222	0,9	46,7
P56	5,6	75	63	23	1,6	4,3	23	23	3	225	41	122	355,2	2,3	1,2	0,7	9,3	138	4,5	105	185	0,8	16,9
P58	4,6	70	71	25	1,4	4,5	46	24	3	134	105	84	182,5	2,4	1,6	1,0	5,4	147	4,3	117	375	0,8	19,9
P59	3,7	91	73	31	1,7	6,3	34	19	9	39	171	76	11,2	2,8	1,0	1,3	6,0	150	4,6	118	106	0,8	35,4
Najmanja vrijednost	2,2	49	40	11	0,9	2,9	14	9	1	20	23	28	3,4	1,8	1,0	0,5	2,5	126	3,5	98	41	0,5	9,8
Najviša vrijednost	19,6	292	85	31	13,7	6,3	180	60	18	282	3351	498	355,2	2,8	4,1	1,6	11,4	158	5,0	122	467	1,2	57,6
Aritmetička sredina	5,0	83	65	23	2,3	4,9	41	24	4	113	340	120	136,1	2,4	1,6	0,9	6,7	145	4,3	113	168	0,8	24,6
Medijan	3,7	70	68	24	1,4	4,9	34	20	3	81	136	68	126,2	2,4	1,3	0,8	6,0	147	4,4	117	120	0,8	19,9
Standardna devijacija	3,8	53	13	5	3,0	1,0	36	14	4	81	750	128	90,7	0,3	0,7	0,3	2,5	8	0,4	7	124	0,2	12,9
Kolmogorov-Smirnov test	0,25	0,34	0,16	0,12	0,37	0,11	0,30	0,23	0,23	0,18	0,39	0,29	0,11	0,19	0,22	0,17	0,19	0,19	0,15	0,23	0,20	0,19	0,21

(Vrijednosti Kolmogorov-Smirnov testa za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu su u *kurzivu*. Vrijednosti pokazatelja koje su izvan referentnog raspona su u *kurzivu*.)

Tablica X. Vrijednosti biokemijskih i fizikalnih pokazatelja izmjerenih u mokraći kuja oboljelih od piometre.

	Proteini ukupni	Kreatinin	UPCR	Glukoza	Ureja	Natrij	Osmolalnost	USG
	mg/L	mmol/L	/	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mOsmol/kg	/
P8	1,023	2,20	4,12	0,665	56,2	57,7	0,246	1,016
P9	1,019	34,34	0,26	1,058	696,8	50,2	1,472	1,044
P10	0,294	11,15	0,24	0,279	304,8	320,5	1,073	1,024
P11	0,364	9,71	0,33	0,026	497,0	15,3	0,685	1,019
P16	1,168	34,16	0,30	1,211	940,7	34,5	1,491	1,045
P18	0,886	5,76	1,36	0,399	154,6	19,2	0,356	1,011
P19	1,760	33,29	0,47	1,013	1327,4	28,7	1,773	1,020
P24	0,602	19,17	0,28	0,578	798,6	16,6	1,204	1,038
P25	0,456	37,90	0,11	0,834	1045,1	18,2	1,372	1,039
P27	0,185	9,99	0,16	0,260	229,2	53,7	0,526	1,017
P28	0,620	10,27	0,53	0,717	345,0	37,1	0,638	1,021
P31	1,691	22,44	0,67	0,795	1416,9	19,8	1,886	1,052
P43	1,192	14,61	0,72	0,018	805,8	17,5	1,147	1,032
P44	1,243	15,23	0,72	0,441	475,7	22,4	0,764	1,023
P46	0,237	16,33	0,13	0,464	602,9	14,1	0,825	1,023
P53	0,882	8,31	0,94	0,519	299,3	196,7	0,772	1,023
P56	0,710	13,53	0,46	0,503	569,2	15,8	0,899	1,029
P58	0,180	2,90	0,55	0,048	129,5	23,9	0,269	1,009
P59	0,106	13,70	0,07	0,156	472,8	35,9	0,704	1,021
Najniža vrijednost	0,106	2,20	0,07	0,018	56,2	14,1	0,246	1,009
Najviša vrijednost	1,760	37,90	4,12	1,211	1416,9	320,5	1,886	1,052
Aritmetička sredina	0,769	16,58	0,65	0,526	587,8	52,5	0,953	1,027
Medijan	0,710	13,70	0,46	0,503	497,0	23,9	0,825	1,023
Standardna devijacija	0,500	10,96	0,90	0,353	390,0	76,7	0,484	0,012
Kolmogorov- Smirnov test	0,11	0,19	0,31	0,09	0,12	0,37	0,13	0,22

(Vrijednosti Kolmogorov-Smirnov testa za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu su u *kurzivu*.)

Tablica XI. Vrijednosti pokazatelja rutinske analize mokraće (test-traka, sediment) izmjerene u skupini kuja oboljelih od piometre.

	boja	izgled	glukoza	bilirubin	ketoni	hemoglobin	pH	proteini	urobilinogen	nitriti	Leukocitna esteraza	leukociti	eritrociti	Pločasti epitel	Male epitelne stanice	Hijalini cilindri	Nehijalini cilindri	bakterije	kristali	sol	sluz	lipidi
P8	int. žuta	blago zamućen	neg	Blago povišen	neg	Ca 200	7,0	1,0	norm	neg	neg	4-8	0-2		0-1		pokoji granulirani	3+ (š), rijetke (o)		1+	2+	3+
P9	int. žuta	zamućen	neg	povišen	trag	trag	>9,0	>3,0	16	neg	neg	0-2	3-6		pokoja			rijetke (o)				3+
P10	žuta	zamućen	neg	neg	1,5	neg	8,5	0,3	norm	neg	neg	3-6	0-1		0-1 prijel.		pokoji granulirani	rijetke (o)				1+
P11	žuta	mutan	neg	Neg	neg	trag	6,0	1,0	norm	neg	Ca 70	10-15	5-10		3-5 prijel.			3+ (š)				1+
P16	zag. žuta	blago zamućen	neg	povišen	1,5	trag	8,5	>3,0	16	neg	neg	2-4	0-1		0-1			nešto (o)	nešto struvita			1+
P18	žuta	vrlo blago zamućen	neg	neg	neg	Ca 200	8,5	1,0	norm	neg	neg	4-8	5-10		1-3		pokoji granulirani	nešto (o)			1+	
P19	zag. žuta	zamućen	neg	povišen	trag	Ca 200	7,5	>3,0	norm	neg	neg	40-80	30-50		1-3			2+ (o)				
P24	int. žuta	mutan	neg	povišen	1,5	trag	6,0	1,0	norm	neg	neg	6-12	pokoji		2-4 (+ nakupine)		pokoji granulirani	nešto (o)				2+
P25	int. zag. žuta	zamućen	neg	povišen	trag	Ca 200	6,5	1,0	norm	neg	neg		100-200		0-2 (+nakupine)			1+ (o)	nešto oksalata			
P27	žuta	vrlo blago zamućen	neg	neg	neg	neg	5,5	trag	norm	neg	Ca 70	40-60			0-2			1+ (o)				
P28	žuta	vrlo blago zamućen	neg	Blago povišen	neg	neg	6,5	1,0	norm	neg	neg	5-10	pokoji		0-1		pokoji granulirani	rijetke (o)	nešto bilirubina			1+
P31	naran.	blago zamućen	neg	Izrazito povišen	trag	neg	6,5	>3,0	16	neg	neg	3-6			0-1			nešto (o)				2+
P43	int. žuta	zamućen	neg	Blago povišen	trag	neg	7,0	1,0	norm	neg	neg	3-6	0-1		1-3 (+ nakupine)			3+ (o)				1+
P44	žuta	blago zamućen	neg	Blago povišen	neg	neg	6,0	1,0	norm	neg	neg	4-8			0-2	0-1	pokoji granulirani	rijetke (o)				1+
P46	žuta	zamućen	neg	neg	neg	neg	6,5	trag	norm	neg	neg	2-4	rijetki		0-1			nešto (o)				1+
P53	žuta	vrlo blago zamućen	neg	Blago povišen	neg	trag	8,5	1,0	norm	neg	neg	10-20	0-1		0-1			rijetke (o)	pokoji struvit			
P56	žuta	bistar	neg	neg	neg	neg	6,5	1,0	norm	neg	neg	2-5	0-1		1-2 (+ nakupine)		pokoji granulirani	rijetke (o)				
P58	žuta	bistar	neg	neg	neg	Ca 80	6,0	neg	norm	neg	neg	0-1	0-2		pokoja							1+
P59	žuta	blago zamućen	neg	neg	neg	neg	6,5	neg	norm	poz	neg	2-4	pokoji		pokoja		pokoji hijalino-granulirani	2+ (š)				nešto

Tablica XII. *T*-test za serum kuja s piometrom

	t.stat	Vrijednost p	-log10(p)	FDR
565	11.528	1.809E-13	12.743	1.3549E-10
518	11.488	1.9954E-13	12.7	1.3549E-10
1196	-10.056	7.3215E-12	11.135	2.3282E-09
421	10.043	7.5679E-12	11.121	2.3282E-09
1072	-9.9958	8.5721E-12	11.067	2.3282E-09
900	-9.726	1.7449E-11	10.758	3.9492E-09
554	9.36	4.6476E-11	10.333	9.0164E-09
380	9.1398	8.4488E-11	10.073	1.4342E-08
605	9.0916	9.6392E-11	10.016	1.4544E-08
1336	-8.1694	1.2662E-09	8.8975	1.5894E-07
361	8.1636	1.2874E-09	8.8903	1.5894E-07
474	7.9431	2.42E-09	8.6162	2.7387E-07
808	-7.826	3.3917E-09	8.4696	3.5431E-07
951	7.7977	3.681E-09	8.434	3.5706E-07
303	7.7451	4.2869E-09	8.3679	3.8787E-07
pantotenat	7.182	2.2281E-08	7.6521	1.3754E-06
L-glutamin	6.4272	2.1216E-07	6.6733	7.3877E-06
L-prolin	5.667	2.1218E-06	5.6733	3.7912E-05
L-arginin	4.7554	3.3517E-05	4.4747	0.00034222
L-citrulin	4.4658	7.9595E-05	4.0991	0.00068412
L-triptofan	4.0017	0.00031071	3.5077	0.0018963
glicin	3.9459	0.00036504	3.4377	0.0020911
L-karnitin	-3.681	0.00077694	3.1096	0.0038089
citozin	3.6622	0.00081928	3.0866	0.0039878
<i>trans</i> -4-hidroksi-L-prolin	3.5991	0.00097807	3.0096	0.0045178
citidin	2.9366	0.0058319	2.2342	0.017999
L-serin	2.4221	0.02075	1.683	0.048751

Tablica XIII. *Volcano plot* analiza za serum kuja s piometrom

	FC	log2(FC)	p.adjusted	-log10(p)
518	0.21042	-2.2487	1.3549E-10	9.8681
565	0.28475	-1.8122	1.3549E-10	9.8681
421	0.2029	-2.3011	2.3282E-09	8.633
1072	4.2232	2.0783	2.3282E-09	8.633
1196	2.7441	1.4563	2.3282E-09	8.633
900	6.0834	2.6049	3.9492E-09	8.4035
554	0.2309	-2.1147	9.0164E-09	8.045
380	0.37407	-1.4186	1.4342E-08	7.8434
605	0.21669	-2.2063	1.4544E-08	7.8373
361	0.32949	-1.6017	1.5894E-07	6.7988
1336	2.2688	1.182	1.5894E-07	6.7988
474	0.48489	-1.0443	2.7387E-07	6.5625
808	5.3347	2.4154	3.5431E-07	6.4506
951	0.39076	-1.3556	3.5706E-07	6.4473
303	0.37396	-1.4191	3.8787E-07	6.4113
pantotenat	0.3661	-1.4497	1.3754E-06	5.8616
L-karnitin	2.5108	1.3281	0.0038089	2.4192

Tablica XIV. VIP analiza za serum kuja s piometrom

	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 3	Komp. 4	Komp. 5	Komp. 6	Komp. 7	Komp. 8
565	2.2272	2.0949	2.0189	1.968	1.9541	1.945	1.9426	1.9419
518	2.2255	2.0918	2.0049	1.9444	1.9292	1.9206	1.9181	1.9172
1196	2.1576	2.1576	2.1591	2.0999	2.0849	2.0738	2.0708	2.0701
421	2.1569	2.0229	1.9479	1.8888	1.8765	1.8692	1.8669	1.8661
1072	2.1543	2.2362	2.2359	2.1861	2.1705	2.159	2.156	2.1551
900	2.1387	2.1196	2.0503	1.9888	1.9735	1.9634	1.9606	1.9598
554	2.1161	1.9778	1.902	1.8476	1.8369	1.8298	1.8275	1.8267
380	2.1015	1.9749	1.9004	1.8428	1.8333	1.8264	1.8243	1.8236
605	2.0982	1.9578	1.8858	1.831	1.8195	1.8123	1.8099	1.8091
1336	2.0275	2.0454	1.9882	1.9454	1.9287	1.9197	1.9173	1.9166
361	2.027	1.9336	1.849	1.792	1.7772	1.7677	1.7653	1.7646
474	2.0077	1.8733	1.7946	1.7431	1.7283	1.7193	1.717	1.7163
808	1.9969	2.0113	1.9667	1.9156	1.9017	1.8919	1.8893	1.8887
951	1.9943	1.8596	1.7741	1.7224	1.7169	1.711	1.7087	1.708
303	1.9894	1.8714	1.8603	1.8136	1.7981	1.7885	1.786	1.7853
pantotenat	1.9322	1.808	1.7442	1.6903	1.6768	1.6679	1.6656	1.6649
L-glutamin	1.8418	1.7243	1.7236	1.6711	1.661	1.6522	1.6516	1.651
L-prolin	1.7317	1.6531	1.6532	1.6038	1.5917	1.5853	1.5831	1.5824
L-arginin	1.5683	1.4591	1.3903	1.3593	1.355	1.3479	1.346	1.3455
L-citrulin	1.5082	1.4251	1.393	1.3515	1.3453	1.3388	1.3412	1.3407
L-triptofan	1.4025	1.3081	1.2786	1.2401	1.23	1.2265	1.2253	1.2248
glicin	1.389	1.2918	1.2663	1.2337	1.2233	1.2169	1.2152	1.215
L-karnitin	1.3225	1.2606	1.2319	1.2114	1.203	1.1983	1.1972	1.1972
citozin	1.3176	1.2246	1.1755	1.1578	1.1493	1.1432	1.1424	1.1419
<i>trans</i> -4-hidroksi-L-prolin	1.3011	1.2251	1.1802	1.1438	1.134	1.1343	1.1329	1.1338
citidin	1.113	1.0383	0.99048	1.0019	1.0028	0.99864	0.99984	0.9994
L-serin	0.94846	0.88746	0.87596	0.88865	0.88113	0.87653	0.87632	0.87604
kolin	0.92859	1.1171	1.2497	1.3342	1.323	1.3189	1.3217	1.3219
inozin	0.92368	0.86687	0.83244	0.81175	0.83038	0.82655	0.82546	0.82537
<i>cis</i> -akonitat	0.89436	0.83936	0.87304	0.84682	0.85289	0.84957	0.84863	0.84891
L-fenilalanin	0.83445	0.99935	0.97368	0.98109	0.97372	0.96853	0.96772	0.9673
L-kinurenin	0.77945	0.90627	0.88429	0.86756	0.86471	0.86268	0.86493	0.86457
L-alanin	0.7685	0.76365	0.99554	1.0568	1.0505	1.0454	1.0448	1.0444
betain	0.74759	0.76222	0.72641	0.74473	0.74965	0.74736	0.75275	0.75521
kreatinin	0.72045	0.67234	0.88033	0.96658	0.96065	0.95556	0.95449	0.95539
(S)-malat	0.70538	0.68489	0.75788	0.75027	0.7441	0.74329	0.74821	0.74793
N-acetil-neuraminat	0.64397	0.83987	0.82177	0.83023	0.84314	0.83869	0.83836	0.83878
malonat	0.63998	0.6732	0.88364	1.0113	1.0065	1.0036	1.0077	1.0073
L-metionin	0.53754	0.51106	0.73399	0.8154	0.80857	0.80445	0.81934	0.81946
metil-malonat / sukcinat	0.50478	0.99747	1.0512	1.0706	1.0677	1.0621	1.0635	1.063
L-asparagin	0.48696	0.49039	0.58724	0.56917	0.56445	0.56557	0.56781	0.57045
L-glutamin	0.43367	0.60076	0.61643	0.63232	0.62744	0.62428	0.62537	0.62696
taurin	0.30008	0.62025	0.59564	0.58702	0.58569	0.58263	0.58182	0.58164
L-valin	0.17312	0.17047	0.39617	0.39222	0.40632	0.41171	0.41114	0.41163
N-acetil-L-glutamat	0.16617	0.251	0.26467	0.25872	0.28144	0.28285	0.29464	0.29454
L-leucin	0.16305	0.24895	0.51161	0.5068	0.50672	0.50818	0.50773	0.50841

Tablica XV. *T*-test za mokraću kuja s piometrom

	t.stat	Vrijednost p	-log10(p)	FDR
168	-9.7675	2.1235E-11	10.673	2.3125E-08
42	-8.7197	3.4459E-10	9.4627	1.8763E-07
932	-8.1494	1.6653E-09	8.7785	6.0451E-07
607	-7.8976	3.3819E-09	8.4708	9.2072E-07
367	-7.651	6.8138E-09	8.1666	1.484E-06
590	-7.5242	9.7954E-09	8.009	1.7779E-06
976	-7.446	1.2264E-08	7.9114	1.9079E-06
545	-7.0493	3.87E-08	7.4123	4.8055E-06
371	-7.0405	3.9715E-08	7.401	4.8055E-06
1075	-6.9668	4.9254E-08	7.3076	5.3637E-06
98	-6.8115	7.7632E-08	7.11	7.6855E-06
1060	-6.5459	1.6982E-07	6.77	1.5411E-05
1057	-6.2887	3.6422E-07	6.4386	2.924E-05
344	-6.2635	3.926E-07	6.406	2.924E-05
659	-6.2549	4.0275E-07	6.395	2.924E-05
L-glutamat	-5.0719	1.3861E-05	4.8582	0.00027745
L-fenilalanin	-5.0048	1.6933E-05	4.7713	0.00032929
D-glukonska kiselina	-4.0162	0.00030913	3.5099	0.0029021
alantoin	-3.3151	0.0021857	2.6604	0.013601
betain	-3.2301	0.002745	2.5615	0.016601
L-homoserin / L-treonin	-2.8343	0.0076734	2.115	0.034864

Tablica XVI. *Volcano plot* analiza za mokraću kuja s piometrom

	FC	log2(FC)	Korigirana p vrijednost	-log10(p)
168	2.4074	1.2675	2.3125E-08	7.6359
42	9.8092	3.2941	1.8763E-07	6.7267
932	3.6232	1.8573	6.0451E-07	6.2186
367	5.0763	2.3438	1.484E-06	5.8286
590	3.6682	1.8751	1.7779E-06	5.7501
976	5.3288	2.4138	1.9079E-06	5.7195
371	3.7065	1.89	4.8055E-06	5.3183
545	2.3382	1.2254	4.8055E-06	5.3183
1075	5.1609	2.3676	5.3637E-06	5.2705
1060	4.9327	2.3024	1.5411E-05	4.8122
344	4.192	2.0676	2.924E-05	4.534
1057	3.8455	1.9432	2.924E-05	4.534
659	2.5935	1.3749	2.924E-05	4.534
459	3.8157	1.932	3.0148E-05	4.5207
447	3.52	1.8156	3.1929E-05	4.4958
L-glutamat	4.6021	2.2023	0.00027745	3.5568
L-fenilalanin	2.2876	1.1938	0.00032929	3.4824
D-glukonska kiselina	4.8692	2.2837	0.0029021	2.5373

Tablica XVII. VIP analiza za mokraću kuja s piometrom

	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 3	Komp. 4	Komp. 5	Komp. 6	Komp. 7	Komp. 8
168	2.3836	2.0585	1.9965	1.9701	1.9651	1.9618	1.9607	1.9605
42	2.3076	1.7821	1.7293	1.7053	1.6995	1.6982	1.6973	1.697
932	2.2577	1.8328	1.773	1.7603	1.7543	1.7546	1.7534	1.7531
607	2.2333	1.8458	1.8016	1.7766	1.7718	1.7688	1.7676	1.7675
367	2.2079	1.682	1.6314	1.6096	1.6041	1.6046	1.6037	1.6034
590	2.1943	1.7458	1.7202	1.7053	1.7034	1.7043	1.7042	1.7039
976	2.1856	1.6801	1.6395	1.6166	1.6112	1.612	1.611	1.6108
545	2.1391	1.6802	1.6798	1.6752	1.6722	1.6698	1.6693	1.669
371	2.138	1.5114	1.461	1.4411	1.4362	1.4358	1.4352	1.4349
1075	2.1288	1.5961	1.5418	1.52	1.5153	1.5163	1.5159	1.5156
98	2.1089	1.6647	1.6228	1.6007	1.5988	1.5962	1.5952	1.5951
1060	2.0729	1.5092	1.5225	1.5084	1.5033	1.5028	1.5018	1.5017
1057	2.0356	1.4752	1.4371	1.4176	1.4138	1.4161	1.4154	1.4151
344	2.0319	1.4744	1.4574	1.4446	1.44	1.4441	1.4432	1.4429
659	2.0306	1.5372	1.4856	1.5066	1.503	1.5018	1.501	1.5007
L-glutamat	1.8219	1.3315	1.2848	1.2749	1.2721	1.2699	1.269	1.2688
L-fenilalanin	1.808	1.3937	1.3475	1.3314	1.3271	1.3252	1.3249	1.3248
D-glukonska kiselina	1.5747	1.0983	1.0598	1.0529	1.0493	1.0475	1.0468	1.0469
alantoin	1.372	0.81403	0.83396	0.8222	0.82493	0.82352	0.82624	0.82674
betain	1.3452	0.99169	0.96722	0.98425	0.98493	0.99214	0.99333	0.9935
L-homoserin / L-treonin	1.2136	0.78189	0.97215	0.96814	0.97746	0.97931	0.97918	0.97934
N-acetil-glutamin	0.98663	0.62019	0.64562	0.65098	0.64946	0.65122	0.65432	0.65421
D-galakatarat	0.86613	1.1215	1.0866	1.1564	1.1624	1.1623	1.1656	1.1654
kreatinin	0.72321	0.88356	0.86102	0.84903	0.84999	0.84862	0.84804	0.8479
L-glutamin	0.56433	0.33031	0.37536	0.41185	0.52049	0.51977	0.52037	0.52031
N(<i>pi</i>)-metil-L- histidin	0.55197	1.5299	1.6119	1.5938	1.5899	1.5874	1.5865	1.5864

Tablica XVIII. *T*-test za serum kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a

	<i>t</i> -test	Vrijednost p	-log10(p)	FDR
644	11.241	5.3757E-13	12.27	8.6226E-10
1375	-9.7491	2.2271E-11	10.652	1.5429E-08
1200	-9.6495	2.8857E-11	10.54	1.5429E-08
1006	-9.4121	5.3779E-11	10.269	2.1565E-08
444	9.2417	8.4443E-11	10.073	2.6349E-08
872	-9.1837	9.8564E-11	10.006	2.6349E-08
627	8.7673	3.0269E-10	9.519	6.9358E-08
1566	-8.301	1.0913E-09	8.9621	2.188E-07
1067	7.8297	4.0982E-09	8.3874	7.304E-07
166	7.6146	7.5599E-09	8.1215	1.2126E-06
356	7.5215	9.8705E-09	8.0057	1.4393E-06
73	7.3895	1.4432E-08	7.8407	1.929E-06
454	-7.3094	1.8183E-08	7.7403	2.1574E-06
448	7.2973	1.8831E-08	7.7251	2.1574E-06
558	7.1466	2.9154E-08	7.5353	3.0276E-06
pantotenat	6.9287	5.5048E-08	7.2593	4.4148E-06
L-glutamin	6.323	3.2886E-07	6.483	1.3802E-05
L-prolin	5.4297	4.7495E-06	5.3233	8.6571E-05
L-citrulin	4.4827	7.9632E-05	4.0989	0.00073408
L-arginin	4.1496	0.00021048	3.6768	0.0015276
glicin	4.0444	0.00028508	3.545	0.0019542
L-karnitin	-3.973	0.00034983	3.4561	0.0023092
L-triptofan	3.7795	0.00060619	3.2174	0.0035513
citozin	3.5525	0.0011429	2.942	0.0054978
<i>trans</i> -4-hidroksi-L-prolin	3.5387	0.0011872	2.9255	0.0056633
malonat	-3.2021	0.0029572	2.5291	0.011402
<i>cis</i> -akonitat	3.0293	0.0046572	2.3319	0.016134
citidin	2.8678	0.0070505	2.1518	0.022315
N-acetil-glutamin	-2.802	0.0083242	2.0797	0.025288
kreatinin	2.7241	0.010107	1.9954	0.029264
L-serin	2.537	0.015938	1.7976	0.041367
orotat	-2.4983	0.017478	1.7575	0.044443

Tablica XIX. *Volcano plot* analiza za serum kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a

	FC	log2(FC)	Korigirana vrijednost p	-log10(p)
644	0.28742	-1.7988	8.6226E-10	9.0644
1200	4.1948	2.0686	1.5429E-08	7.8117
1375	2.7372	1.4527	1.5429E-08	7.8117
1006	5.9936	2.5834	2.1565E-08	7.6662
872	8.1318	3.0236	2.6349E-08	7.5792
444	0.38663	-1.371	2.6349E-08	7.5792
627	0.2424	-2.0445	6.9358E-08	7.1589
1566	2.31	1.2079	2.188E-07	6.6599
1067	0.4048	-1.3047	7.304E-07	6.1364
356	0.37653	-1.4092	1.4393E-06	5.8418
73	0.41258	-1.2773	1.929E-06	5.7147
454	6.134	2.6168	2.1574E-06	5.6661
448	0.44979	-1.1527	2.1574E-06	5.6661
1435	2.657	1.4098	3.0276E-06	5.5189
558	0.41841	-1.257	3.0276E-06	5.5189
pantotenat	0.3759	-1.4116	4.4148E-06	5.3551

Tablica XX. VIP analiza za serum kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a

	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 3	Komp. 4	Komp. 5	Komp. 6	Komp. 7	Komp. 8
644	2.2424	2.113	2.028	1.9895	1.9747	1.9691	1.9665	1.9659
1375	2.1679	2.172	2.1345	2.0892	2.0747	2.0673	2.0645	2.0639
1200	2.162	2.2165	2.1601	2.1176	2.1022	2.0955	2.0927	2.0922
1006	2.1474	2.1097	2.0148	1.9722	1.9589	1.9521	1.9496	1.949
444	2.1364	2.0177	1.9389	1.8988	1.889	1.8845	1.8826	1.882
872	2.1326	2.0902	1.9951	1.9544	1.9437	1.9368	1.9343	1.9337
627	2.1034	1.9676	1.8824	1.8453	1.8376	1.8339	1.8315	1.831
1566	2.0671	2.0564	1.969	1.9303	1.9138	1.907	1.9045	1.9041
1067	2.026	1.8951	1.8058	1.7688	1.758	1.7548	1.7527	1.7523
166	2.0056	1.8677	1.7782	1.7401	1.7252	1.7208	1.7186	1.718
356	1.9964	1.8867	1.8626	1.8264	1.8118	1.8054	1.803	1.8028
73	1.9831	1.8671	1.7838	1.7474	1.7344	1.7314	1.73	1.7297
454	1.9747	1.9308	1.8336	1.7943	1.7795	1.774	1.7719	1.7715
448	1.9735	1.8441	1.7798	1.7486	1.7336	1.7275	1.7254	1.7252
558	1.9573	1.824	1.7434	1.7114	1.7011	1.6963	1.6944	1.6939
pantotenat	1.9328	1.812	1.7416	1.7045	1.69	1.6839	1.6817	1.6814
L-glutamin	1.857	1.744	1.7247	1.6877	1.674	1.6683	1.6661	1.6658
L-prolin	1.7215	1.6484	1.638	1.6177	1.6042	1.5993	1.5989	1.5984
L-citrulin	1.5396	1.4501	1.401	1.3758	1.3646	1.3598	1.358	1.3587
L-arginin	1.4647	1.3645	1.3334	1.3049	1.3025	1.2985	1.2969	1.2974
glicin	1.4397	1.3411	1.3004	1.2734	1.2657	1.2624	1.2666	1.2667
L-karnitin	1.4224	1.3709	1.3292	1.3014	1.3047	1.3018	1.3001	1.2997
L-triptofan	1.374	1.289	1.2633	1.2362	1.2277	1.2244	1.2229	1.2227
citozin	1.3143	1.2238	1.174	1.1561	1.1463	1.1422	1.1437	1.1435
<i>trans</i> -4-hidroksi-L-prolin	1.3106	1.2206	1.1589	1.1341	1.1358	1.1319	1.1349	1.1346
malonat	1.216	1.1398	1.0853	1.0694	1.0616	1.0607	1.0598	1.0605
<i>cis</i> -akonitat	1.1646	1.0865	1.0593	1.048	1.0396	1.0371	1.0379	1.0383
citidin	1.1149	1.0407	0.99146	0.99524	0.98912	0.98643	0.9902	0.98991
N-acetil-glutamin	1.0941	1.0715	1.0407	1.0258	1.0196	1.0178	1.0177	1.0176
kreatinin	1.0692	0.99759	1.1137	1.1165	1.1112	1.1086	1.1099	1.1096
L-serin	1.0078	0.94348	0.91806	0.91522	0.90804	0.90632	0.91789	0.91901
orotat	0.99484	1.1466	1.0891	1.0663	1.0585	1.0563	1.0587	1.0587
kolin	0.90362	0.89938	0.85607	0.86418	0.85985	0.888	0.89457	0.89454
β -alanin, L-alanin	0.9015	0.8774	1.0052	1.0529	1.0556	1.0533	1.0541	1.0541
inozin	0.85374	0.8018	0.76891	0.7666	0.7612	0.76125	0.76264	0.76246
L-fenilalanin	0.80433	0.94993	0.90723	0.89328	0.89788	0.89612	0.89655	0.89718
L-kinurenin	0.74707	0.88868	0.85216	0.84357	0.85179	0.85275	0.85322	0.85318
(S)-malat	0.73766	0.72085	0.75641	0.74665	0.74139	0.74002	0.74885	0.74874
L-metionin	0.69123	0.65982	0.81324	0.84053	0.84704	0.84544	0.84505	0.8449
L-asparagin	0.54928	0.52924	0.61423	0.60134	0.6087	0.60653	0.60575	0.60679
L-homoserin / L-treonin	0.54448	0.50728	0.56497	0.56788	0.5643	0.57128	0.58675	0.58805
N-acetil-neuraminat	0.51255	0.90892	0.90029	0.94804	0.95062	0.95136	0.96165	0.96136
metil-malonat / sukcinat	0.41804	0.97673	0.9772	0.98691	0.98388	0.98041	0.97912	0.97949
taurin	0.40737	0.64886	0.62854	0.63569	0.64644	0.64427	0.64416	0.64398
5-oksoprolin	0.37027	0.50008	0.48808	0.4836	0.57294	0.57859	0.58069	0.58186
betain	0.27982	0.39221	0.3724	0.43278	0.43249	0.46289	0.50135	0.50137
L-glutamat	0.27437	0.61781	0.64959	0.67783	0.67978	0.67936	0.69626	0.69728
(R)-2-hidroksi-glutarat	0.26945	0.36592	0.3519	0.38449	0.39179	0.40947	0.42372	0.42372
4-trimetil-amonij-butanoat	0.26408	0.2459	0.49604	0.48565	0.54583	0.54394	0.54358	0.54349
L-leucin	0.21002	0.307	0.52647	0.5802	0.58422	0.58406	0.59042	0.59044
L-valin	0.20576	0.19521	0.40765	0.47682	0.47371	0.47369	0.48512	0.48588
N-acetil-L-glutamat	0.11773	0.24389	0.27108	0.3396	0.33804	0.3369	0.35977	0.36018
N(<i>pi</i>)-metil-L-histidin	0.026148	0.36707	0.35913	0.35959	0.39561	0.39607	0.42423	0.4241

Tablica XXI. *T*-test za mokraću kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a

	<i>t</i> -test	Vrijednost p	-log ₁₀ (p)	FDR
196	-10.104	1.249E-11	10.903	1.4363E-08
797	-8.9111	2.6742E-10	9.5728	1.0412E-07
55	-8.9052	2.7163E-10	9.566	1.0412E-07
989	-8.0612	2.6545E-09	8.576	7.6316E-07
644	-7.767	5.9985E-09	8.222	1.3797E-06
387	-7.6471	8.3854E-09	8.0765	1.6072E-06
1036	-7.3918	1.7209E-08	7.7642	2.5935E-06
618	-7.3751	1.8042E-08	7.7437	2.5935E-06
391	-6.9794	5.5773E-08	7.2536	6.2888E-06
640	-6.9766	5.6222E-08	7.2501	6.2888E-06
574	-6.9531	6.0154E-08	7.2207	6.2888E-06
117	-6.8512	8.0647E-08	7.0934	7.7287E-06
402	-6.522	2.0931E-07	6.6792	1.8516E-05
1127	-6.4531	2.5585E-07	6.592	2.1016E-05
774	-6.3897	3.078E-07	6.5117	2.3598E-05
L-glutamat	-5.1965	1.0335E-05	4.9857	0.00025287
<i>cis</i> -akonitat	-4.5687	6.5347E-05	4.1848	0.00098687
D-glukonska kiselina	-3.8596	0.00050026	3.3008	0.0045658
betain	-3.0958	0.0039863	2.3994	0.02204
alantoin	-3.0909	0.0040373	2.3939	0.022215
L-homoserin / L-treonin	-2.8143	0.0081776	2.0874	0.039348

Tablica XXII. *Volcano plot* analiza za mokraću kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a

	FC	log2(FC)	Korigirana vrijednost p	-log10(p)
196	2.2913	1.1962	1.4363E-08	7.8428
55	8.3768	3.0664	1.0412E-07	6.9824
797	2.5772	1.3658	1.0412E-07	6.9824
989	3.4047	1.7675	7.6316E-07	6.1174
387	4.446	2.1525	1.6072E-06	5.7939
1036	4.6165	2.2068	2.5935E-06	5.5861
618	3.4852	1.8012	2.5935E-06	5.5861
391	3.3957	1.7637	6.2888E-06	5.2014
574	2.2184	1.1495	6.2888E-06	5.2014
402	3.8643	1.9502	1.8516E-05	4.7325
1127	4.2187	2.0768	2.1016E-05	4.6774
774	3.8582	1.9479	2.3598E-05	4.6271
67	0.097188	-3.3631	2.3806E-05	4.6233
1028	2.2824	1.1906	2.3806E-05	4.6233
1121	3.4679	1.7941	3.6993E-05	4.4319
L-glutamat	3.5584	1.8312	0.00025287	3.5971
D-glukonska kiselina	4.1903	2.0671	0.0045658	2.3405

Tablica XXIII. VIP analiza za mokraću kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a

	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 3	Komp. 4	Komp. 5	Komp. 6	Komp. 7	Komp. 8
196	2.4734	2.0111	1.9609	1.9444	1.9299	1.9289	1.9277	1.9274
797	2.3914	1.9493	1.8973	1.8826	1.8754	1.8717	1.8708	1.8705
55	2.3909	1.7666	1.7232	1.6994	1.6898	1.6869	1.6861	1.6859
989	2.3171	1.7706	1.735	1.7104	1.7105	1.7078	1.7068	1.7066
644	2.2875	1.7803	1.7401	1.7198	1.7114	1.7122	1.7119	1.7118
387	2.2749	1.6705	1.6254	1.6186	1.6105	1.6084	1.6078	1.6076
1036	2.2466	1.6605	1.6181	1.6193	1.608	1.6063	1.6057	1.6055
618	2.2447	1.6957	1.6714	1.6491	1.6585	1.6574	1.6575	1.6573
391	2.1968	1.5196	1.4874	1.473	1.4633	1.461	1.4602	1.4601
640	2.1965	1.7216	1.675	1.6802	1.674	1.6708	1.6701	1.6699
574	2.1935	1.6443	1.6303	1.6447	1.6312	1.6281	1.6271	1.627
117	2.1802	1.6525	1.6163	1.6068	1.5964	1.6007	1.6	1.5998
402	2.1351	1.6033	1.5618	1.5742	1.5619	1.5613	1.5603	1.5601
1127	2.1252	1.5024	1.4914	1.4977	1.4855	1.4829	1.4823	1.4821
774	2.1159	1.4998	1.4642	1.4574	1.4486	1.4483	1.4483	1.4482
L-glutamat	1.9087	1.3972	1.3705	1.3513	1.3413	1.3401	1.3402	1.3401
cis-akonitat	1.771	1.2149	1.1999	1.1849	1.1754	1.1826	1.1821	1.182
D-glukonska kiselina	1.5868	1.1104	1.0861	1.0722	1.0651	1.0632	1.0634	1.0635
betain	1.3498	1.0319	1.0069	0.99685	1.0075	1.0331	1.0362	1.0386
alantoin	1.3481	0.84114	0.88843	0.88122	0.87438	0.87767	0.87717	0.8771
L-homoserin / L-treonin	1.2518	0.79571	0.83224	0.85021	0.84602	0.84854	0.84874	0.85091
N-acetil-glutamin	0.96967	0.69177	0.67963	0.67807	0.67712	0.68363	0.68873	0.68866
D-galakatarat	0.89264	1.034	1.0237	1.0165	1.0715	1.0698	1.0708	1.0712
L-glutamin	0.75119	0.51009	0.55736	0.64107	0.63635	0.63518	0.63539	0.63533
N(pi)-metil-L-histidin	0.68418	1.4315	1.4794	1.4597	1.4587	1.4566	1.4573	1.4572
kreatinin	0.65809	0.92904	0.92164	0.90906	0.90364	0.90191	0.90142	0.90133

Tablica XXIV. One-way ANOVA i *post-hoc* analiza
za serum kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR<0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR>0,5

	Vrijednost F	Vrijednost p	-log10(p)	FDR	Fischerov LSD
644	63.817	4.5619E-12	11.341	7.3173E-09	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1375	47.09	2.1508E-10	9.6674	1.1387E-07	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1006	46.62	2.431E-10	9.6142	1.1387E-07	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
444	45.241	3.4994E-10	9.456	1.1387E-07	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1200	45.188	3.5496E-10	9.4498	1.1387E-07	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
872	42.529	7.3437E-10	9.1341	1.9632E-07	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
627	38.035	2.7121E-09	8.5667	6.2147E-07	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
166	36.35	4.5528E-09	8.3417	9.1284E-07	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2; PYO 2 - PYO 1
1566	33.881	1.0025E-08	7.9989	1.7866E-06	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
448	33.428	1.1637E-08	7.9342	1.8666E-06	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2; PYO 2 - PYO 1
1067	30.024	3.7311E-08	7.4282	5.4406E-06	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1435	28.406	6.6899E-08	7.1746	8.9422E-06	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
312	27.56	9.1581E-08	7.0382	1.0779E-05	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
356	27.477	9.447E-08	7.0247	1.0779E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1504	27.16	1.0644E-07	6.9729	1.0779E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2; PYO 2 - PYO 1
454	27.133	1.0752E-07	6.9685	1.0779E-05	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
73	26.699	1.2681E-07	6.8968	1.1149E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
77	26.636	1.2993E-07	6.8863	1.1149E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
558	26.593	1.3206E-07	6.8792	1.1149E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
957	25.421	2.0811E-07	6.6817	1.669E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
80	24.854	2.6055E-07	6.5841	1.9901E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1043	24.623	2.8586E-07	6.5438	2.0842E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
57	24.5	3.0026E-07	6.5225	2.094E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1245	24.254	3.317E-07	6.4793	2.2169E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
154	24.014	3.6562E-07	6.437	2.3458E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
74	23.596	4.3375E-07	6.3628	2.5326E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
357	23.596	4.3383E-07	6.3627	2.5326E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
pantotenat	23.466	4.5777E-07	6.3394	2.5326E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
L-glutamin	19.621	2.4294E-06	5.6145	8.1182E-05	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1498	18.822	3.5135E-06	5.4543	0.00010633	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
481	18.476	4.1322E-06	5.3838	0.00012026	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
1054	17.256	7.426E-06	5.1292	0.00017263	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
453	16.942	8.6646E-06	5.0622	0.00018782	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2; PYO 2 - PYO 1
L-prolin	15.416	1.8723E-05	4.7276	0.00031979	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
1459	15.206	2.088E-05	4.6803	0.0003383	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2; PYO 2 - PYO 1
827	14.822	2.552E-05	4.5931	0.00038617	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2; PYO 2 - PYO 1
650	13.866	4.2557E-05	4.371	0.00059879	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2; PYO 2 - PYO 1
L-citrulin	9.7926	0.00045838	3.3388	0.0035179	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
glicin	9.5371	0.00053853	3.2688	0.0039806	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
L-triptofan	8.5166	0.0010417	2.9823	0.0067371	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
L-arginin	8.4385	0.0010968	2.9599	0.0069811	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
L-karnitin	8.0655	0.0014064	2.8519	0.0084176	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
citozin	6.7325	0.0035311	2.4521	0.017009	CNTRL - PYO 1
trans-4-hidroksi-L-prolin	6.078	0.005658	2.2473	0.023573	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
malonat	5.3229	0.0099181	2.0036	0.035742	PYO 1 - CNTRL

Tablica XXV.

VIP analiza za serum kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR<0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR>0,5

	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 3	Komp. 4	Komp. 5	Komp. 6	Komp. 7	Komp. 8
1006	2.3951	2.2639	2.1034	2.0207	1.9971	1.9809	1.9737	1.9709
444	2.3915	2.1999	2.093	2.0115	1.9813	1.9671	1.9597	1.9568
872	2.3302	2.1846	2.0265	1.9468	1.9331	1.9166	1.9092	1.9064
312	2.2908	2.3086	2.1732	2.0883	2.0609	2.0437	2.0363	2.0335
1435	2.2685	2.2474	2.1133	2.0305	2.0121	2.0013	1.9961	1.9931
1200	2.2488	2.177	2.0335	1.9535	1.9323	1.9195	1.912	1.9104
644	2.2235	1.9948	1.8622	1.7903	1.7611	1.7464	1.7397	1.7378
57	2.1878	1.9864	1.8714	1.798	1.7697	1.7546	1.748	1.7455
454	2.1863	2.0452	1.8935	1.819	1.7904	1.7752	1.7685	1.7659
1375	2.1696	2.0482	1.9239	1.856	1.8471	1.8353	1.8285	1.8259
1498	2.1385	2.3533	2.2376	2.1635	2.1306	2.1124	2.1053	2.1022
481	2.1223	2.2027	2.0642	1.9855	1.9604	1.9438	1.9373	1.9354
627	2.1013	1.8785	1.754	1.6865	1.6682	1.6576	1.6519	1.6498
356	2.0917	1.9072	1.8612	1.791	1.7617	1.7468	1.7403	1.7383
1054	2.083	2.144	2.0058	1.9279	1.8984	1.8824	1.8757	1.8734
L-prolin	1.9659	1.8574	1.8416	1.7968	1.7673	1.7528	1.7557	1.7535
pantotenat	1.9533	1.7511	1.6446	1.5801	1.5557	1.5424	1.5369	1.5347
L-glutamin	1.8604	1.6744	1.6317	1.569	1.5444	1.5313	1.5253	1.5251
glicin	1.7608	1.62	1.6257	1.5775	1.581	1.5675	1.5686	1.5665
L-triptofan	1.7023	1.6003	1.6032	1.5473	1.5272	1.5221	1.5164	1.5147
L-citrulin	1.6401	1.4901	1.4235	1.3811	1.3596	1.3519	1.3507	1.35
L-karnitin	1.6158	1.4857	1.407	1.3519	1.3446	1.3346	1.3295	1.3275
L-arginin	1.5824	1.4224	1.3985	1.3436	1.3241	1.32	1.3149	1.3163
trans-4-hidroksi-L-prolin	1.3684	1.2222	1.1368	1.1094	1.1585	1.1491	1.1586	1.1573
orotat	1.245	1.3306	1.2449	1.1985	1.1958	1.1902	1.1983	1.1972
L-serin	1.2024	1.0816	1.0919	1.0559	1.0454	1.0368	1.0469	1.0463
β-alanin, L-alanin	1.1881	1.212	1.3675	1.3689	1.348	1.3379	1.3424	1.3419
citozin	1.1853	1.0737	0.99698	1.0109	0.99459	0.98609	0.99158	0.99108
cis-akonitat	1.1337	1.0123	0.95747	0.98596	0.98851	1.0019	1.0215	1.02
N-acetil-glutamin	1.1269	1.0239	1.0222	0.99815	0.98888	0.98095	0.99372	0.99968
malonat	1.1192	1.0044	0.9725	1.012	1.0083	1.0003	0.99654	0.99855
kreatinin	1.0832	0.97903	1.1513	1.1228	1.1105	1.146	1.1557	1.1542
inozin	1.0414	0.93599	0.92802	0.89419	0.87957	0.88158	0.88072	0.88153
(S)-malat	1.0156	1.0428	1.0852	1.045	1.0305	1.0217	1.0289	1.0274
citidin	1.0142	0.9301	0.86133	0.91942	0.91532	0.91124	0.92227	0.92104
kolin	0.99629	0.94147	0.8717	0.86036	0.85243	0.93566	0.93728	0.93683
L-fenilalanin	0.98296	1.1085	1.0329	1.0609	1.0541	1.0495	1.0522	1.0534
L-asparagin	0.908	0.88169	1.142	1.1286	1.1457	1.1413	1.1369	1.1356
L-metionin	0.86342	0.86937	1.1004	1.1415	1.1492	1.1396	1.1367	1.1353
L-kinurenin	0.68379	0.84334	0.78206	0.76538	0.80589	0.81639	0.81885	0.8191
5-oksoprolin	0.67071	0.84428	0.78185	0.78152	0.77101	0.76934	0.77674	0.77817
L-homoserin / L-treonin	0.63818	0.58438	0.70357	0.6963	0.69201	0.70117	0.71756	0.71654
N-acetil-neuraminat	0.56427	0.85708	0.79351	0.79014	0.77815	0.77156	0.78767	0.78743
betain	0.5226	0.47163	0.62616	0.65242	0.75875	0.75306	0.7715	0.77078
metil-malonat / sukcinat	0.46753	0.8949	0.83003	0.79904	0.86567	0.85831	0.85799	0.85674
taurin	0.42073	0.54111	0.63994	0.62197	0.64655	0.6411	0.64174	0.64119
L-glutamat	0.4153	0.76141	0.74578	0.77864	0.77995	0.77377	0.79498	0.79429
4-trimetil-amonij-butanoat	0.41057	0.45712	0.81102	0.79974	0.88399	0.87672	0.87345	0.87435
L-leucin	0.30237	0.45449	0.62687	0.62552	0.619	0.6137	0.63104	0.6321
L-valin	0.30111	0.30346	0.59709	0.6367	0.63429	0.62898	0.64805	0.64936
(R)-2-hidroksi-glutarat	0.166	0.16056	0.31224	0.30416	0.30088	0.30934	0.33749	0.34265
N-acetil-L-glutamat	0.059193	0.37017	0.3507	0.33694	0.40355	0.42376	0.50138	0.50183
N(pi)-metil-L-histidin	0.013385	0.26514	0.41056	0.50754	0.65715	0.652	0.67894	0.67916

Tablica XXVI. Analiza korelacije vrijednosti UPCR-a i metabolita
u serumu kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR<0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI-a s UPCR>0,5

	Korelacija	t-test	Vrijednost p	FDR
1006	0.81758	8.2792	1.1594E-09	1.0329E-06
444	-0.81634	-8.2415	1.2879E-09	1.0329E-06
872	0.7954	7.6523	6.7881E-09	3.6294E-06
312	0.78197	7.315	1.7891E-08	7.1744E-06
1435	0.77436	7.136	3.0063E-08	9.6441E-06
1200	0.76763	6.984	4.6831E-08	1.252E-05
644	-0.75899	-6.7972	8.0972E-08	1.8554E-05
57	-0.7468	-6.5477	1.6896E-07	3.1019E-05
454	0.74629	6.5376	1.7405E-07	3.1019E-05
1375	0.7406	6.4267	2.4172E-07	3.8771E-05
1498	0.72996	6.2275	4.3702E-07	6.3725E-05
481	0.72444	6.1278	5.8805E-07	7.8603E-05
627	-0.71728	-6.0024	8.5498E-07	0.00010549
356	-0.71401	-5.9464	1.0108E-06	0.0001158
1054	0.71104	5.8964	1.1737E-06	0.00012551
1566	0.70904	5.863	1.2971E-06	0.00013003
18	-0.7004	-5.7218	1.9796E-06	0.00018678
1067	-0.69803	-5.6841	2.216E-06	0.00018899
38	-0.69782	-5.6807	2.2387E-06	0.00018899
299	-0.69582	-5.6492	2.4606E-06	0.00019362
1016	-0.69519	-5.6393	2.5349E-06	0.00019362
818	0.68741	5.5189	3.6356E-06	0.00026507
73	-0.68442	-5.4738	4.1623E-06	0.00029028
399	0.68305	5.4531	4.4282E-06	0.00029595
967	-0.67421	-5.323	6.5381E-06	0.00040048
L-prolin	-0.67105	-5.2776	7.4902E-06	0.00040048
pantotenat	-0.66677	-5.2168	8.9863E-06	0.00046497
L-glutamin	-0.63504	-4.7935	3.1767E-05	0.00095776
glicin	-0.60104	-4.3851	0.00010604	0.0021806
L-triptofan	-0.58109	-4.1633	0.00020227	0.0033797
L-citrulin	-0.55984	-3.9397	0.0003848	0.0053209
L-karnitin	0.55155	3.8556	0.00048891	0.0062239
L-arginin	-0.54015	-3.7425	0.00067282	0.0078751
trans-4-hidroksi-L-prolin	-0.46711	-3.0804	0.004077	0.02334
orotat	0.42497	2.7375	0.0097771	0.0425
L-serin	-0.41043	-2.6244	0.012908	0.05091
β-alanin, L-alanin	-0.40556	-2.5871	0.014129	0.053449
citozin	-0.40462	-2.5799	0.014377	0.053855
cis-akonitat	-0.38701	-2.4473	0.019713	0.066848
N-acetil-glutamin	0.38468	2.43	0.020527	0.068596
malonat	0.38202	2.4104	0.021492	0.071225
kreatinin	-0.36976	-2.3205	0.026447	0.081735
inozin	-0.35549	-2.2177	0.033362	0.094713
(S)-malat	-0.34668	-2.1551	0.038321	0.10409
citidin	-0.34619	-2.1517	0.038612	0.10409
kolin	0.34009	2.1087	0.042414	0.11054
L-fenilalanin	0.33553	2.0769	0.045439	0.11606
L-asparagin	-0.30995	-1.9009	0.065821	0.14423
L-metionin	-0.29473	-1.7984	0.080994	0.16698
L-kinurenin	-0.23341	-1.3997	0.17067	0.27513
5-oksoprolin	0.22895	1.3714	0.17923	0.28464
L-homoserin / L-treonin	-0.21784	-1.3015	0.20184	0.3107
N-acetil-neuraminat	0.19261	1.1446	0.26039	0.37358
betain	-0.17839	-1.0571	0.2979	0.41157
metil-malonat / sukcinat	0.15959	0.94264	0.35251	0.46653
taurin	-0.14362	-0.84619	0.40336	0.52009
L-glutamat	0.14176	0.83505	0.40952	0.52493
4-trimetil-amonij-butanoat	-0.14015	-0.82534	0.41493	0.52798
L-leucin	-0.10322	-0.60508	0.54915	0.65247
L-valin	-0.10278	-0.60251	0.55083	0.65398
(R)-2-hidroksi-glutarat	0.056664	0.33094	0.74272	0.81319
N(pi)-metil-L-histidin	-0.0045691	-0.026642	0.9789	0.98939

Tablica XXVII. One-way ANOVA i *post-hoc* analiza mokraća kuja s piometrom, početkom AKI I, UPCR<0,5 i kuja s piometrom, početkom AKI I, UPCR>0,5

	Vrijednost F	Vrijednost p	-log10(p)	FDR	Fischerov LSD
196	50.726	1.1945E-10	9.9228	9.8885E-08	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
55	49.223	1.7197E-10	9.7645	9.8885E-08	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
797	38.979	2.6469E-09	8.5773	1.0146E-06	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
618	37.855	3.6843E-09	8.4336	1.0592E-06	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
989	35.288	8.0483E-09	8.0943	1.8511E-06	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
387	30.453	3.9239E-08	7.4063	7.5208E-06	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
644	29.442	5.5799E-08	7.2534	9.167E-06	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
391	28.322	8.3171E-08	7.08	1.1956E-05	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1036	27.723	1.0343E-07	6.9854	1.3216E-05	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
574	25.019	2.872E-07	6.5418	3.3028E-05	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
640	23.888	4.4912E-07	6.3476	4.6953E-05	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
117	23.087	6.2135E-07	6.2067	5.9546E-05	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
402	20.98	1.508E-06	5.8216	0.00012895	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1127	20.887	1.5698E-06	5.8041	0.00012895	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1028	20.505	1.8544E-06	5.7318	0.00014217	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1121	20.017	2.3001E-06	5.6382	0.00016127	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
67	19.877	2.4485E-06	5.6111	0.00016127	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
774	19.8	2.5337E-06	5.5962	0.00016127	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
483	19.688	2.6644E-06	5.5744	0.00016127	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
439	19.178	3.3542E-06	5.4744	0.0001739	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1038	19.15	3.3969E-06	5.4689	0.0001739	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
464	19.131	3.4271E-06	5.4651	0.0001739	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1109	19.086	3.4978E-06	5.4562	0.0001739	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
706	19.005	3.6292E-06	5.4402	0.0001739	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
463	18.888	3.829E-06	5.4169	0.00017613	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
445	18.468	4.6478E-06	5.3327	0.00020558	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
465	18.187	5.2977E-06	5.2759	0.00022564	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
484	18.039	5.6805E-06	5.2456	0.00023331	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
467	17.863	6.1696E-06	5.2097	0.00024466	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
388	17.741	6.5379E-06	5.1846	0.00024819	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
687	17.692	6.6904E-06	5.1745	0.00024819	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1065	17.149	8.6765E-06	5.0617	0.00031181	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
466	17.085	8.948E-06	5.0483	0.00031182	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
447	16.752	1.0524E-05	4.9778	0.00035595	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1143	16.587	1.1408E-05	4.9428	0.00035801	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
482	16.481	1.2019E-05	4.9201	0.00035801	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
28	16.468	1.2094E-05	4.9174	0.00035801	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
1128	16.377	1.2651E-05	4.8979	0.00035801	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
24	16.375	1.2666E-05	4.8974	0.00035801	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
480	16.362	1.2746E-05	4.8946	0.00035801	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
443	16.359	1.2764E-05	4.894	0.00035801	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
705	15.963	1.5544E-05	4.8084	0.00042562	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
69	15.258	2.2205E-05	4.6535	0.00058136	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
835	15.255	2.2243E-05	4.6528	0.00058136	CNTRL - PYO 1; CNTRL - PYO 2
594	14.951	2.6011E-05	4.5848	0.00066473	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
L-glutamat	14.86	2.7264E-05	4.5644	0.00067265	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
742	10.946	0.00023881	3.6219	0.0031567	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
cis-akonitat	10.214	0.00037111	3.4305	0.0044455	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL
743	9.1162	0.00073565	3.1333	0.00705	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
654	8.743	0.00093475	3.0293	0.0084595	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL; PYO 2 - PYO 1
D-glukonska kiselina	8.6046	0.0010225	2.9903	0.009045	PYO 1 - CNTRL; PYO 2 - CNTRL

Tablica XXVIII. VIP analiza za mokraću
kuja s piometrom na početku I stupnja AKI s UPCR<0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI s UPCR>0,5

	Komp. 1	Komp. 2	Komp. 3	Komp. 4	Komp. 5	Komp. 6	Komp. 7	Komp. 8
55	2.2449	1.9659	1.875	1.8249	1.7966	1.7913	1.7896	1.7894
618	2.199	2.0228	2.0409	1.9855	1.9531	1.9475	1.9458	1.9455
196	2.1312	2.0619	1.9363	1.9011	1.8705	1.8668	1.8648	1.8646
989	2.1091	1.9205	1.8039	1.768	1.7407	1.7356	1.7337	1.7335
391	2.0681	1.6366	1.547	1.5163	1.4937	1.4904	1.4891	1.4889
797	2.0435	1.9844	1.8683	1.8545	1.8268	1.8214	1.8194	1.8192
387	2.0386	1.7274	1.6286	1.6112	1.5949	1.5909	1.5898	1.5896
1036	1.9857	1.6888	1.6097	1.6071	1.5863	1.5825	1.5812	1.581
574	1.9678	1.7168	1.637	1.6285	1.6058	1.6019	1.6002	1.6001
644	1.9434	1.7503	1.6451	1.5984	1.5788	1.5775	1.5759	1.576
1038	1.9091	1.3992	1.3151	1.2939	1.276	1.2732	1.272	1.2719
1121	1.8949	1.5252	1.4417	1.4685	1.4439	1.44	1.4397	1.4396
388	1.8871	1.36	1.2768	1.2579	1.2385	1.2354	1.2341	1.234
640	1.8861	1.7329	1.6285	1.6699	1.6426	1.6377	1.6359	1.6358
483	1.8844	1.4262	1.3611	1.356	1.334	1.3304	1.329	1.329
L-glutamat	1.794	1.5462	1.4765	1.4348	1.4125	1.4117	1.4118	1.4116
D-glukonska kiselina	1.5499	1.2759	1.2348	1.1975	1.1804	1.1776	1.1792	1.1791
cis-akonitat	1.5244	1.1377	1.1769	1.1445	1.1254	1.1389	1.1393	1.1393
betain	1.2565	1.148	1.0888	1.0553	1.0377	1.0445	1.0438	1.0445
L-homoserin / L-treonin	1.2484	0.87087	0.92072	0.94442	0.93259	0.93046	0.93153	0.93289
alantoin	1.1179	0.70998	1.0748	1.0502	1.0326	1.0301	1.0291	1.0297
N-acetil-glutamin	1.0745	0.69489	0.69	0.70352	0.7218	0.71983	0.72059	0.72069
L-glutamin	0.89648	0.56994	0.54916	0.81739	0.80407	0.80218	0.80726	0.80753
kreatinin	0.77543	0.92854	0.92404	0.89573	0.88127	0.87872	0.87798	0.87787
D-galakatarat	0.42512	0.68857	0.89871	1.0157	1.0362	1.0571	1.0564	1.0563
N(pi)-metil-L-histidin	0.42107	1.4873	1.4876	1.4455	1.4729	1.4712	1.4707	1.4706

Tablica XXIX. Analiza korelacije vrijednosti UPCR i metabolita u mokraći
kuja s piometrom na početku I stupnja AKI s UPCR<0,5 i kuja s piometrom na početku I stupnja AKI s UPCR>0,5

	Korelacija	t-test	Vrijednost p	FDR
55	0.84962	9.254	1.0867E-10	1.2497E-07
618	0.83223	8.623	5.7624E-10	3.3134E-07
196	0.80658	7.838	4.918E-09	1.8852E-06
989	0.79821	7.612	9.2473E-09	2.6586E-06
391	0.78271	7.224	2.7681E-08	6.3667E-06
797	0.7734	7.009	5.1284E-08	9.5093E-06
387	0.77152	6.967	5.7882E-08	9.5093E-06
1036	0.75152	6.544	1.9636E-07	2.8227E-05
574	0.74474	6.411	2.8958E-07	3.7002E-05
644	0.7355	6.236	4.8247E-07	5.5484E-05
1038	0.72252	6.004	9.5465E-07	9.8758E-05
1121	0.71715	5.911	1.2524E-06	9.8758E-05
388	0.71422	5.862	1.4488E-06	9.8758E-05
640	0.71383	5.855	1.477E-06	9.8758E-05
483	0.71319	5.845	1.5239E-06	9.8758E-05
117	0.7109	5.807	1.7051E-06	9.8758E-05
445	0.71016	5.795	1.7671E-06	9.8758E-05
465	0.71002	5.792	1.7788E-06	9.8758E-05
439	0.70985	5.789	1.794E-06	9.8758E-05
484	0.70868	5.77	1.8987E-06	9.8758E-05
706	0.70823	5.763	1.9396E-06	9.8758E-05
1127	0.70821	5.763	1.9415E-06	9.8758E-05
467	0.70718	5.746	2.0408E-06	9.8758E-05
1109	0.70697	5.742	2.061E-06	9.8758E-05
464	0.70474	5.706	2.2924E-06	0.0001055
L-glutamat	0.67898	5.313	7.3293E-06	0.0002056
D-glukonska kiselina	0.58657	4.161	0.0002129	0.0020569
cis-akoničat	0.57692	4.058	0.0002857	0.0025803
betain	0.47555	3.105	0.0038872	0.019436
L-homoserin / L-treonin	0.47249	3.08	0.0041567	0.020414
alantoin	0.42307	2.682	0.011336	0.037677
N-acetil-glutamin	0.40668	2.557	0.015334	0.04512
L-glutamin	0.33929	2.072	0.046159	0.095301
kreatinin	0.29347	1.764	0.087069	0.14856
D-galaktoz	-0.16089	-0.936	0.35584	0.44547
N(pi)-metil-L-histidin	-0.15936	-0.927	0.3605	0.44846