Metabolomski pristupi u otkrivanju novih biomarkera i dubinska fenotipizacija u bubrežnim i srčanim bolestima u pasa

Rubić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:971002

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ivana Rubić

METABOLOMSKI PRISTUPI U OTKRIVANJU NOVIH BIOMARKERA I DUBINSKA FENOTIPIZACIJA U BUBREŽNIM I SRČANIM BOLESTIMA U PASA

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Vladimir Mrljak

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
Department of chemistry

Ivana Rubić

METABOLOMIC APPROACHES TO NOVEL BIOMARKER DISCOVERY AND DEEP PHENOTYPING IN RENAL AND CARDIAC DISEASES IN DOGS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Dr. Vladimir Mrljak, Professor

Zagreb, 2022.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za proteomiku, Klinika za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, pod vodstvom prof. dr. sc. Vladimira Mrljaka, u okviru programa „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ na natječajnom roku ESF-DOK-01-2018.

Velika hvala...

... mentoru prof. dr. sc. Vladimiru Mrljaku na velikom strpljenju, pomoći, susretljivosti, ljubaznosti i korisnim savjetima tijekom izrade doktorskog rada

... prof. dr. sc. Predragu Novaku na velikoj pomoći, susretljivosti, ljubaznosti, korisnim savjetima te prijateljskom odnosu tijekom izrade doktorskog rada

... prof. dr. sc. Richardu Burchmoreu i kolegama u Glasgow Polyomicsu na prenesenom znanju, stručnim i korisnim savjetima te pomoći kad god je trebala

... svima s Klinike za unutarnje bolesti na pomoći pri prikupljanju uzoraka, bez čega ne bi bilo moguće napraviti ovaj doktorski rad. Također, hvala i svim kolegama na poticaju, razgovorima, savjetima, druženju i pomoći u svakodnevnom radu

... dragim ljudima, koji su uvijek tu za mene, na razumijevanju, strpljenju i ohrabrenju

... posebna velika hvala najvećem učitelju, najboljem prijatelju i najjeftinijem terapeutu – mojoj majci. Ne postoje riječi kojima ti mogu dovoljno zahvaliti za svu ljubav i brigu. Hvala ti, mama, za sve, jer bez tebe ne bih bila ovdje gdje sada jesam

Sadržaj

SAŽETAK		*II*
ABSTRACT		*III*
§ 1.	*UVOD*	*1*
§ 2.	*LITERATURNI PREGLED*	*6*
2.1.	*Babezioza*	*6*
2.2.	*Idiopatska dilatacijska kardiomiopatija*	*11*
2.3.	*Metabolomika*	*13*
2.3.1	Spektrometrija masa	17
2.3.2	Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa	20
2.3.3	Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa	22
§ 3.	*EKSPERIMENTALNI DIO*	*25*
3.1.	*Kemikalije*	*25*
3.2.	*Instrumenti i ostala oprema*	*26*
3.3.	*Eksperimentalni dizajn*	*26*
3.4.	*Priprava i analiza uzoraka krvi*	*28*
3.5.	*Neciljana LC-MS-metabolomska analiza*	*29*
3.5.1.	Ekstrakcija metabolita iz seruma, plazme i urina pasa	29
3.5.2.	Analiza metabolita neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom	29
3.5.3.	Obrada podataka	31
3.6.	*Ciljana metabolomska analiza*	*32*
3.6.1.	Ekstrakcija metabolita iz seruma, plazme i urina pasa	32
3.6.2.	Analiza metabolita ciljanom metabolomskom analizom	33
3.6.3.	Obrada podataka	36
3.7.	*GC-MS-metabolomska analiza*	*36*
3.7.1.	Ekstrakcija metabolita iz uzoraka seruma i plazme	36
3.7.2.	Analiza metabolita GC-MS-metabolomskom analizom	36

3.7.3. Obrada podataka 37

3.8. Statistička obrada podataka 37

§ 4. REZULTATI 40

4.1. Istraživanje metabolita u serumu pasa invadiranih parazitom B. canis 40

4.1.1 Neciljana LC-MS-metabolomska analiza seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* 41

4.1.2 Ciljana LC-MS-metabolomska analiza seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* 46

4.1.3 GC-MS-metabolomska analiza seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* 49

4.1.4 Analiza glavnih komponenata seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* 52

4.1.5 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* 55

4.1.6 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* 59

4.1.7 Analiza metaboličkih puteva na temelju metabolita određenih u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* 63

4.2. Istraživanje metabolita u urinu pasa invadiranih parazitom B. canis 66

4.2.1 Biokemijski podatci o analiziranim uzorcima urina 66

4.2.2 Neciljana LC-MS-metabolomska analiza urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* 67

4.2.3 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu urina zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* 69

4.2.4 Analiza varijancije metaboloma urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa 72

4.2.5 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* 74

4.2.6 Ciljana LC-MS-metabolomska analiza urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* 76

4.2.7 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu urina zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* 76

4.2.8 Analiza varijancije metaboloma urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* 79

4.2.9 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* 79

4.2.10 Analiza metaboličkih puteva na temelju metabolita određenih u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis* 81

4.3. Istraživanje metabolita u plazmi pasa s iDCM-om 83

4.3.1 Neciljana LC-MS-metabolomska analiza plazme pasa s iDCM-om 84

4.3.2 Ciljana LC-MS-metabolomska analiza plazme pasa s iDCM-om 89

4.3.3 GC-MS-metabolomska analiza plazme pasa s iDCM-om 91

4.3.4 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om 93

4.3.5 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) plazme pasa s iDCM-om 97

4.3.6 Analiza metaboličkih puteva na temelju metabolita određenih u plazmi pasa s iDCM-om 101

§ 5. RASPRAVA 102

5.1 Istraživanje metaboloma seruma pasa invadiranih parazitom B. canis 103

5.2 Istraživanje metaboloma urina pasa invadiranih parazitom B. canis 108

5.3 Istraživanje metaboloma plazme pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom 114

§ 6. ZAKLJUČAK 120

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 122

§ 8. LITERATURNI IZVORI 124

§ 9. DODATAK IV

§ 10. ŽIVOTOPIS LXXXIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorski rad

SAŽETAK

METABOLOMSKI PRISTUPI U OTKRIVANJU NOVIH BIOMARKERA I DUBINSKA FENOTIPIZACIJA U BUBREŽNIM I SRČANIM BOLESTIMA U PASA

Ivana Rubić
Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Babezioza i dilatacijska kardiomiopatija važne su bolesti koje se nalaze u pasa, ali i ljudi. Jedna je od najčešćih komplikacija kod babezioze pasa uzrokovane protozoonom *Babesia canis* akutna ozljeda bubrega. Drugi je po učestalosti uzrok zatajenja srca u pasa idiopatska dilatacijska kardiomiopatija (iDCM) koja rezultira zatajenjem srca ili iznenadnom srčanom smrću zbog nastanaka aritmije. Svrha je istraživanja bila otkriti promjene u metabolomu seruma i urina pasa s promijenjenom funkcijom bubrega kod babezioze, te u metabolomu plazme pasa s iDCM-om u odnosu na zdrave pse.
U istraživanju su primijenjeni neciljani i ciljani metabolomski pristup upotrebom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa te metabolomska analiza temeljena na plinskoj kromatografiji spregnutoj sa spektrometrijom masa.
U metabolomu seruma i urina pasa s babeziozom otkrivene su promjene povezane s oksidacijskim stresom, upalnim odgovorom domaćina, hipoksijom, anemijom i energetskim metabolizmom. U istraživanju iDCM-a identificirane su promjene u metabolomu plazme pasa i poremećaji u metaboličkim putevima koji su uključeni u razvoj iDCM-a.

(LXXXVII + 149 stranica, 27 slika, 11 tablica, 302 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: babezioza/ idiopatska dilatacijska kardiomiopatija/ metabolomika/ plinska kromatografija/ tekućinska kromatografija/ spektrometrija masa

Mentor: prof. dr. sc. Vladimir Mrljak
Rad prihvaćen: 1. lipnja 2022.
Ocjenitelji: doc. dr. sc. Marko Močibob
prof. dr. sc. Vlasta Drevenkar
prof. dr. sc. Renata Barić Rafaj

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

METABOLOMIC APPROACHES TO NOVEL BIOMARKER DISCOVERY AND DEEP PHENOTYPING IN RENAL AND CARDIAC DISEASES IN DOGS

Ivana Rubić
Faculty of Veterinary Medicine, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatia

Babesiosis and dilated cardiomyopathy are important diseases in dogs and humans. Acute kidney injury is one of the most common complications in canine babesiosis caused with protozoa *Babesia canis*. The second most common cause of heart failure in dogs is idiopathic dilated cardiomyopathy (iDCM), which results in heart failure or sudden cardiac death due to arrhythmia. This study aimed to determine changes in the serum and urine metabolome of dogs with renal failure in babesiosis, and in the plasma metabolome of dogs with iDCM compared to healthy dogs.
In this study, we applied an untargeted and targeted metabolomics approach using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and gas chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics.
In the serum and urine samples of dogs with babesiosis were found differences associated with oxidative stress, inflammatory host response, hypoxia, anemia, and energy metabolism. We discovered changes in canine plasma metabolome and metabolic pathway disorders involved in the development of iDCM.

(LXXXVII + 149 pages, 27 figures, 11 tables, 302 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: babesiosis/ idiopathic dilated cardiomyopathy/ metabolomics/ gas chromatography/ liquid chromatography/ mass spectrometry

Supervisor: Dr. Vladimir Mrljak, Professor
Thesis accepted: 1th June 2022
Reviewers: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
Dr. Vlasta Drevenkar, Professor
Dr. Renata Barić Rafaj, Professor

§ 1. UVOD

Od pradavnih vremena pas je najbolji čovjekov prijatelj. Psi, kao i ljudi, obolijevaju od mnogih bolesti među kojima se ističu protozoalne bolesti i bolesti srca u pasa.

Babezioza pasa široko je rasprostranjena i važna protozoalna bolest diljem svijeta, koja je veliki problem u veterinarskoj medicini. Zbog svoje složene patogeneze i raznolike kliničke slike babezioza je velik izazov znanstvenicima u svijetu. Tomu pridonosi i patofiziološka sličnost s malarijom u ljudi. Posljednjih je desetak godina vidljiv znatan napredak, no i dalje postoji niz otvorenih pitanja na koje je potrebno odgovoriti.

Danas u svijetu postoji više od 100 vrsta babezija, međutim u Europi babeziozu pasa uzrokuju intraeritrocitni protozoalni paraziti, *Babesia canis*, *Babesia gibsoni* i *Babesia microti*-slična piroplazma.[1,2] Babezioza pasa uzrokovana protozoonom *Babesia canis* najčešća je babezija koja se javlja na području Hrvatske, a njezin je glavni prijenosnik krpelj, *Dermacentor reticulatus*.[3]

Brojna su istraživanja pokazala da se patogeneza babezioze zasniva na dva patofiziološka procesa – hemolizi i sistemskom upalnom odgovoru domaćina. Klinička slika jednostavnog oblika babezioze posljedica je hemolize, dok kompliciranа babezioza pasa nastaje zbog razvoja sindroma sistemskog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*, SIRS) te sindroma višestrukog zatajenja organa (engl. *Multiple Organ Disfunction Syndrome*, MODS).[4] Novija istraživanja upućuju na to da bi oba patofiziološka procesa mogla biti posljedica upalnog odgovora domaćina na uzročnika, posredovana citokinima, dušikovim oksidom, reaktivnim vrstama kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), eikozanoidima i čimbenicima aktivacije trombocita (engl. *Platelet Activating Factor*, PAF).[5,6]

Jedna je od najčešćih komplikacija sindroma višestrukog zatajenja organa akutna ozljeda bubrega (engl. *Acute Kidney Injury*, AKI). Naime, zbog upale stijenke krvne žile može

doći do prelaska tekućine iz intravaskularnog u ekstravaskularni prostor te razvoja relativne hemokoncentracije. Razvojem hemokoncentracije povećava se opasnost od razvoja akutne insuficijencije bubrega (engl. *Acute Renal Failure*, ARF) i posljedično akutne ozljede bubrega.[7] Dijagnostika akutne ozljede bubrega temelji se na akutnom porastu koncentracije ureje i kreatinina u serumu, nakon što se izgubi približno 65 % do 75 % funkcionalnih nefrona. Konvencionalni biomarkeri iz urina, poput bubrežnih cilindara i frakcijskog izlučivanja natrija, nisu osjetljivi niti specifični za rano prepoznavanje AKI-ja.[8] Kako krv i urin sadržavaju mnoštvo do sada neproučavanih i nepoznatih biomarkera, pojavila se potreba za istraživanjem metabolita koji bi uputili na raniju fazu oštećenja bubrega, što bi omogućilo precizniju i adekvatniju dijagnozu, prognozu i praćenje babezioze.

Oštećenje i posljedična promijenjena funkcija bubrega istodobno mogu uzrokovati promijenjenu funkciju srca jer srce i bubrezi djeluju zajedno kako bi regulirali krvni tlak, vaskularni ton, diurezu i održavali intravaskularnu homeostazu volumena. Stoga, bolesti srca i bubrega iznimno su uobičajene i one često koegzistiraju.

Idiopatska dilatacijska kardiomiopatija primarna je bolest miokarda obilježena sistoličkom disfunkcijom i ekscentričnom hipertrofijom ponajprije lijevog ventrikula, a u određenom broju slučajeva istodobno i desnog ventrikula.[9] Konačan je rezultat zatajenje srca ili iznenadna srčana smrt zbog nastanka aritmije.[10]

Najčešći klinički simptomi iDCM-a obuhvaćaju otežano disanje, nepodnošenje tjelesnog napora, opću slabost, gubitak tjelesne mase i sinkopu, odnosno iznenadnu srčanu smrt.[11] Pojava navedenih kliničkih simptoma posljedica je sistoličke disfunkcije, razvoja zatajenja srca praćenog pojavom edema pluća te pojave zloćudnih aritmija.[12] Trajanje kliničkih znakova prije pojave znakova bolesti obično je kratko, od tjedan do dva tjedna.[13,14] Prognoza bolesti uglavnom je nepovoljna. Zbog toga je otkrivanje iDCM-a u ranoj fazi, odnosno asimptomatskoj fazi, kao i pravodobno započinjanje terapije kako bi se napredovanje bolesti usporilo iznimno važno, i znatan je izazov veterinarima diljem svijeta.[15,16]

Procjena funkcije srca u bolesnika s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom temelji se prije svega na ehokardiografskom pregledu,[17] ali je moguće kontrolirati razinu srčanih biomarkera kao što su troponin I (cTnl) i N-terminalni pro B-tip natriuretski peptid (NT-proBNP).[18]

Zbog visoke učestalosti akutne ozljede bubrega i idiopatske dilatacijske kardiomiopatije teži se za otkrićem novih biomarkera koji bi pružili vrijedne informacije i omogućili prepoznavanje ranih stadija navedenih bolesti. Rane faze tih bolesti uglavnom su asimptomatske, pa je razvoj novih biomarkera iznimno važan u cilju bolje prevencije, rane dijagnostike i prikladnog liječenja.

Brojna su istraživanja provedena u veterinarskoj i humanoj medicini usredotočena na otkrivanje malih molekula metabolita u svrhu identifikacije biomarkera za otkrivanje bubrežnih i kardiovaskularnih bolesti. Metaboliti su male molekule male molekulske mase (M_r manje od $1{,}5 \times 10^3$), koje se kemijski transformiraju tijekom metabolizma i odraz su promjena u genomu, transkriptomu i proteomu.[19] Analiza metabolita pruža odraz biološkog sustava u stanju zdravlja i bolesti,[20] koji služi kao temelj za razumijevanje i bolesti i mehanizama njihova razvoja.

Metabolomika je jedan od najčešće primjenjivanih pristupa u području sistemske biologije koji omogućuje procjenu nepovoljnih učinaka induciranih različitim spojevima i uzročnicima, što dovodi do širokog spektra bioloških odgovora na individualnoj osnovi.[21] Prema metodologiji se metabolomika dijeli na dva pristupa: neciljani i ciljani pristup.[22,23]

Većina metabolomskih istraživanja za određivanje metabolita u složenim biološkim sustavima zahtijeva primjenu suvremenih i osjetljivih analitičkih tehnika. Najčešće korištene tehnike za analizu metaboloma uključuju spektroskopiju nuklearnom magnetskom rezonancijom (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) i spektrometriju masa (engl. *Mass Spectrometry*, MS).[24,25] Velika je pažnja, međutim, posvećena kromatografskim metodama spregnutim sa spektrometrijom masa. Poznato je da su plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) spregnute sa spektrometrijom masa (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS;

engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) dvije visoko osjetljive i komplementarne tehnike. Iako je LC-MS najpopularnija tehnika za primjenu u metabolomici zbog visoke osjetljivosti, rezolucije i ponovljivosti, tehnika GC-MS osigurava bolje odvajanje metabolita i izbjegavanje supresije signala iona, što je velik izazov u istraživanjima LC-MS-om.[20] S obzirom na to da se ove dvije tehnike međusobno nadopunjuju, njihovom se primjenom istražuje širok spektar metabolita.

Pretpostavlja se da postoje razlike u metabolomu seruma i urina pasa s poremećenom funkcijom bubrega kod babezioze, što bi moglo uputiti na promijenjenu funkciju bubrega. Rezultati metabolomske analize mogli bi pokazati korelaciju sa složenim molekulskim zbivanjima kod babezioze, kao što su oksidacijski stres, upalni odgovor domaćina, hipoksija, anemija i energetski metabolizam. Također, postoje razlike između metaboloma plazme pasa s dijagnosticiranom idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom i zdravih pasa koje mogu upućivati na sistemske promjene uzrokovane poremećajem srčane funkcije. Metabolomski pristup u istraživanju idiopatske dilatacijske kardiomiopatije mogao bi uputiti na promjene u koncentracijama metabolita srčanog mišića i poremećaje u metaboličkim putevima koji su uključeni u razvoj idiopatske dilatacijske kardiomiopatije.

Stoga su ciljevi doktorskog rada sljedeći:

1. Otkrivanje novih biomarkera s potencijalnim dijagnostičkim i/ili prognostičkim značajem za poremećaje rada bubrega i srca kod pasa, što bi omogućilo precizniju i adekvatniju dijagnozu, prognozu i praćenje ovih bolesti
2. Identifikacija novih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera za razumijevanje patofizioloških mehanizama kod babezioze i idiopatske dilatacijske kardiomiopatije
3. Provedba neciljane/ciljane metabolomske analize u serumu i urinu pasa s nekompliciranim i kompliciranim oblikom babezioze
4. Provedba neciljane/ciljane metabolomske analize u plazmi pasa s dijagnosticiranom idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom

5. Identifikacija biomarkera za razumijevanje patofizioloških mehanizama kod babezioze i idiopatske dilatacijske kardiomiopatije
6. Uvođenje metabolomike u veterinarsku medicinu u Hrvatskoj
7. Širenje inovativnih tehnologija na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Za ostvarivanje ciljeva primijenila su se dva metabolomska pristupa – neciljani i ciljani pristup te dvije analitičke tehnike – tekućinska kromatografija i plinska kromatografija spregnute sa spektrometrijom masa. Za obradu rezultata istraživanja koristili su se različiti bioinformatički i statistički alati.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Babezioza

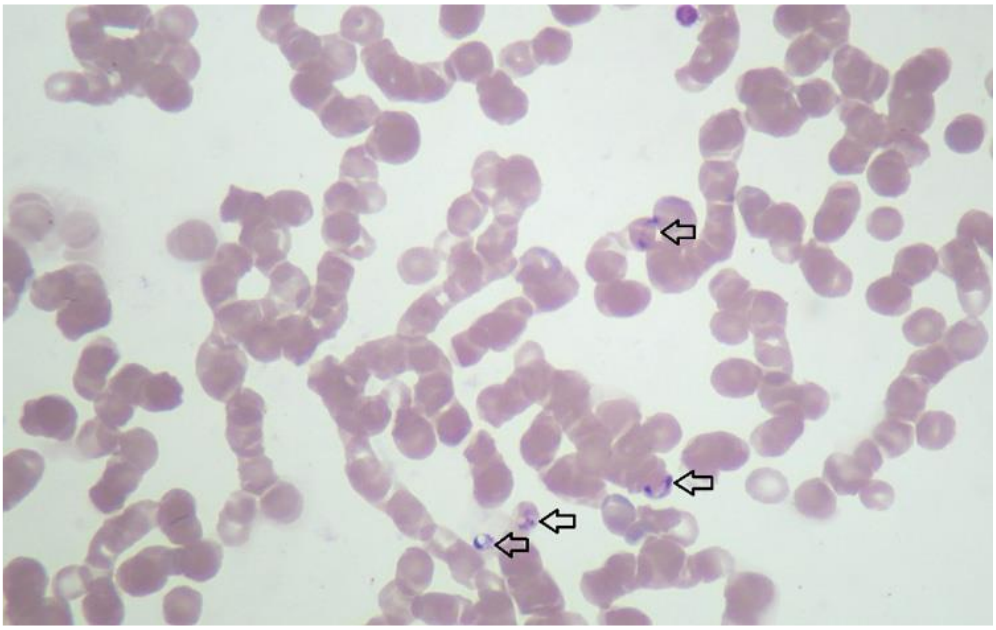
Babezioza je parazitska bolest uzrokovana intraeritrocitnim protozoalnim parazitima iz roda *Babesia*. Prenosi se slinom zaraženog krpelja. Uzročnici babezioze pasa mogu biti veliki i mali oblici parazita *Babesia* (*Babesia canis* (*B. canis*), *Babesia vogeli* (*B. vogeli*), *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*) i piroplazma slična parazitu *Babesia microti* (*B. microti-like piroplasm*)).[26] Za svaku se od navedenih vrsta razlikuje geografska rasprostranjenost, prijenos, klinički simptomi, patogenost, kao i liječenje i prognoza bolesti. Prema tome točno otkrivanje i prepoznavanje o kojoj se vrsti radi iznimno je važno za primjenu odgovarajuće terapije, praćenje i predviđanje ishoda bolesti.

Velika babezija dijeli se na tri različite vrste, a to su: *B. canis*, *B. rossi* i *B. vogeli*.[26] Babezioza pasa uzrokovana protozoonom *B. canis* najčešća je invazija pasa u pojedinim europskim regijama.[27] Osim pasa, može zaraziti različite domaće i divlje životinje, kao i ljude, te je globalni problem u veterinarskoj medicini.[28] Vrlo je čest uzrok pobola i smrtnosti pasa na teritoriju Hrvatske, posebice na području grada Zagreba.[27,29,30,31] Babezioza pasa pokazuje sezonski karakter i povezana je s aktivnostima krpelja uglavnom u rano proljeće i jesen,[32] zbog blagog i vlažnog vremena idealnog za krpelje.[33] Bolest se brzo širi i globalno je prisutna kao posljedica širenja staništa krpelja i veće mobilnosti životinja. Danas je poznato više od 100 različitih vrsta protozoa koji mogu invadirati eritrocite u njihovim domaćinima sisavcima.[34]

Sve vrste parazita iz roda *Babesia* prenose se slinom krpelja nakon uboda. Infektivni oblici parazita, sporozoiti, ubrizgavaju se u krvotok, invadiraju crvene krvne stanice u kojima se diferenciraju u sljedeći oblik – trofozoite. Nakon toga trofozoiti se umnažaju u merozoite koji uzrokuju destrukciju eritrocita. Ciklus se ponavlja invazijom novih eritrocita, koja se

prekida terapijom lijekovima i/ili dok reakcije imunosnog odgovora domaćina ne prekinu replikaciju parazita.[35]

Nakon što se pas invadira, počinje razdoblje inkubacije koje traje 4 do 21 dana. Bolest može biti asimptomatska (kronične invazije) ili s kliničkim simptomima, a psi mogu imati umjerenu do tešku kliničku sliku. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničkih simptoma i epidemiološke situacije, uz identifikaciju parazita u eritrocitima mikroskopskim pregledom preparata razmaza periferne krvi (**Slika 1**), što je brza, najzastupljenija i najednostavnija metoda za dijagnostiku babezioze. Prisutnost parazita u krvi kao i identifikacija vrste i podvrste babezija provodi se lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR).[2]



Slika 1. Protozooni *Babesia canis* u invadiranim eritrocitima domaćina otkriveni u tankom krvnom razmazu svjetlosnim mikroskopom. Strelice označuju protozoone. Preuzeto i prilagođeno iz: Bilić i suradnici 2018.[33]

Psima invadiranima parazitom *B. canis* kao početak terapije daje se jedna doza (6 mg/kg^{-1} tjelesne mase) lijeka imidokarb-dipropionata (Imizol, Shering-Plough, Newton, NJ, SAD). Ako se ne liječi, čest je letalni ishod.

Članovi roda *Babesia* obitavaju u eritrocitima domaćina, liziraju ih, što u konačnici rezultira progresivnom anemijom i različitim sindromima povezanima s invazijom babezija. Dva su glavna mehanizma zastupljena u patogenezi babezioze invazija i liza eritrocita te imunosni odgovor domaćina na prisutnost parazita. Klinički simptomi babezioze izrazito su varijabilni, bez obzira na to o kojoj se vrsti radi. Bolest se uobičajeno očituje povišenom tjelesnom temperaturom i razvojem anemije, a moguć je i razvoj leukopenije, neutropenije i trombocitopenije te aktivacija fibrinolitičkog sustava. Bolest utječe i na koagulacijski sustav, endotel i hemostatsku aktivnost, a zabilježeni su i oksidacijski stres i lipidna peroksidacija.

Prema kliničkoj se slici bolest može kvalificirati kao nekomplicirana i komplicirana.[36,37] Smatra se da su nekomplicirana i komplicirana invazija parazitom *B. canis* povezane s imunosnim odgovorom domaćina[6,30] na parazit koji dominira u patogenezi babezioze i uzrokuje nekontrolirani upalni odgovor domaćina s izraženim oslobađanjem upalnih medijatora.

Eikozanoidi i citokini jesu molekule koje se oslobađaju tijekom odgovora akutne faze i imaju ključnu ulogu u patofiziologiji sindroma sistemskog upalnog odgovora (SIRS).[38] Eikozanoidi su lipidni posrednici koji nastaju oksidacijom arahidonske kiseline i reguliraju imunosni odgovor i upalne reakcije, dok su citokini korisni za obranu domaćina, ali u slučaju prekomjernog nastajanja mogu dovesti do pretjeranog upalnog odgovora i oštećenja organa. Pretpostavlja se da je nekomplicirani oblik babezioze posljedica anemije uzrokovane hemolizom,[4] a tipični su klinički simptomi blijede sluznice, groznica, anoreksija, depresija, splenomegalija i drugi.[39]

S druge strane, klinička očitovanja kompliciranog oblika promjenjiva su i povezana s određenim komplikacijama koje se razvijaju. Glavne su posljedice kompliciranog oblika razvoj sindroma sistemskog upalnog odgovora (SIRS)[40] popraćenog sindromom višestrukog zatajenja organa (MODS).[4] U MODS-u su najčešće zastupljena sljedeća stanja: akutno zatajenje bubrega,

cerebralna babezioza, koagulopatija, ikterus i hepatopatija, imunoposredovana hemolitička anemija, perakutna babezioza, sindrom akutnog respiratornog distresa, hemokoncentracija te šok koji mogu dovesti i do uginuća životinje.[36,41] U istraživanjima provedenima u Hrvatskoj i u svijetu MODS je najčešća komplikacija bolesti, a najzastupljeniji poremećaj unutar nje čini akutna ozljeda bubrega (AKI).[42,43]

Akutna ozljeda bubrega najčešći je poremećaj kod babezioze pasa, koji uzrokuje azotemiju (porast koncentracije neproteinskog dušika u krvi) i uremiju (sindrom izražen pri zatajivanju bubrega).[44,45] Zbog anemije i sistemske hipotenzije dolazi do hipoksije bubrega koja uzrokuje oštećenje bubrega kod babezioze.[46,47] Osim anemije i hipotenzije, jednim od uzroka oštećenja bubrega smatra se i hipovolemija te prisutnost methemoglobina u urinu.[48,49] Oštećenje bubrega rezultira tamnim obojenjem urina.[50] Uobičajeno se dijagnosticira prema akutnom porastu koncentracije kreatinina u serumu, što upućuje na renalnu azotemiju, te prema omjeru proteina i kreatinina u urinu, što upućuje na proteinuriju. Do znatne proteinurije dolazi kad je omjer proteina i kreatinina u urinu veći od 0,5.[51]

Azotemija i poremećena sposobnost koncentracije urina pojavljuju se tek nakon što se izgubi približno 65 % do 75 % funkcionalnih nefrona, kad bolest već uznapreduje, odnosno kad se pojavi veliko oštećenje bubrega. Iako renalne rezerve, pojačana tubularna sekrecija kreatinina ili drugi čimbenici uzrokuju minimalne ili nikakve promjene u koncentraciji kreatinina, i dalje su to simptomi koji upućuju na znatno oštećenje rada bubrega. Također, prema istraživanju De Scallya i suradnika koncentracije uree i kreatinina nepredvidivo osciliraju i ne odražavaju točno stupanj azotemije u bolesnih pasa, pa nisu idealni analiti za otkrivanje promijenjene funkcije u radu bubrega kod babezioze.[52] Prisutnost cilindara iz bubrega u preparatima sedimenta urina i frakcijsko izlučivanje natrija dosad su korišteni biomarkeri za dijagnostiku oštećenja bubrega, ali oni nisu dovoljno osjetljivi ni specifični za rano prepoznavanje akutne ozljede bubrega.[8] Budući da navedeni analiti ne definiraju stupanj i mjesto oštećenja bubrega, rano dijagnosticiranje ove bolesti pomoću novih biomarkera za određivanje rane faze bolesti i specifičnog mjesta promijenjene funkcije bubrega iznimno je

važno za veterinarsku medicinu. Otkriće i identifikacija osjetljivijih biomarkera nužni su za raniju dijagnostiku promijenjene funkcije bubrega i za stjecanje uvida u stupanj reverzibilnosti bubrežnog oštećenja nakon invazije parazitom *B. canis* jer u konačnici može voditi prema boljem i učinkovitijem liječenju. Invazivnom tehnikom biopsije bubrega uspostavlja se histološka dijagnoza, no teži se razvoju neinvazivnih metoda.

U veterinarskoj je medicini metabolomski pristup bio odlučujući za identifikaciju biomarkera u otkrivanju bubrežnih bolesti. Objavljena su brojna istraživanja primjenom tehnika LC-MS ili GC-MS za analizu akutnog oštećenja bubrega metabolomskim metodama. Tako su Sun i suradnici pomoću tehnika spregnutog sustava tekućinske kromatografije – kvadrupola i analizatora masa koji mjeri vrijeme leta istražili serum zdravih pacijenata i bolesnika s akutnim oštećenjem bubrega.[53] Ustanovljene su povišene koncentracije acil-karnitina i nekih aminokiselina, a snižene koncentracije arginina i lizofosfatidilkolina u serumu pacijenata s akutnim oštećenjem bubrega u odnosu na zdrave pacijente. Kloeti i suradnici su tehnikom LC-MS identificirali biomarkere urina koji razlikuju progresivni od neprogresivnog oblika albuminurije u ljudi.[54] Najvećoj razlici progresivnog od neprogresivnog oblika albuminurije u ljudi pridonijeli su acil-karnitini, acil-glicini i metaboliti povezani s metabolizmom triptofana. Diercksa i suradnici primjenom spregnutog sustava GC-MS uz analizator masa koji mjeri vrijeme leta, u uzorcima urina otkrili su tri diskriminatorna metabolita (taurin, sumporna kiselina i šećer aldoheksoza) u skupini bolesnika s akutnim oštećenjem bubrega u usporedbi sa zdravim pacijentima.[55] Ferlizza i suradnici ustvrdili su da se primjenom metabolomskih metoda može steći uvid u molekulske promjene u metabolomu urina pasa s kroničnom bubrežnom bolešću.[56] Autori su sugerirali da su uromodulin, trigonelin i karnozin potencijalni biomarkeri za kroničnu bolest bubrega u pasa.

2.2. Idiopatska dilatacijska kardiomiopatija

Drugi je po učestalosti uzrok zatajenja srca u pasa idiopatska dilatacijska kardiomiopatija (engl. *Idiopatic Dilated Cardiomyopathy*, iDCM) koja se smatra glavnim uzrokom pobola i smrtnosti u velikih i gorostasih pasmina pasa. Idiopatska dilatacijska kardiomiopatija pasa bolest je nepoznata uzroka s lošom prognozom. Patološki mehanizmi koji uzrokuju razvoj iDCM-a još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, odnosno točan uzrok i dalje je nepoznat. Najčešće obolijevaju psi srednje do starije dobi, mužjaci češće od ženki.[57] iDCM nalazimo u ljudi, pri čemu uglavnom pogađa mlade i odrasle ljude, što za posljedicu može imati transplantaciju srca u mladoj dobi.[10,12]

Iako je bolest nepoznata uzroka, smatra se da različiti čimbenici mogu pridonijeti njezinu razvoju, primjerice genetika, nutritivni nedostatci, metabolički poremećaji, abnormalnosti imunosnog sustava, zarazne bolesti ili intoksikacije.[11,58] Progresija iDCM-a izrazito je varijabilna, kao što su i klinički simptomi raznoliki, a dugi asimptomatski stadij otežava vlasniku prepoznavanje bolesti. Od pojave prvih promjena u miokardu do razvoja zatajenja srca obično prođe između dvije do tri, katkad i više godina.[11] Nažalost, klinička slika i prognoza kliničkog oblika iDCM-a za oboljele pacijente vrlo je varijabilna i loša. Prognoza bolesti uglavnom je nepovoljna. Prosječno je preživljenje od šest do devet mjeseci, naime oko 50 % pasa oboljelih od simptomatskog oblika iDCM-a ugine unutar tri mjeseca, dok ih 20 % preživi dvije godine.

Procjena funkcije srca u bolesnika s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom temelji se na ehokardiografskom pregledu,[17] a za potpunu obradu provode se radiografija i elektrokardiografija. Dodatno je moguće učiniti genetske pretrage te kontrolirati razinu srčanih biomarkera kao što su troponin I (cTnl) i N-terminalni pro B-tip natriuretski peptid (NT-proBNP).[18] Trenutačan je standard probira u pasmina pasa s povećanim rizikom od razvoja iDCM-a (npr. dobermani, njemačke doge, njufaundlenderi) kombinacija ehokardiografske i elektrokardiografske pretrage (najbolje 24-satne elektrokardiografije) te određivanja razine spomenutih biomarkera. Važno je pritom naglasiti da ehokardiografska pretraga, kao i

radiografska te elektrokardiografska pretraga, nisu uvijek dostupne, a razina srčanih biomarkera može biti promijenjena i u slučaju ekstrakardijalnih bolesti. Zbog toga je iznimno važno otkrivanje srčanih biomarkera koji bi bili specifični za asimptomatsku fazu bolesti, što bi utjecalo i na napredovanje bolesti, ali i na probir pasa koji se koriste u uzgoju, s obzirom na to da se za iDCM smatra da je nasljedna srčana bolest.

Liječenje oboljelih pacijenata i odabir odgovarajuće terapije i vrste lijekova ovise o stanju pacijenta, a provodi se kombiniranom medikamentnom terapijom. Tako se već u asimptomatskih pasa sa sistoličkom disfunkcijom preporučuje primjena inodilatatora pimobendana, dok se u slučaju razvoja zatajenja srca uz pimobendan primjenjuju diuretici i inhibitori konvertaze angiotenzina. U slučajevima hemodinamički značajnih aritmija primjenjuju se antiaritmici.

Smatra se da su vjerojatni uzroci promijenjene funkcije srca kod iDCM-a promjene u razinama metabolita srčanog mišića i poremećaji u metaboličkim putevima koji su uključeni u razvoj iDCM-a. Primjenom metabolomike i metabolomskih pristupa u istraživanju molekulskih procesa zaslužnih za razvoj srčanih bolesti mogu se otkriti metaboliti uključeni u bolesti srca i pružiti vrijedne informacije koje će pomoći u identifikaciji ranih oblika kardiovaskularnih bolesti.[19,59]

Brojna su istraživanja u humanoj medicini provedena primjenom metabolomskih metoda za otkrivanje malih molekula metabolita koji bi bili biomarkeri za kardiovaskularne bolesti. Tako su Shah i suradnici upotrebom LC-MS-a generirali osnovni metabolomski profil u bolesnika s rizikom od koronarne arterijske bolesti.[60] Wang i suradnici primijenili su metabolomsku metodu za identifikaciju metabolita kao markera za predviđanje kardiovaskularnih bolesti.[61] Dunn i suradnici primjenom tehnike GC-MS proučavali su metabolički profil u 52 pacijenta sa sistoličkim zatajenjem srca.[62]

U posljednjih su nekoliko godina razvijeni modeli kardiovaskularnih bolesti na životinjama, slični dilatacijskoj kardiomiopatiji u ljudi, koji su vrlo korisni u istraživanju patogenih mehanizama.[63] Istraživanjem Lia i suradnika identificirani su metaboliti u serumu

pasa s degenerativnom bolesti mitralnog zaliska pomoću tehnika GC-MS ili LC-MS.[64] Otkriveni metaboliti znatno su pridonijeli razlikovanju zdravih pasa i pasa s degenerativnom bolesti mitralnog zalistka prema promjenama u energetskom metabolizmu masti i glukoze, razvoju oksidacijskog stresa kao i promjenama u drugim metaboličkim putevima.

Metabolomska istraživanja provedena su i za dijagnosticiranje dilatacijske kardiomiopatije. Alexander i suradnici proveli su metabolomsku analizu plazme u 39 bolesnika s dijagnosticiranom dilatacijskom kardiomiopatijom i identificirali 451 metabolit.[65] Zabilježena je povišena koncentracija za 41 metabolit, i značajno snižena koncentracija 20 prisutnih metabolita. West i suradnici ciljanom su metabolomskom analizom pomoću tandemne spektrometrije masa na modelu miša s dilatacijskom kardiomiopatijom kvantificirali više od 130 metabolita i otkrili metaboličke puteve relevantne za metabolizam srca.[66] Zabilježeno je smanjenje energetskog metabolizma u srcu s dilatacijskim poremećajem i jača degeneracija miofibrila i kolagena. Zhao i suradnici su, međutim, neciljanim metabolomskim pristupom generirali metabolomski profil plazme pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom i ustvrdili da su metabolizam glicerofosfolipida i metabolizam α-linolenske kiseline značajno promijenjeni.[67] Također, pokazano je da su biopterin, *O*-acetil-karnitin i sfingomijelin metaboliti koji pridonose razlici između pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom i zdravih kontrola.

2.3. Metabolomika

Nakon razvoja genomike, transkriptomike i proteomike, pojava nove inovativne tehnologije – „omike“, kao što je metabolomika, temelji se na metabolitima koji su konačni pokazatelji fenotipa organizma i koja omogućuje strategije za proučavanje metabolomskih profila u danom biološkom okruženju kao i identifikaciju promijenjenih metabolita među tisućama malih molekula prisutnih u biološkim tekućinama i tkivima.[68] Razvoj inovativnih postgenomskih tehnologija omogućio je identifikaciju specifičnih i osjetljivih biomarkera među tisućama molekula prisutnih u biološkim sustavima. To je dovelo do brzog rasta i napretka u pronalaženju

biomarkera u skupini spojeva koje nazivamo metabolitima. Metabolomika omogućuje identifikaciju promijenjenih metabolita među tisućama malih molekula prisutnih u biološkim tekućinama i tkivima. Analize metabolita vrlo su osjetljiva mjerenja biološkog statusa o stanju zdravlja i bolesti,[20] jer se promjene na razini metabolita u različitim bolestima često pojavljuju u biotekućinama i prije pojave kliničkih simptoma te ih je lakše povezati s fenotipom.[69,70]

Specifični metaboliti koji se otkriju različitim istraživanjima mogu biti biomarkeri za precizniju dijagnostiku i prognozu bolesti, kao i za praćenje učinka liječenja. Biomarkeri su indikatori bioloških procesa i patoloških stanja, koji pružaju uvid u precizne karakteristike biološkog stanja u zdravlju i bolesti.[71] Posebno su važni u istraživanjima u području humane medicine i veterinarske medicine, zbog važnosti u karakterizaciji bolesti ljudi i životinja te razumijevanju bioloških sustava kao i mehanizama razvoja bolesti. Za biomarkere je specifično da mogu imati velik potencijal za identifikaciju bolesti na individualnoj razini, odnosno za specifičnu vrstu životinja, kao i za dijagnostiku bolesti u njezinoj ranoj fazi, prije pojave kliničkih simptoma i njezina razvoja.

Metabolomika je jedan od najčešće primjenjivanih pristupa u području sistemske biologije za identifikaciju i kvantifikaciju metabolita prisutnih u biološkom sustavu koji čine metabolom.[21,72] Iako se ovim pristupom može postići veća pokrivenost metaboloma, *shotgun*-metabolomika gotovo nikad nije kompletna i potpuna *-omika* tehnologija, kojom se ne otkrivaju „svi“ metaboliti unutar biološkog sustava. Metaboliti posjeduju različita kemijska i fizikalna svojstva, te je potrebno primijeniti više analitičkih metoda i tehnika za stjecanje sveobuhvatnog profila metabolita pojedinog uzorka.

Ovom tehnikom, koja se vrlo brzo razvija u humanoj medicini, ali utječe i na sva područja veterinarske medicine, moguće je identificirati specifične metabolite/biomarkere koji mogu biti povezani s određenim bolestima.[73] Istodobnom analizom različitih bioloških materijala može se dobiti uvid u globalno stanje bioloških sustava zahvaljujući širokom spektru dobivenih informacija.[74]

Za izvođenje metabolomskih analiza dva su glavna analitička pristupa: neciljani i ciljani pristup.[22,68,69] Neciljani pristup, odnosno neciljana metabolomika pruža pregled cjelokupnog metaboloma prisutnog u stanicama, biotekućinama ili tkivima. Usredotočen je na otkrivanje i relativnu kvantifikaciju širokog spektra metabolita (aminokiseline, šećeri, lipidi, žučne kiseline) i spojeva od potencijalnog interesa u uzorku, uključujući i spojeve nepoznatih struktura. Takvim se pristupom mogu uspoređivati metabolomski profili između istraživanih uzoraka s ciljem otkrića promjena u odgovoru na neke unutarnje ili vanjske čimbenike (kao što su bolest, prehrana i terapija lijekovima) pružajući samo njihovu relativnu kvantifikaciju. S druge strane, ciljani pristup, odnosno ciljana metabolomika identificira i kvantificira obilje unaprijed odabranih definiranih kategorija poznatih, kemijski karakteriziranih i biokemijski označenih metabolita unutar uzorka.

U metabolomskim eksperimentima preciznost, točnost i ponovljivost rezultata ovise o vremenu i načinu priprave uzoraka, o dnevnim i prehrambenim navikama domaćina kao i o pohranjivanju i ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka. Priprava uzoraka najčešće se provodi primijenjenom metodom polarne/nepolarne ekstrakcije i fizikalno-kemijskim razbijanjem stanica, uklanjanjem staničnog taloga centrifugiranjem i raspodjelom metabolita u polarnija (metanol/voda) i nepolarnija (kloroform) otapala. Metaboliti se prirodno izlučuju u ekstracelularni supernatant i analiziraju.

Krv i urin lako su dostupni uzorci za analizu jer sadržavaju mnoštvo do sada neproučavanih i nepoznatih biomarkera koji mogu odražavati fiziološke i/ili patofiziološke procese koji se pojavljuju unutar organizma. Prikladni su i poželjni biološki materijali jer pružaju osnovu za razumijevanje bioloških promjena koje se pojavljuju u domaćinu tijekom razvoja kardiovaskularnih bolesti ili babezioze. Prednosti krvi kao uzorka za metabolomsku analizu jesu jednostavne metode predobrade i minimalno invazivno prikupljanje.[75] S druge strane, glavni su analitički izazovi epruvete za sakupljanje, hemoliza, odlaganje/stajanje na sobnoj temperaturi i ciklusi zamrzavanja i odmrzavanja.[75]

Urin je pogodan biološki uzorak za metabolomska istraživanja zbog neinvazivnog i jednostavnog prikupljanja, bogatstva metabolita i sposobnosti da reflektira metaboličke poremećaje.[76] Ograničenja korištenja urina kao uzorka uključuju velike varijacije u ionskoj jakosti, pH, osmolarnost i volumen urina, golem dinamički raspon koncentracija metabolita i iznimnu raznolikost kemijskih klasa u urinu. Zbog velikih varijacija u volumenu urina provodi se normalizacija koncentracije metabolita pomoću koncentracije kreatinina, specifične gravitacije i osmolarnosti.[70,77]

Babezioza i malarija uzrokovana parazitom *Plasmodium falciparum* imaju mnogo sličnosti, i u dijagnostici i u karakterističnim promjenama u funkciji imunosnog sustava,[78,79] a njihovi su upalni mehanizmi slični onima u uvjetima sepse, pa se babezioza smatra oblikom „protozoalne sepse". Prema tome, različiti patofiziološki mehanizmi u različitim bolestima mogu imati sličnosti u malariji, babeziozi i sepsi.[4] Metabolomska analiza u malariji relativno je nova i još uvijek nedovoljno istražena, ali prethodna istraživanja domaćina zaraženog parazitima malarije otkrila su važne metaboličke puteve parazita[80,81] i promjene u razinama aminokiselina, lipida, masnih kiselina, šećera i metabolita hema.[82] Poznato je da je babezioza protozoalna bolest, pa primjena metabolomskih istraživanja u parazitologiji može biti obećavajući alat za stjecanje znanja i produbljivanje razumijevanja metabolizma parazita kao i interakcija između domaćina i parazita.[83] Važno je istaknuti da su prethodna istraživanja pokazala da je metabolomika koristan alat u analizi lišmanije,[84,85] tripanosome[86,87] i plazmodija.[88,89]

Prethodna su istraživanja pokazala da se metaboliti mogu mijenjati u različitim stanjima bolesti i nizu fizioloških stanja i egzogenih čimbenika.[90,91] Primjena metabolomike u istraživanju pasa izaziva sve veći interes, što je dokazano dosadašnjim istraživanjima različitih bolesti, kao što su bolesti srca, dijabetes, hipotireoza, hernija intervertebralnog diska, kronična bolest bubrega, upalne bolesti i druge.[56,92,93,94,95] Također, pokazalo se da je serum pasa prikladan uzorak za metabolomsku analizu malignih bolesti, crijevne disbioze, dijabetesa melitusa i drugih.[96,97,98] Metabolomska istraživanja u pasa, osim što mogu poboljšati

dijagnostiku i liječenje, pomažu i u proučavanju bolesti u ljudi zbog mnogih sličnosti s bolestima u ljudi.[99-102]

Osim u istraživanju pasa, metabolomska su istraživanja provedena i na drugim životinjama, kao što su krave,[103] ovce,[104] miševi,[105] štakori[106] i goveda.[107] Iako su istraživanja metabolomike pasa u veterinarskoj medicini novo područje i pobuđuju sve veći interes, još su uvijek nedovoljna i u povojima u odnosu na istraživanja u humanoj medicini.[108]

Zbog velikih varijacija u kemijskim i fizikalnim svojstvima metabolita za stjecanje sveobuhvatnijeg i točnijeg metabolomskog profila pojedinog uzorka potrebna je integrativna implementacija dvaju ili više pristupa i analitičkih tehnika.[72] Prema tome, istraživanje tisuća metabolita prisutnih u složenim biološkim sustavima i identifikacija potencijalnih biomarkera zahtijevaju napredne i osjetljive analitičke tehnike. Kombinacija dviju tehnika pruža uvid u složeni biološki sustav i dovodi do poboljšanja točne, precizne i potpune identifikacije metabolita povezanih s fenotipom.[109]

2.3.1 Spektrometrija masa

Osnovna analitička tehnika u metabolomici za analizu metaboloma jest spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije, koja pruža brzu, neinvazivnu metodu visoke propusnosti koja zahtijeva minimalnu pripravu uzorka. No sve je veća pažnja usmjerena na vrlo osjetljivu tehniku analize spektrometrijom masa koja detektira, kvantificira i razjašnjava strukture više od nekoliko stotina metabolita u jednom mjerenju.[72,110] Osjetljivost i točnost detekcije malih molekula spektrometrijom masa ovise o eksperimentalnim uvjetima i postavkama instrumenta, a uključuju ekstrakciju metabolita, razdvajanje, ionizaciju (i eventualno supresiju iona) i detekciju. S obzirom na izbor ionizatora, analizatora i detektora te kromatografskih tehnika, mogućnosti izvedbe istraživanja su mnogobrojne.

Spektrometrija masa jest instrumentna tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a potom se nastali ioni razdvajaju i detektiraju prema omjerima njihove mase i naboja (engl. *Mass-To-Charge Ratio, m/z*).[111] Glavni dijelovi spektrometra masa uključuju ionski izvor,

analizator masa i detektor.[112] Spektrometri masa rade tako da se uzorak sustavom za uvođenje uzorka uvede u ionizacijsku komoru (ionski izvor) u kojoj se zbiva ionizacija. U ionizacijskoj komori molekule prelaze u plinovito stanje i ioniziraju se, a potom nastali ioni putuju u analizator masa gdje se odjeljuju prema njihovim vrijednostima *m/z* u vremenu ili prostoru. Na kraju se odijeljeni ioni usmjeruju prema detektoru koji bilježi njihov broj pri svakoj vrijednosti *m/z*. Nakon detekcije signal se računalno obrađuje, što u konačnici rezultira spektrom masa.[113]

Zbog kompleksnosti bioloških uzoraka često je prije analize MS-om potrebno razdvojiti metabolite od interesa. Stoga je povezivanje kromatografskih analitičkih tehnika sa spektrometrom masa vrlo učinkoviti alat za analizu malih molekula. Glavne tehnike spregnute sa spektrometrijom masa uključuju tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, plinsku kromatografiju i kapilarnu elektroforezu. Među tri navedene metode odvajanja najšire se primjenjuju LC i GC jer su dvije vrlo osjetljive i komplementarne tehnike. Vrsta i broj metabolita koji se mogu istražiti objema tehnikama razlikuju se. GC-MS-om postiže se bolje odvajanje metabolita od LC-a i izbjegava supresija signala iona, što je velik izazov u eksperimentima LC-MS-om.[99] Također, bolja je metoda za detekciju i identifikaciju spojeva male molekulske mase, kao što su aminokiseline, masne kiseline i ugljikohidrati. Ograničavajuća je okolnost to što obično zahtijeva kemijsku derivatizaciju metaboličkih vrsta prije analize GC-MS-om.

S druge strane, najpopularnija je tehnika za metabolomska istraživanja LC-MS zbog visoke osjetljivosti, selektivnosti i ponovljivosti. [114,115] Prikladna je za detekciju i identifikaciju lipida i analizu širokog raspona metabolita, od polarnijih (hidrofilnih) do nepolarnijih (hidrofobnih) metabolita. Kromatografija obrnutih faza uobičajeno se primjenjuje u odvajanju nepolarnih do slabo polarnih molekula,[23] dok tekućinska kromatografija temeljena na hidrofilnim interakcijama (engl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) postaje analitički alat za razdvajanje jako do slabo polarnih metabolita.[116]

Ionizacija je jedan od ključnih koraka za analizu metabolita spektrometrijom masa jer o njoj ovisi sposobnost za otkrivanje i kvantificiranje metabolita. Najčešće metode ionizacije za

metabolomska istraživanja spektrometrijom masa jesu ionizacija elektroraspršenjem i ionizacija elektronima.

Ionizacija elektroraspršenjem najčešći je način ionizacije analita u spregnutim sustavima tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, pogodan za analizu nehlapljivih i termički nestabilnih spojeva.[111] Analit je najčešće pomiješan sa smjesom organskog otapala, vode, trifluoroctene ili mravlje kiseline. Ionizira se direktno iz otopine, pri čemu nastaju višestruko pozitivno ili višestruko negativno nabijeni ioni, ovisno o dodatku ili gubitku protona. Postupak ionizacije zbiva se pri atmosferskom tlaku pod utjecajem snažnog električnog polja koje se primjenjuje na ionizacijsku iglu od nehrđajućeg čelika kroz koju, odgovarajućim protokom, prolazi tekućina pomiješana s uzorkom. Djelovanjem snažnog električnog polja nastaje razlika u električnom potencijalu između ionizacijske igle i elektrode, pri čemu se na izlazu iz igle nakuplja naboj na površini kapljica tekućine. Upotrebom inertnog plina dušika koji pospješuje otparavanje otapala i sprječava ulazak nenabijenih sastojaka u ionski izvor, tekućina se raspršuje u visokonabijene kapljice, pri čemu se ioni analita oslobođeni otapala uvode u analizator masa. Ovaj oblik ionizacije omogućuje analizu malih i velikih molekula, nenabijenih i ionskih spojeva te direktno povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Ionizacija elektroraspršenjem služi kao međuspoj u spregnutim sustavima LC-MS jer je prikladna za male i stabilne protoke pokretne faze, od 1 μL min^{-1} do 10 μL min^{-1}, koji ne narušavaju potreban vakuum u spektrometru masa. Ionizacijom elektroraspršenjem mogu nastati višestruko pozitivno i višestruko negativno nabijeni ioni. Analizom uz pozitivnu i negativnu ionizaciju moguće je detektirati veći broj metabolita pa se postiže veća pokrivenost metaboloma. Nedostatak je ove ionizacijske tehnike štetan učinak soli na učinkovitost, pa su kromatografske metode ograničene na korištenje hlapljivih pufera kao što je amonijev acetat ili amonijev formijat.

U metabolomskim je istraživanjima za detekciju metabolita potrebno primijeniti detektor visoke razlučivosti i osjetljivosti. Analizatori masa u MS-u uključuju kvadrupol, linearnu ionsku stupicu, kvadrupolnu ionsku stupicu, analizator koji mjeri vrijeme leta, Fourier-

transformiranu spektrometriju masa ionsko-ciklotronske rezonancije i Orbitrap. Prednost analizatora masa koji mjeri vrijeme leta, Fourier-transformirane spektrometrije masa ionsko-ciklotronske rezonancije i Orbitrapa u odnosu na ostale jest visoka razlučivost masa. Analizatori masa za tandemnu spektrometriju masa (MS/MS) uključuju trostruki kvadrupol-ionsku stupicu, trostruki kvadrupol, kvadrupol-analizator koji mjeri vrijeme leta i kvadrupol-linearnu ionsku stupicu-Orbitrap. Zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti analizatori kao što su trostruki kvadrupol i trostruki kvadrupol-ionska stupica najuobičajeniji su za ciljane metabolomske analize vezanim sustavom LC-MS, dok su kombinacije kvadrupol-analizator koji mjeri vrijeme leta, kvadrupol-linearna ionska stupica-Orbitrap i Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije analizatori masa prikladniji za sveobuhvatnu analizu metaboloma i identifikaciju metabolita na temelju visoke moći razlučivanja masa. U kombinaciji s GC-om obično se koriste kvadrupoli ili analizatori masa koji mjere vrijeme leta, a u novije su vrijeme instrumenti GC-MS opremljeni analizatorima masa kao što su kombinacija kvadrupol-analizator koji mjeri vrijeme leta ili trostruki kvadrupol.

Istraživanja metabolomike temeljene na spektrometriji masa nalaze svoju primjenu u proučavanju utjecaja lijekova, toksina i raznih bolesti na koncentracije metabolita i metaboličke puteve.[110] Metabolomika se primjenjuje u proučavanju malignih bolesti,[117-120] kardiovaskularnih bolesti,[121,122] i bolesti bubrega.[123] Također, zastupljena je i u proučavanju urođenih poremećaja metabolizma,[124] učinaka toksina[125] i prehrane[126] te u mikrobiologiji.[127,128]

Prema tome, metabolomska tehnologija utemeljena na tehnikama LC-MS i GC-MS prikladna je za stjecanje uvida u složeni biološki sustav te za identifikaciju potencijalnih biomarkera.[129]

2.3.2 Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Plinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrijom masa vrijedna je i pouzdana analitička tehnika za razdvajanje, detekciju i identifikaciju različitih spojeva.[115] Omogućuje razdvajanje

hlapljivih spojeva ili spojeva koji se mogu učiniti hlapljivima postupkom derivatizacije, te termički stabilnih spojeva koji se nakon odvajanja detektiraju spektrometrom masa.[72]

Analizirani se spojevi iz tekućeg stanja u injektoru prevode u plinovito stanje i ispiru inertnom plinovitom pokretnom fazom s kromatografske kolone. Plinoviti se uzorci unose direktno u struju plina nosioca. Plinovita pokretna faza, tj. plin nosilac najčešće je helij.[113] Osim helija, inertnog plina visoke čistoće, mogu se upotrijebiti i argon, dušik i vodik.

U osnovne dijelove plinskog kromatografa ubrajaju se izvor stalne struje plina nosioca; uređaj za unošenje uzorka, odnosno injektor; kromatografska kolona u termostatiranom prostoru; uređaj koji bilježi pojavu eluiranog sastojka u struji plina nosioca kao funkciju vremena, odnosno detektor te sustav za prikupljanje podataka (računalo).

Smatra se da je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa zlatni standard u metabolomici, bez obzira na to što su mu ograničenje spojevi koji se ne mogu prevesti u plinovito stanje, metaboliti velikih molekulskih masa i termički nestabilni spojevi za čije je odjeljivanje prikladnija tekućinska kromatografija.[72,130] Hlapljivi metaboliti malih molekulskih masa mogu se uzorkovati i direktno analizirati, dok je većinu analiziranih metabolita potrebno prevesti u hlapljive spojeve postupkom kemijske derivatizacije na sobnoj temperaturi ili upotrebom visokih temperatura kako bi se osigurala dovoljna hlapljivost.[72] Najčešći postupci derivatiziranja uključuju esterifikaciju, aciliranje, alikiliranje i stililiranje analita.

Mali volumeni uzoraka koji su se prethodno derivatizirali analiziraju se tehnikom plinske kromatografije na kromatografskim kolonama različitih polarnosti, koje osiguravaju dobro kromatografsko razdvajanje i visoku osjetljivost. Rezultirajući kromatogrami vrlo su složeni jer sadržavaju mnoštvo pikova različitih metabolita pa zahtijevaju odgovarajuće alate za obradu podataka. Koliko će određenih metabolita u metabolomu uzorka biti otkriveno, uvelike ovisi o hlapljivosti spojeva, spojeva koji su derivatizirani i spojeva koji nisu derivatizirani.

Metaboliti se identificiraju podudaranjem vremena zadržavanja i njihova spektra masa s vremenom zadržavanja i spektrom masa standarda analiziranog uz identične intrumentne uvjete.[131] Najčešće se pretražuju knjižnice spektara masa, odnosno komercijalno dostupne baze podataka kao što je knjižnica podataka NIST (www.nist.gov/srd/nist1.htm). Ograničavajuća je okolnost da komercijalno dostupne baze podataka ne sadržavaju spektre svih metabolita koji čine mrežu metaboličkih reakcija. Analiza spektrometrom masa dobra je strategija koja omogućuje rješavanje spomenutog problema, jer tijekom ionizacije analita nastaju i fragmenti molekulskih iona čijom se interpretacijom može utvrditi struktura detektiranih spojeva, što će pomoći u njihovoj identifikaciji.

2.3.3 Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

Spregnuti sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa omogućuje kromatografsko razdvajanje metabolita koji se zatim ioniziraju elektroraspršenjem ili, rjeđe, kemijskom ionizacijom pri atmosferskom tlaku.[132]

Prednosti tehnike LC-MS u odnosu na GC-MS jesu niže temperature analize, analiza i razdvajanje nehlapljivih spojeva kao i spojeva velikih molekulskih masa. Nije potreban postupak derivatizacije, što uvelike olakšava pripravu uzoraka i analizu.[72] Postupci priprave uzoraka za LC-MS-analizu uključuju ekstrakciju metabolita i/ili taloženje proteina razrjeđivanjem u odgovarajućem otapalu te centrifugiranje.

Osnovni dijelovi tekućinskog kromatografa uključuju spremnik s pokretnom fazom, pumpu, injektor, pretkolonu, kolonu i detektor povezan s računalom za upravljanje i prikupljanje podataka. Pokretnu fazu u tekućinskoj kromatografiji čine voda ili razna organska otapala u kojima se analizirani sastojak mora dobro otapati. Najčešće se sastojci uzorka odjeljuju gradijentnim eluiranjem, odnosno eluiranjem u kojemu se sastav pokretne faze kontinuirano mijenja tijekom ispiranja, što u konačnici rezultira boljim kromatogramom. Tip i vrsta kolone za razdvajanje metabolita imaju važnu ulogu u razdvajanju i osjetljivosti kromatografskih metoda. Kolone koje se koriste u tekućinskoj kromatografiji izrađene su od

nehrđajućeg čelika, a nose oznake prema vrsti nepokretne faze. Često korištene nepokretne faze jesu oktadecilsilan ili oktilsilan. No za razdvajanje polarnijih metabolita sve je veća upotreba metode tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama i HILIC-kolona.

Kromatografska tehnika HILIC sve se više primjenjuje u istraživanjima biofarmaceutskih lijekova, proteomici te metabolomici za analizu polarnih ljekovitih supstancija, metabolita te peptida i proteina.[133-138] Nadalje, sastav pokretne faze u HILIC-u izrazito je pogodan za ionizaciju analita elektroraspršenjem, što pridonosi sve češćoj upotrebi spregnutih sustava LC-MS. Tekućinsku kromatografiju temeljenu na hidrofilnim interakcijama čini polarna nepokretna faza, odnosno silikagel na koji mogu biti vezane različite funkcionalne skupine (npr. amino, amido, diol), i polarna pokretna faza koju čini smjesa organskog otapala (najčešće acetonitrila) te manje količine vode, odnosno pufera (najčešće soli amonijev formijat ili amonijev acetat). Eluiranje se postiže gradijentom, postupno povećavajući udio vode u pokretnoj fazi,[136,139] odnosno zadržavanje analita na koloni rezultat je njegove raspodjele između vodom obogaćenog sloja nakupljenog na polarnoj nepokretnoj fazi i polarne pokretne faze s visokim udjelom organskog otapala, najčešće acetonitrila. U sustavima HILIC razdvajanje molekula temelji se na polarnosti analita, a važnu ulogu imaju vodikove veze. Prema tome, vrijeme zadržavanja analita na polarnim kolonama povećava se sa smanjenjem udjela vode u pokretnoj fazi, pa se hidrofilniji analiti dulje zadržavaju u vodenom sloju na nepokretnoj fazi.

Varijabilnosti LC-MS-podataka u metabolomskim istraživanjima mogu pridonijeti različiti čimbenici, kao što su biološka varijabilnost, ali i analitičke varijabilnosti uzrokovane pripravom uzoraka, instrumentnim uvjetima ili radnom okolinom. Varijacije uključuju pomak vremena zadržavanja, promjenu intenziteta pikova i/ili u mnogo manjoj mjeri pomak vrijednosti *m/z*. Za procjenu analitičke varijabilnosti preporučuje se upotreba i analiza uzoraka za kontrolu kvalitete ili združenih uzoraka koji se više puta analiziraju tijekom cijele LC-MS-analize.

Unatoč nedavnom napretku u metodologiji, metabolomika još uvijek predstavlja brojne izazove, uključujući i tehnološka pitanja i ograničenja interpretacije podataka.[140] Kako se obično prikuplja velika količina podataka, složenost je toliko visoka da ih nije moguće ručno interpretirati. Stoga su za obradu rezultata analize potrebni specifični softverski alati i algoritmi. Ove vrste analiza također zahtijevaju brze procesore i golem kapacitet pohrane podataka, obično u rasponu terabajta za velike skupove podataka. Nedavno su objavljeni opsežni pregledi mnogih postojećih alata za obradu podataka u metabolomici.[141,142]

Osnovni koraci obrade podataka u metabolomskim istraživanjima uključuju detekciju pikova,[143] usklađivanje pikova i vremena zadržavanja te nekoliko dodatnih koraka filtriranja signala i uklanjanja šuma osnovne linije i interferirajućih pikova iz LC-MS-podataka.[144]

U metabolomici temeljenoj na LC-MS-analizi zbog prisutnosti izotopa, adukata, dimera i fragmenata jedan je metabolit u LC-MS-podatcima često predstavljen višestrukim pikovima s različitim vrijednostima *m/z*, ali sa sličnim vremenima zadržavanja.[145] Takvi se pikovi u interpretaciji rezultata ne odbacuju, već samo označuju (engl. *Ion Annotation*), odnosno grupiraju se ioni za koje je vjerojatno da potječu iz istog spoja i uzimaju se u obzir u koraku identifikacije metabolita.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Acetonitril, za LC (*Honeywell, Charlotte, NC, USA*), amonijev acetat, za LC *(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)*, amonijev karbonat, za LC (*Honeywell, Charlotte, NC, USA*), etanol, za LC *(Honeywell, Charlotte, USA)*, fenilizotiocijanat, za LC (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)*, fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), za LC (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)*, izopropanol (*Honeywell, Charlotte, NC, USA*), kloroform, za LC (*Honeywell, Charlotte, NC, USA*), komplet kemikalija i potrošnog materijala (*Absolute IDQ p400, Biocrates Life Science AG, Innsbruck, Austrija*), metanol, za LC *(Honeywell, Charlotte, NC, USA)*, metoksiamin-hidroklorid, za LC *(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),* mravlja kiselina, za LC *(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), *N*-metil-*N*-trimetilsilitrifluoracetamid, za LC (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA),* otopine kalibracijskih standarda (Cal1-Cal7, *Absolute IDQ p400, Biocrates Life Science AG, Innsbruck, Austrija*), otopina unutarnjih standarda (QC1-QC3, *Absolute IDQ p400, Biocrates Life Science AG, Innsbruck, Austrija*), otopina za FIA-u *(Absolute IDQ p400, Biocrates Life Science AG, Innsbruck, Austrija),* piridin *p. a.* (*BDH PROLABO, Lutterworth, UK*), 148 referentnih spojeva (*Glasgow Polyomics, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom*), uzorci za kontrolu kvalitete (metaboliti ekstrahirani iz uzoraka piva i ljudskog urina, *Glasgow Polyomics, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom*), uzorci za kontrolu kvalitete (*Absolute IDQ p400, Biocrates Life Science AG, Innsbruck, Austrija*), voda, za LC (*Merck, Darmstadt, Germany)*.

3.2. Instrumenti i ostala oprema

Biokemijski analizator Olympus AU 600 s reagensima proizvođača (*Olympus diagnostica GmbH, Hamburg, Njemačka*), hematološki analizator Horiba ABX (*Diagnostics, Montpellier, Francuska*), kolona BPX-5 (duljina 30 m, unutarnji promjer kapilare 0,25 mm, debljina filma 0,25 μm, *SGE, Austin, TX, USA*), kolona ZIC-pHILIC (duljina 150 mm, unutarnji promjer kapilare 4,6 m, veličina čestice 5 μm, *Merck Sequant, Darmstadt, Germany*), plinski kromatograf-spektrometar masa Shimadzu GCMS-QP2010 (*Shimadzu, Kyoto, Japan*), tekućinski kromatograf Dionex Ultimate 3000 UHPLC (*Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK*) spregnut sa spektrometrom masa Thermo Scientific™ Q Exactive Plus (*Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany*), UHPLC-kolona (*Absolute IDQ p400, Biocrates Life Science AG, Innsbruck, Austrija*), uređaj za uparivanje (Speedvac concentrator, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*), vakuumski uređaj (Vacuum Manifold, *Thermo Scientific, Walthman, USA*).

3.3. Eksperimentalni dizajn

U istraživanje su bili uključeni psi oboljeli i od babezioze liječeni u ambulantama Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Metabolomska istraživanja uključila su tri skupine životinja podijeljene u tri istraživanja. Podatci o psima uključenima u istraživanje uvedeni su u ambulantni protokol.

Prvo je istraživanje obuhvatilo 12 zdravih pasa koji su služili kao kontrolna skupina te 12 pasa kojima je dijagnosticirana invazija protozoonom *Babesia canis*. U istraživanju su upotrijebljeni serumi zdravih pasa kontrolne skupine koji su tijekom godine dolazili na sistematske preglede na Kliniku (arhivirani uzorci). Psi uključeni u kontrolnu skupinu bili su klinički pregledani, a vrijednosti hematoloških i biokemijskih pretraga krvi i seruma nisu odstupale od referencijskih vrijednosti. Ovu su skupinu životinja činili psi različitih pasmina i različita spola (5 muških, 7 ženskih), u dobi od 1 do 12 godina. Psi s dijagnosticiranom babeziozom bili su različitih pasmina i različita spola (9 muških, 3 ženska), u dobi od 8 mjeseci

do 10 godina. Klinički pregled uključivao je mjerenje temperature, bila i disanja, pretragu sluznica, određivanje vremena punjenja kapilara, pretragu limfnih čvorova, auskultaciju pluća i srca, pretragu abdomena te neurološki pregled prilikom prijema i posljednjeg dana liječenja. Ovisno o nalazu tijekom kliničkog pregleda psima je učinjena rendgenska pretraga i/ili ultrazvučna pretraga prsnog koša i/ili trbušne šupljine. Svim psima uzorkovana je krv za hematološke i biokemijske pretrage. Kao referencijske vrijednosti korišteni su podatci laboratorija Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Psi oboljeli od babezioze imali su sljedeće simptome: povišenu tjelesnu temperaturu, letargiju, anoreksiju, blijede sluznice, anemiju, žuticu i povraćanje.

Drugo je istraživanje obuhvatilo 22 psa različitih pasmina u kojih je potvrđena invazija protozoonom *Babesia canis*. Skupinu je činilo 11 muških i 11 ženskih pasa u dobi od 1 do 14 godina. Psi su bili podijeljeni u tri skupine ovisno o stupnju bubrežne funkcije. Skupinu 1 činilo je 6 neazotemičnih pasa (koncentracija kreatinina u serumu < 140 µmol L^{-1}) s urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC < 0,05). Skupina 2 obuhvatila je 10 neazotemičnih pasa s vrijednošću UPC > 0,05. Treća je skupina bila sastavljena od 6 azotemičnih pasa (koncentracija kreatinina u serumu > 140 µmol L^{-1}) s vrijednošću UPC > 1. Kontrolnu skupinu činilo je 12 zdravih pasa, 6 muških i 6 ženskih pasa u dobi od 1 do 10 godina.

Dijagnoza babezioze postavljena je nalazom parazita *B. canis* unutar invadiranih eritrocita u krvnim razmazima tehnikom May-Grünwald. Lančana reakcija polimerazom (PCR) potvrdila je prisutnost parazita *B. canis* u krvi. Na dan prijema psi invadirani protozoonom *B. canis* primili su jednu dozu lijeka imidokarb-dipropionata (Imizol, Schering-Plough, Essex Animal Health, Friesoythe, Njemačka) od 6,6 mg/kg^{-1} tjelesne mase.

U istraživanju iDCM-a prvu je skupinu životinja činilo 12 zdravih pasa, a drugu skupinu 8 pasa s dijagnosticiranom idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom. Zdravi psi koji su primljeni na Kliniku za unutarnje bolesti bili su klinički pregledani, učinjena je hematološka i biokemijska analiza krvi i procjena srčane funkcije (elektrokardiografija, ultrazvuk srca). Psi s dijagnosticiranom idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom klinički su pregledani u

kardiološkoj ambulanti Klinike za male životinje Sveučilišta u Bernu (Švicarska) pod vodstvom dr. sc. Alena Kovačevića, Dipl. ECVIM-Ca. Uzorkovana im je krv za hematološke i biokemijske pretrage, učinjena je elektrokardiografija i radiografija te ultrazvuk srca.

Dijagnoza idiopatske dilatacijske kardiomiopatije postavljena je ponajprije na temelju nalaza ehokardiografske pretrage. Pritom su uzete u obzir sljedeće ehokardiografske značajke dilatacijske kardiomiopatije: dilatacija srčanih šupljina u 2D-prikazu i M-prikazu, snižena globalna sistolička funkcija lijevog ventrikula te smanjenje debljine srčanih stijenki. Frakcijsko skraćivanje kao i izbačajna frakcija lijevog ventrikula smanjeni su, dok je udaljenost točke E mitralne valvule od interventrikulskog septuma povećana. Pri procjeni veličine lijevog ventrikula koristio se referencijski raspon unutarnjeg promjera lijevog ventrikula u sistoli i dijastoli, kao i telesistolički i teledijastolički volumen. Referencijski rasponi promjera i volumena definirani su prema tjelesnoj masi ili su pasminski specifični (kao što je to, primjerice, slučaj kod dobermana, njemačkog boksera, njemačke doge, irskog vučjeg hrta itd.).

3.4. Priprava i analiza uzoraka krvi

Uzorci krvi za analizu iz prve i druge skupine pasa uzeti su na dan prijema iz cefalične vene (*v. cephalica antebrachii*), s tim da je psima s babeziozom krv vađena prije aplikacije imidokarb-dipropionata (nulti dan) te šestog dana nakon uzimanja imidokarb-dipropionata. Iz uzoraka uzetih na dan prijema potvrđena je dijagnoza invazije protozoonom *Babesia canis* (mikroskopski nalaz i PCR). Uzorci za hematološke i biokemijske pretrage uzeti su prije liječenja u dvije epruvete. Jedna je epruveta sadržavala antikoagulans s kalij-etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) za hematološku analizu, a druga je epruveta bila s gelom bez antikoagulansa za biokemijsku analizu. Jedan dio iz epruvete s antikoagulansom kalij-EDTA korišten je za rutinsku hematološku analizu, a hematološki podatci kompletne krvne slike prikupljeni su automatskim hematološkim analizatorom Horiba ABX. Ostatak uzorka centrifugiran je na 1200 g tijekom 15 minuta kako bi se odvojila plazma za daljnja istraživanja iDCM-a. Dobivena je plazma alikvotirana i pohranjena na -80 °C do daljnje analize.

Uzorci krvi sakupljeni u epruveti s gelom bez antikoagulansa ostavljeni su na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta radi zgrušavanja. Zatim su centrifugirani na 1200 g tijekom 15 minuta kako bi se odvojili uzorci seruma za daljnja istraživanja babezioze. Dio seruma korišten je za rutinsku biokemijsku analizu i utvrđivanje biokemijskog profila pasa uključenih u istraživanje, dok je ostatak pohranjen na -80 °C za daljnje analize. Biokemijski profili određeni su standardnim metodama pomoću automatiziranog biokemijskog analizatora Olympus AU 600 s reagensima proizvođača.

3.5. Neciljana LC-MS-metabolomska analiza

3.5.1. Ekstrakcija metabolita iz seruma, plazme i urina pasa

Tri ključna koraka u pripravi uzoraka seruma/plazme/urina pasa za metabolomsku analizu uključuju taloženje proteina, centrifugiranje i filtraciju supernatanta. Metaboliti su ekstrahirani smjesom otapala ψ ($CHCl_3$, CH_3OH, H_2O) = 1:3:1. Ukupno 1000 µL ohlađenog ekstrakcijskog otapala dodano je u 25 µL svakog uzorka seruma/plazme/urina i miješano na Vortex-miješalici 5 minuta na temperaturi od 4 °C. Skupni uzorci koji su služili kao kontrolni uzorci pripravljeni su miješanjem na Vortex-miješalici po 10 µL svakog uzorka obuhvaćenog istraživanjem (uključujući uzorke zdravih pasa i uzorke bolesnih pasa). Iz ukupne smjese uzet je volumen od 25 µL kojemu je dodano 1000 µL ekstrakcijskog otapala te je sve zajedno miješano na Vortex-miješalici 5 minuta na temperaturi od 4 °C. Kao kontrolni uzorci služili su i slijepi uzorci koji su sadržavali samo ekstrakcijsko otapalo. Svi su uzorci centrifugirani na 13 000 g u trajanju od 5 minuta, na temperaturi od 4 °C. Volumen od 200 µL odvojenog supernatanta filtriran je u analitičke tubice i pohranjen na -80 °C do daljnje analize.

3.5.2. Analiza metabolita neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom

Metaboliti su odijeljeni na koloni ZIC-pHILIC (duljina 150 mm, unutarnji promjer kapilare 4,6 m, veličina čestice 5 µm, *Merck Sequant, Darmstadt, Germany*) tekućinskom kromatografijom temeljenom na hidrofilnim interakcijama na tekućinskom kromatografu Dionex Ultimate 3000

UHPLC spregnutom sa spektrometrom masa Thermo Scientific™ Q Exactive Plus s hibridnim analizatorom masa kvadrupola i Orbitrapa. Temperatura kolone bila je 30 °C. Metaboliti su odijeljeni linearnim gradijentnim eluiranjem. Pokretna faza A bila je 20 mmol dm^{-3} amonijev karbonat, pripravljena otapanjem 1,92 g amonijeva karbonata u 1 L vode. Pokretna faza B bila je otopina 100 % acetonitrila. Kromatografski uvjeti gradijentnog eluiranja prikazani su u **Tablici 1**. Protok pokretne faze bio je 0,3 mL min^{-1}, a ukupno vrijeme analize bilo je 26 min.

Tablica 1. Sastav pokretne faze za razdvajanje smjese metabolita neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom.

Vrijeme / min	**Pokretna faza A (φ / %)**	**Pokretna faza B (φ / %)**
0,000	20,0	80,0
15,000	95,0	5,00
17,000	20,0	80,0

Po 10 µL svakog uzorka injektirano je na kolonu, a uzorci su održavani u sustavu za injektiranje automatskog uzorkivača na temperaturi od 5 °C tijekom trajanja analize. Svaki uzorak injektiran je randomiziranim redoslijedom. Između svaka četiri ciljna 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*). Razlučivanje instrumenta bilo je 70 000. Analize su provedene u rasponu *m/z* od 70 do 1050. MS-postavke za analizu metabolita prikazane su u **Tablici 2**.

Tablica 2. MS-postavke korištene za analizu metabolita spektrometrom masa Orbitrap u pozitivnom i negativnom načinu rada neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom.

MS-postavke	Pozitivan način rada	Negativan način rada
Napon izvora / kV	+3,8	-3,8
Protok plina za nebulizaciju (dušik visoke čistoće) / A. U.	40	40
Protok pomoćnog plina za desolvataciju i elektroraspršenje (dušik visoke čistoće) / A. U.	5	5
Temperatura kapilare za prijenos iona / °C	320	320

A. U. – (*arbitrary units*) relativne jedinice

3.5.3. Obrada podataka

Sirovi LC-MS-podatci dobiveni za svaki uzorak analizirani su alatom MSconvert (ProteoWizard Software Foundation, San Diego, CA) i softverom za bioinformatičku obradu podataka kreiranim u laboratoriju Glasgow Polyomics (Polyomics integrated Metabolomics Pipeline, PiMP) i dostupnim na stranici http://polyomics.mvls.gla.ac.uk koristeći se standardnim protokolom i zadanim parametrima. Za bioinformatičku obradu podataka u PiMP-softveru bilo je potrebno sirove LC-MS-podatke konvertirati iz formata Thermo Scientific ˈRAWˈ u format ˈmzXMLˈ alatom MSconvert i uvesti u PiMP-softver. Identifikacija metabolita provedena je u PiMP-u uspoređivanjem točne molekulske mase i vremena zadržavanja detektiranih analita s autentičnim standardima. Metaboliti označeni oznakom *annotated* predstavljali su spojeve koji su se podudarali sa spojevima u bazama podataka samo prema točnoj masi unutar PiMP-softvera. U tu se svrhu pretraživala vlastita baza podataka kreirana prema 148 referentnih spojeva (*Glasgow Polyomics, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom*) koji su pušteni na početku i na

kraju sekvencije uzoraka uključenih u istraživanje. Osim prema vlastitoj bazi podataka, metaboliti su se identificirali i prema bazama podataka kao što su baza podataka o metabolomu čovjeka (engl. *The Human Metabolome Database*, HMDB) i/ili zbirka baza podataka koje se bave genomima, biološkim putevima, bolestima, lijekovima i kemijskim tvarima (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG).

3.6. Ciljana metabolomska analiza

Metaboliti u serumu analizirani su komercijalno dostupnim kompletom kemikalija i potrošnog materijala (*Absolute IDQ p400, Biocrates Life Science AG, Innsbruck, Austrija*), prvobitno razvijenim za analizu uzoraka plazme. Komplet kemikalija i potrošnog materijala Absolute IDQ p400 omogućio je ciljanu metabolomsku analizu do 408 metabolita podijeljenih u 11 grupa. Navedeni komplet kemikalija i potrošnog materijala sadržavao je aminokiseline, biogene amine, acil-karnitine, glicerofosfolipide, gliceride, heksoze i estere kolesterola. Kvantifikacija metabolita temeljila se na analizi vezanim sustavom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa te analizi injektiranjem u protok uz detekciju spektrometrijom masa (engl. *Flow Injection Analysis-Mass Spectrometry*, FIA-MS). LC-MS-analiza omogućila je kvantifikaciju aminokiselina i biogenih amina dok su FIA-MS-analizom kvantitativno određene ostale skupine metabolita kao što su acil-karnitini, esteri kolesterola, glicerofosfolipidi, gliceridi, sfingolipidi i heksoze.

3.6.1. Ekstrakcija metabolita iz seruma, plazme i urina pasa

Metaboliti su ekstrahirani iz uzoraka seruma/plazme/urina pasa prema uputama proizvođača priloženima uz komplet kemikalija i potrošnog materijala. Uzorci su pripravljeni na specifičnom sustavu ploča s 96 jažica. Gotova otopina unutarnjih standarda centrifugirana je na 1000 g u trajanju od 2 minute. Volumen od 1200 µL vode dodan je u gotovu otopinu unutarnjih standarda te je miješan na Vortex-miješalici brzinom od 1200 okretaja u minuti nekoliko puta. Prije otvaranja gotove otopine kalibracijskih standarda centrifugirane su na 10 000 g u trajanju od 2 minute. Volumen od 100 µL vode dodan je u svaku od 7 otopina kalibracijskih standarda.

Otopine su miješane na Vortex-miješalici u trajanju od 15 minuta pri brzini od 1200 okretaja u minuti nekoliko puta. Uzorci za kontrolu kvalitete centrifugirani su prije otvaranja na 10 000 g tijekom 2 minute. Volumen od 100 μL vode dodan je u svaki uzorak i sve je zajedno miješano na Vortex-miješalici 15 minuta pri brzini od 1200 okretaja u minuti. Nakon toga, uzorci su centrifugirani pri temperaturi od 4 °C na 2750 g tijekom 5 minuta. Komercijalno dostupne otopine kalibracijskih standarda, uzorci za kontrolu kvalitete i otopina unutarnjih standarda razrijeđeni su do potrebne koncentracije. Uzorci seruma/plazme/urina i uzorci za kontrolu kvalitete zatim su centrifugirani nekoliko minuta na 2750 g na temperaturi od 4 °C. Nadalje, volumen od 10 μL svakog uzorka seruma/plazme/urina pipetiran je u jažice koje su sadržavale otopinu unutarnjih standarda. Pločica s uzorcima sušena je 30 minuta u vakuumskom uređaju te su uzorci derivatizirani dodatkom 50 μL 5 %-tne otopine za derivatizaciju. Otopina za derivatizaciju sadržavala je etanol, vodu, piridin i fenilizotiocijanat. Prvotno je pripravljena otopina miješanjem na Vortex-miješalici 1900 μL etanola, 1900 μL vode i 1900 μL piridina u praznoj plastičnoj tubi. Ukupno 300 μL fenilizotiocijanata dodano je u prethodno pripravljenu otopinu te je ručno miješano dok otopina nije postala kristalno jasna. Ekstrakcija metabolita provedena je dodatkom 300 μL 5 mmol dm^{-3} otopine amonijeva acetata pripravljenog u metanolu i miješanjem na Vortex-miješalici pri brzini od 450 okretaja u minuti u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Otapalo za ekstrakciju metabolita pripravljeno je otapanjem 19 mg amonijeva acetata u 50 mL volumena metanola. Za LC-MS-analizu volumen od 150 μL ekstrakta prenesen je s pločice za FIA-MS-analizu u novu pločicu i razrijeđen s 150 μL vode. U pločicu za FIA-MS-analizu dodano je 250 μL otopine za FIA-u.

3.6.2. Analiza metabolita ciljanom metabolomskom analizom

Ekstrahirani metaboliti analizirani su tekućinskim kromatografom Dionex Ultimate 3000 UHPLC spregnutim sa spektrometrom masa Thermo Scientific™ Q Exactive Plus s hibridnim analizatorom masa kvadrupola i Orbitrapa pomoću ionizacije elektroraspršenjem. Metaboliti su odijeljeni na UHPLC-koloni, koja se nalazila u kompletu kemikalija i potrošnog materijala

Biocrates. Temperatura kolone bila je 50 °C. U LC-MS-analizi, metaboliti su odijeljeni gradijentnim eluiranjem pri čemu je pokretna faza A bila 0,2 %-tna otopina mravlje kiseline u vodi, a pokretna faza B 0,2 %-tna otopina mravlje kiseline u acetonitrilu (**Tablica 3**). Pokretna faza A pripravljena je dodatkom 2 mL mravlje kiseline u 1000 mL vode, dok je pokretna faza B pripravljena dodatkom 1 mL mravlje kiseline u 500 mL acetonitrila. Volumen injektiranja bio je 5 μL, a ukupno vrijeme analize bilo je 5,81 minuta. Ukupno 500 mL otopine za ispiranje sustava za injektiranje pripravljeno je miješanjem na Vortex-miješalici 125 mL acetonitrila, 125 mL metanola, 125 mL izopropanola i 125 mL vode.

Tablica 3. Uvjeti kromatografske analize za razdvajanje smjese metabolita ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom.

Vrijeme / min	**Protok pokretne faze / mL min^{-1}**	**Pokretna faza A** φ **/ %**	**Pokretna faza B** φ **/ %**
0,25	0,8	100,0	0,00
1,50	0,8	88,0	12,0
2,70	0,8	82,5	17,5
4,00	0,8	50,0	50,0
4,50	0,8	5,00	95,0
4,70	1,0	5,00	95,0
5,25	1,0	100,0	0,00
5,80	0,8	100,0	0,00

U analizi injektiranjem u protok uz detekciju spektrometrijom masa metaboliti su analizirani pri protoku otopine za FIA-u (0,05 mL min^{-1} u prvih 1,40 min, u 1,60-oj min protok je bio 0,20 mL min^{-1} te se u 3. min vratio na početni protok – 0,05 mL min^{-1}). Ukupno 300 mL otopine za

FIA-u pripravljeno je dodatkom 10 mL aditiva za FIA-u u 290 mL metanola. Volumen injektiranja bio je 20 μL, a ukupno vrijeme analize 3,01 minuta.

Analiza metabolita spektrometrijom masa provedena je u pozitivnom i negativnom načinu rada uz zadane uvjete navedene u uputama Biocrates (**Tablica 4**).

Tablica 4. MS-postavke korištene za analizu metabolita Orbitrap spektrometrom masa u pozitivnom i negativnom načinu rada ciljanom metabolomskom analizom.

MS-postavke	**Postavke za analizu LC-MS-om**	**Postavke za analizu injektiranjem u protok**
Način snimanja spektara	Cjelokupni spektri mase	Cjelokupni spektri mase
Raspon / *m/z*	100,0 - 800,0	100,0 - 1000,0
Rezolucija	70 000	70 000
Polaritet	Pozitivan / Negativan	Pozitivan / Negativan
Maksimalno vrijeme injektiranja / ms	250	250
Protok plina za nebulizaciju (dušik visoke čistoće) / A. U.	60	15
Protok pomoćnog plina za desolvataciju i elektroraspršenje (dušik visoke čistoće) / A. U.	30	5
Protok plina za sušenje (dušik visoke čistoće) / A. U.	1	1
Napon izvora / kV	3,00	3,00
Temperatura kapilare za prijenos iona / °C	300	300
Razina RF-napona na S-lećama / %	60	60
Temperatura grijača pomoćnog plina / °C	550	120

A. U. – (*arbitrary units*) relativne jedinice

3.6.3. Obrada podataka

Rezultati analize obrađeni su softverom MetIDQ prema uputama proizvođača Biocrates Life Science. Analiti određeni LC-MS-om kvantificirani su softverom XCalibur Quan 4,1 na temelju kalibracijske krivulje kroz sedam točaka i unutarnjih standarda obilježenih izotopom za većinu analita. Za kvantifikaciju analita dobivenih analizom injektiranjem u protok korištena je jedna kalibracijska točka s reprezentativnim unutarnjim standardima. Za izračun granica detekcije korišteni su uzorci fosfatnog pufera u triplikatima.

3.7. GC-MS-metabolomska analiza

3.7.1. Ekstrakcija metabolita iz uzoraka seruma i plazme

Metaboliti su ekstrahirani smjesom otapala ψ (H_2O, CH_3OH, CH_3Cl = 1:2,5:1). U 25 μL svakog uzorka dodano je 250 μL ekstrakcijskog otapala te je sve zajedno inkubirano 30 minuta na temperaturi od 37 °C. Uzorci su nakon toga centrifugirani na 16 000 g tijekom 5 minuta na temperaturi od 4 °C. Volumen od 225 μL supernatanta miješan je s 200 μL destilirane vode na Vortex-miješalici pri brzini od 1200 okretaja u minuti tijekom 30 minuta na temperaturi od 37 °C. Uzorak je zatim centrifugiran na 16 000 g 5 minuta na temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja odvojeno je 225 μL supernatanta u zasebnu tubicu i upareno do suha u uređaju za uparavanje u trajanju od 4 h. Suhi ostatak otopljen je u 40 μL metoksiamin-hidroklorida pripravljenog u piridinu (ukupno 15 mg metoksiamina otopljeno je u 1 mL suhog piridina) te je uzorak miješan na Vortex-miješalici pri brzini od 1200 okretaja u minuti tijekom 90 minuta na temperaturi od 30 °C. Volumen od 20 μL *N*-metil-*N*-trimetilsilitrifluoracetamida dodan je u rezultirajuću smjesu te je uzorak inkubiran 30 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon derivatizacije uzorak je centrifugiran na 16 000 g tijekom 5 minuta na temperaturi od 20 °C i pohranjen na -80 °C do GC-MS-analize.

3.7.2. Analiza metabolita GC-MS-metabolomskom analizom

Ekstrahirani metaboliti analizirani su vezanim sustavom plinski kromatograf – spektrometar masa Shimadzu GCMS-QP2010. Kromatografsko odjeljivanje provedeno je na kapilarnoj

koloni BPX-5 duljine 30 m, unutarnjeg promjera kapilare 0,25 mm i debljine filma 0,25 μm. Injektirani volumen uzorka bio je 1 μL. Temperatura injektora bila je 250 °C. Helij visoke čistoće korišten je kao plin nosilac uz protok od 1 mL min^{-1}. Analiza pojedinog uzorka trajala je 60 minuta. Temperatura kolone programirana je od početnih 60 °C (zadržavanje na 60 °C 2 minute) do 330 °C brzinom od 15 °C min^{-1} (zadržavanje na 330 °C 10 minuta). Spektrometar masa snimao je cjelokupne spektre masa. Temperatura ionskog izvora bila je 200 °C, a temperatura sučelja 280 °C. MS-spektri bilježeni su u rasponu *m/z* od 45 do 600 s vremenom skeniranja od 1 sekunde. Analizu metabolita GC-MS-metabolomskom analizom i bioinformatičku obradu podataka proveo je prof. dr. sc. Tomislav Mašek, Zavod za prehranu i dijetetiku domaćih životinja, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

3.7.3. Obrada podataka

Spektri masa obrađeni su u softveru Shimadzu GCMS verzije 2.53. Metaboliti su identificirani usporedbom njihovih spektara masa sa spektrima u komercijalno dostupnim GC-MS-bazama podataka kao što je biblioteka 2.0 NIST.

3.8. Statistička obrada podataka

Cilj statističke analize podataka bio je otkriti one pikove/metabolite čiji se intenziteti/koncentracije značajno razlikuju među različitim biološkim skupinama. Izbor metoda za statističku analizu često ovisi o konkretnom dizajnu istraživanja, dok se neke metode mogu primijeniti na više vrsta istraživanja.[145] Metode statističke analize dijele se na univarijantnu i multivarijantnu analizu. Univarijantna metoda procjenjuje statističku značajnost svakog pika/metabolita zasebno. Uobičajene univarijantne metode uključuju Studentov *t*-test, analizu varijancije (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA) i druge. Vrijednosti *p* obično se procjenjuju univarijantnim metodama, bilo putem parametarskih pristupa bilo permutacijskim testovima. Multivarijantna analiza razmatra kombinacijski učinak više varijabli.[145] Jedna je od najpopularnijih tehnika multivarijantne statističke analize u metabolomskim istraživanjima analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, PCA). Analizom PCA

prikazuje se slaganje uzoraka između dviju komponenata, glavne komponente 1 i glavne komponente 2. Ovom se analizom može dobiti pregled unutarnjih varijacija u skupu podataka. Diskriminantna analiza djelomičnih (parcijalnih) najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least-Squares Discriminant Analysis*, PLS-DA) upotrijebljena je za identifikaciju važnih metabolita. Važnost varijable u projekciji (engl. *Variable Importance In Projection*, VIP), odnosno VIP-rezultati rangirali su metabolite prema njihovoj važnosti u razlikovanju pasa invadiranih parazitom *B. canis* od zdravih pasa i u razlikovanju pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom od zdravih pasa. Metaboliti s najvišom VIP-vrijednošću smatraju se najmoćnijim diskriminatorima u razlikovanju skupina; dakle, metaboliti s VIP-vrijednošću >1 značajni su, a metaboliti s VIP-vrijednošću >2 visoko su značajni.

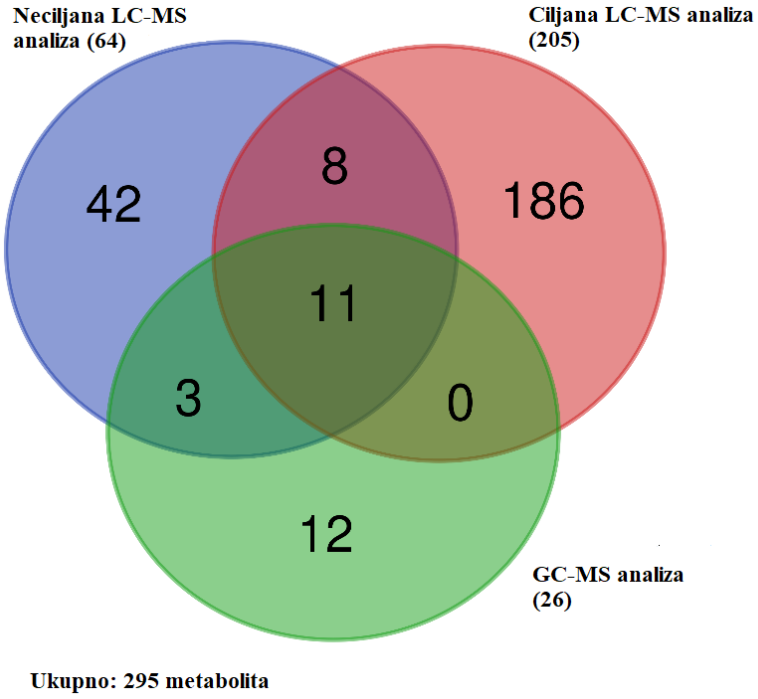
Za statističku obradu rezultata primijenjen je softver MetaboAnalyst v.4.0 dostupan *online*, koristeći se univarijantnim i multivarijantnim statističkim pristupima.[146] Rezultati istraživanja uzoraka seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* i istraživanja uzoraka plazme pasa s iDCM-om uspoređeni su primjenom Studentova *t*-testa za različite skupine pasa uz sustavnu primjenu korekcije mjere lažnih otkrića (detekcije) (engl. *False Discovery Rate*, FDR) u svim *t*-testovima. U istraživanju uzoraka urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* uspoređene su četiri skupine uzoraka urina analizom ANOVA. Metaboliti s vrijednošću $p < 0,05$ smatrani su statistički značajnima. Sve statističke analize u neciljanoj metabolomici bile su izvedene na kombiniranim skupovima podataka dobivenih pozitivnim i negativnim načinom rada spektrometra masa i prikazanih u obliku tablice s intenzitetima pikova izvedene iz softvera PiMP. Statističke analize u ciljanoj metabolomici i GC-MS-metabolomici izvedene su prema tablici koncentracija metabolita, odnosno relativnog omjera pojedinačnog metabolita izraženog u postotku određenih bioinformatičkom obradom rezultata. Nadalje, u analizu metaboličkih puteva značajno promijenjenih u babeziozi i idiopatskoj dilatacijskoj kardiomiopatiji uključeni su identificirani, značajno promijenjeni metaboliti određeni spregnutim sustavima tekućinske i/ili plinske kromatografije sa spektrometrijom masa i upotrebom neciljanog i ciljanog metabolomskog pristupa. Hipergeometrijski test i baza podataka (*Homo sapiens*) upotrijebljeni

su kao parametri za dobivanje rezultata. Metabolički putevi s vrijednošću p <0,05 i utjecajem na put (engl. *Pathway Impact*) smatrani su statistički značajnima.

§ 4. REZULTATI

4.1. Istraživanje metabolita u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Neciljanom i ciljanom metabolomskom LC-MS-analizom i GC-MS-metabolomskom analizom ukupno je u uzorcima seruma invadiranih pasa identificirano 295 različitih metabolita (**Slika 2**).



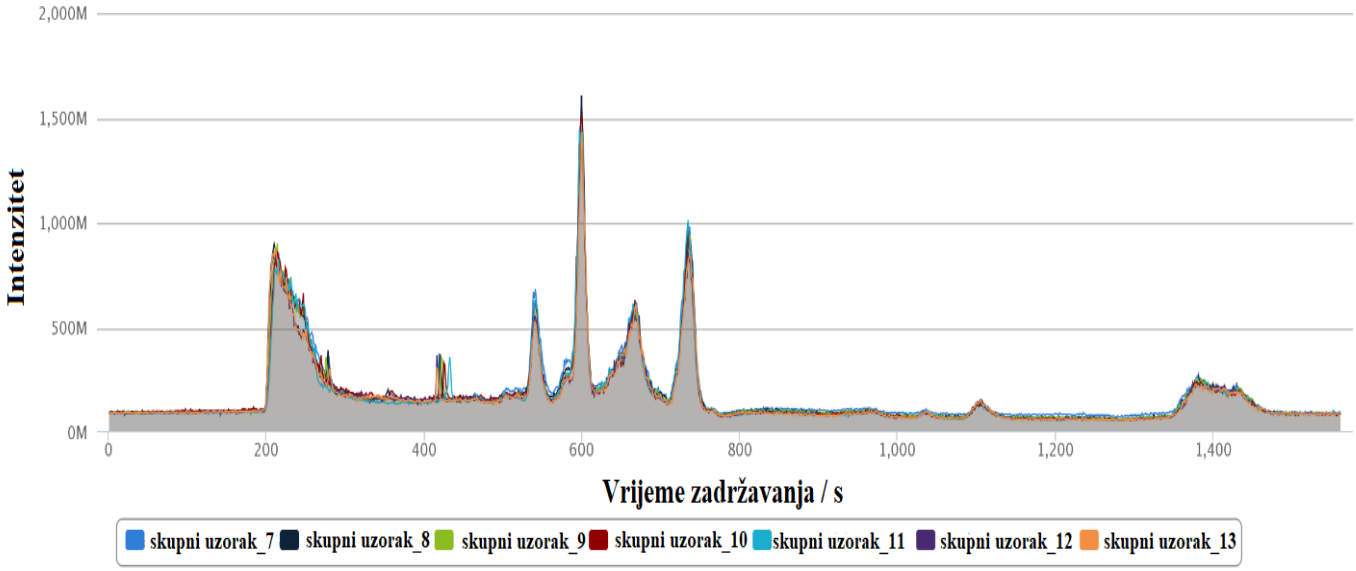
Slika 2. Brojčani skup metabolita identificiranih u uzorcima seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa, prikazan Vennovim dijagramom. Neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom identificirana su 64 metabolita, ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (Biocrates analiza) 205 metabolita, dok je GC-MS-metabolomskim pristupom identificirano 26 metabolita. Ukupno je u serumu pasa identificirano 295 metabolita.

Prema Vennovu dijagramu 22 metabolita identificirana su s više od jednog analitičkog pristupa. Pritom je 14 metabolita identificirano LC-MS- i GC-MS-metodama, 11 metabolita izmjereno je ciljanom metabolomskom analizom (Biocrates analiza) i GC-MS-analizom, a 19 metabolita primjenom ciljane i neciljane LC-MS-analize. Ukupno 11 metabolita identificirano je primjenom svih triju analitičkih pristupa.

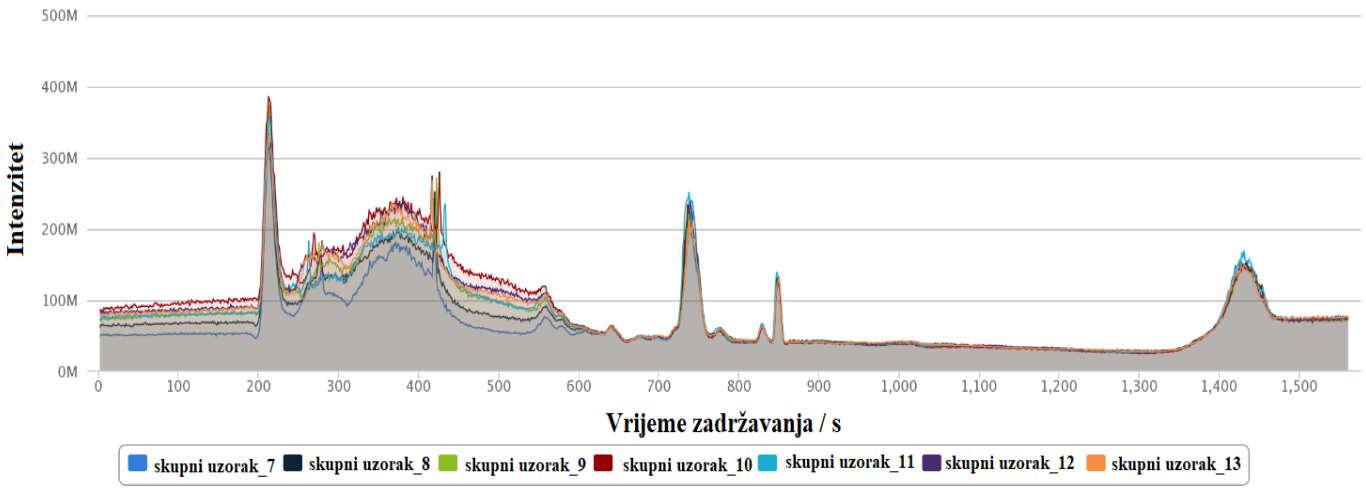
4.1.1 Neciljana LC-MS-metabolomska analiza seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Neciljanom metabolomskom LC-MS-analizom identificirani su metaboliti povezani s babeziozom koji su omogućili uvid u metabolom seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis*. Detektirana su 1802 pika, a 4192 moguća metabolita u 24 analizirana uzorka. Među potencijalnim metabolitima ukupno su identificirana 64 metabolita, dok je 4098 metabolita softverom PiMP označeno s *annotated*.

Ukupni ionski kromatogrami dali su pregled molekulskih masa metabolita iz ekstrakta seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* detektiranih instrumentom uz pozitivnu i negativnu ionizaciju (**Dodatak, Slike II – V**). Uzorci su se u velikoj mjeri preklapali u istoj skupini, što je pokazatelj visoke reproducibilnosti instrumenta tijekom analize. Skupni uzorak, injektiran sedam puta i korišten za prikaz svih analita tijekom analize, također je u velikoj mjeri pokazao preklapanja u istoj skupini uzoraka, što je još jedna potvrda dobrog eksperimenta (**Slika 3**).


2,000M
1,500M
1,000M
500M
0M
Intenzitet
0
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
Vrijeme zadržavanja / s
skupni uzorak_7
skupni uzorak_8
skupni uzorak_9
skupni uzorak_10
skupni uzorak_11
skupni uzorak_12
skupni uzorak_13

(a)



(b)

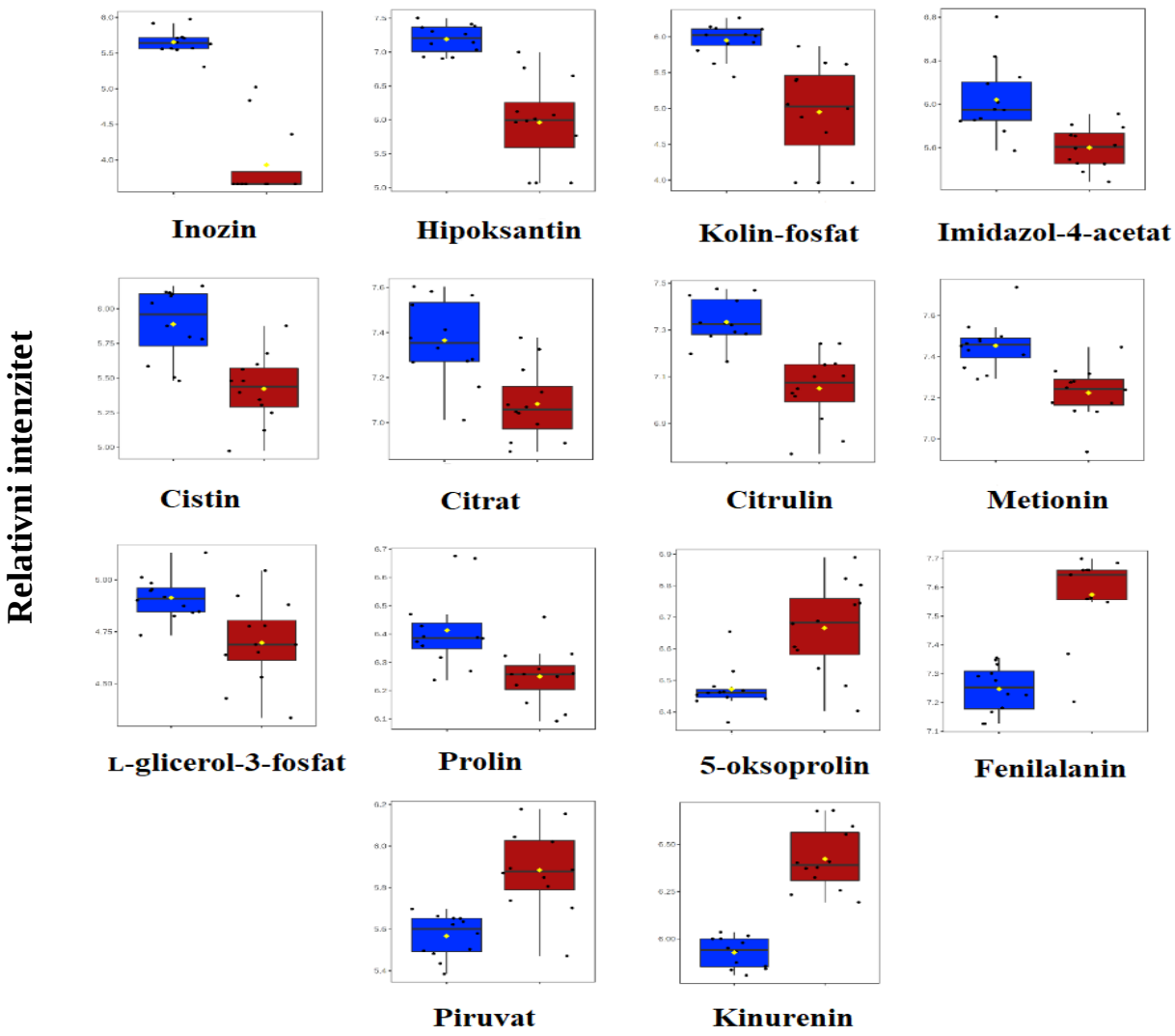
Slika 3. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta skupnog uzorka seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* uz pozitivnu (a) i negativnu ionizaciju elektroraspršenjem (b). Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) skupnog uzorka.

Statistička obrada rezultata pokazala je da je ukupno 147 pikova detektiranih u serumu invadiranih pasa značajno promijenjeno. U odnosu na kontrolnu skupinu, među njima, identificirano je ukupno 14 metabolita (**Tablica 5**).

Prema vrijednostima logaritma stupnja promjene po bazi 2 ($\log_2$ (FC)) prikazanima u **Tablici 5**, u zdravih pasa je intenzitet pikova metabolita inozina, hipoksantina, kolin-fosfata, imidazol-4-acetata, cistina, citrata, citrulina, metionina, L-glicerol-3-fosfata i prolina bio smanjen, dok je intenzitet pikova metabolita 5-oksoprolina, fenilalanina, piruvata i kinurenina bio povećan u odnosu na pse invadirane parazitom *B. canis* (**Slika 4**).

Tablica 5. Značajno promijenjeni metaboliti u serumu zdravih pasa u odnosu na pse invadirane parazitom *B. canis* identificirani neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom.

Metaboliti	Broj pika u kromatogramu	Molekulska Masa	Vrijeme zadržavanja / s	Vrijednost *p*	$\log_2$ (FC)
Inozin	1280	267,0736	591,68	1,74E-10	4,62
Hipoksantin	70	137,0458	567,72	3,00E-06	2,95
Kolin-fosfat	352	184,0734	714,56	8,90E-05	2,29
Imidazol-4-acetat	169	127,0502	624,14	6,69E-04	1,81
Cistin	407	241,031	771,48	1,59E-04	1,54
Citrat	848	191,02	828,92	5,74E-04	0,95
Citrulin	73	176,103	764,51	1,94E-05	0,91
Metionin	51	150,0584	610,06	1,50E-04	0,76
L-glicerol-3-fosfat	1657	171,0066	713,52	0,003259	0,62
Prolin	1004	114,0561	659,98	0,0029351	0,58
5-oksoprolin	951	128,0354	575,74	3,86E-04	-0,70
Fenilalanin	54	166,0863	551,14	9,88E-07	-1,13
Piruvat	1209	87,0088	501,48	3,05E-05	-1,15
Kinurenin	199	209,0921	580,41	5,04E-09	-1,72



Slika 4. Usporedba relativnog intenziteta pikova značajno promijenjenih metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranih u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom. Plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke, dok crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke seruma invadiranih pasa. Prikazani metaboliti pokazali su statistički značajnu razliku između skupina prema *t*-testu (p <0,05). Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

4.1.2 Ciljana LC-MS-metabolomska analiza seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis*

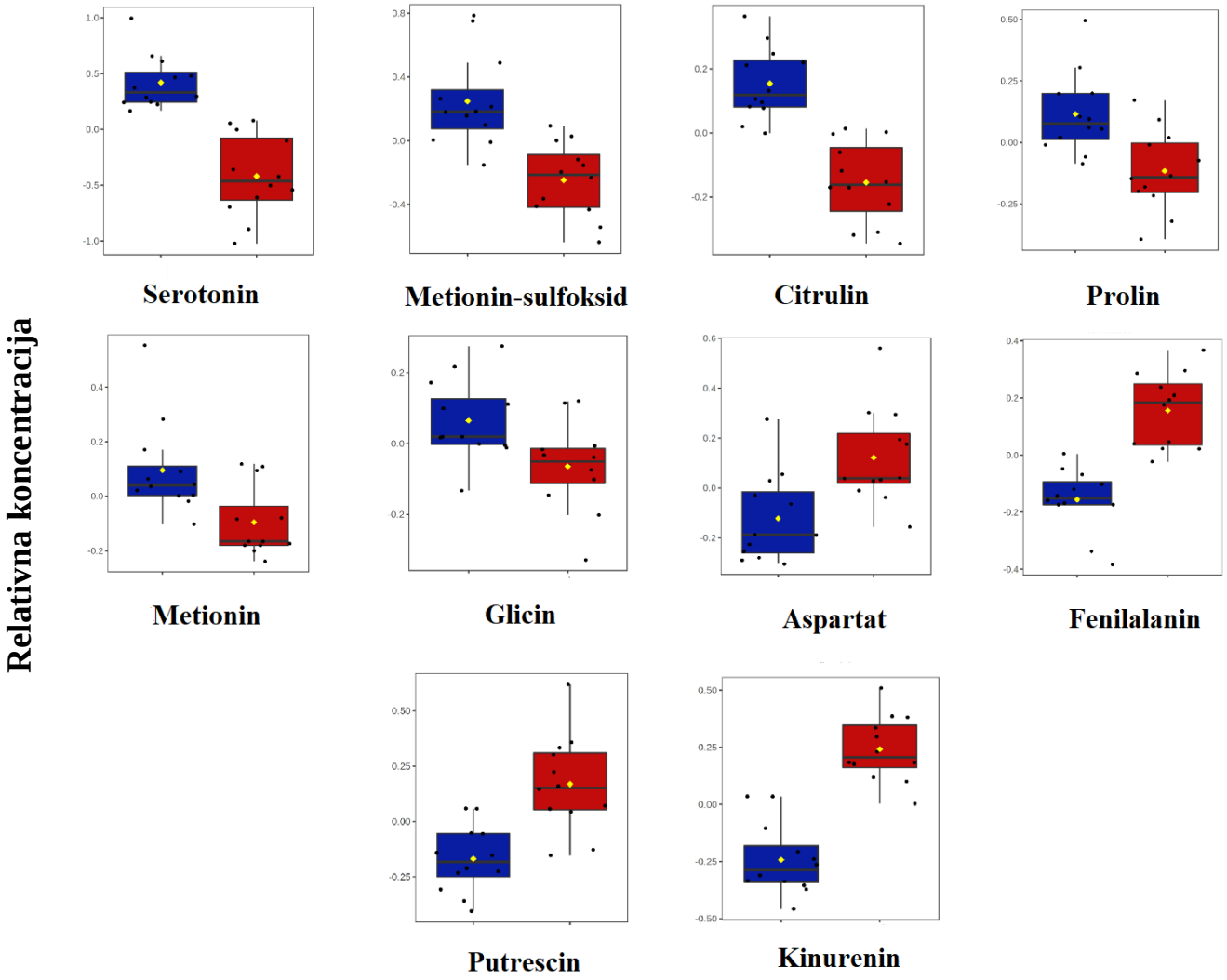
Ciljana metabolomska analiza provedena je na 24 uzorka seruma pasa kompletom kemikalija i potrošnog materijala Absolute IDQ-p400 Biocrates, kombinirajući LC-MS- i FIA-MS-analizu. Ukupno je identificirano 205 metabolita, a njihove su koncentracije prikazane u dodatku u **Tablici I i II**. Među njima, 19 metabolita bile su aminokiseline, 8 metabolita bili su biogeni amini, 1 metabolit bio je iz skupine monosaharida, 3 metabolita bili su acil-karnitini, a 9 ih je pripadalo skupini estera kolesterola. Skupinu diglicerida činilo je 9 metabolita, a skupinu triglicerida 31 metabolit. Nadalje, 12 metabolita bili su lizofosfatidilkolini, 88 fosfatidilkolini te 25 sfingolipidi.

Univarijantnom metabolomskom analizom otkriveno je ukupno 68 značajno promijenjenih metabolita u serumu zdravih pasa u odnosu na serum pasa s babeziozom. Među njima je 10 metabolita identificirano ciljanom LC-MS-analizom. Šest metabolita bile su aminokiseline, dok su ostatak činili biogeni amini (**Tablica 6**).

Tablica 6. Značajno promijenjeni metaboliti u serumu zdravih pasa u odnosu na pse invadirane parazitom *B. canis* identificirani ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom.

Metaboliti	Skraćeno ime	Vrijednost *p*	$\log_2$ (FC)	Klasifikacija
Serotonin	-	1,1379E-6	2,59	Biogeni amini
Metionin-sulfoksid	Met-SO	1,3923E-4	1,79	Biogeni amini
Citrulin	Cit	2,4982E-6	1,01	Aminokiseline
Prolin	Pro	0,0023447	0,78	Aminokiseline
Metionin	Met	0,0058706	0,70	Aminokiseline
Glicin	Gly	0,014506	0,42	Aminokiseline
Aspartat	Asp	0,0040195	-0,83	Aminokiseline
Fenilalanin	Phe	2,3172E-6	-1,06	Aminokiseline
Putrescin	-	2,0919E-4	-1,22	Biogeni amini
Kinurenin	-	7,758E-8	-1,59	Biogeni amini

Prema vrijednostima $\log_2$ (FC) prikazanima u **Tablici 6**, u zdravih pasa su koncentracije serotonina, metionin-sulfoksida, citrulina, prolina, metionina i glicina bile snižene, dok su koncentracije aspartata, fenilalanina, putrescina i kinurenina bile povišene u odnosu na pse s babeziozom (**Slika 5**).



Slika 5. Usporedba relativnih koncentracija značajno promijenjenih metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranih u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom. Plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke, dok crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke seruma invadiranih pasa. Prikazani metaboliti pokazali su statistički značajnu razliku između skupina prema *t*-testu (p <0,05). Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

Ostalih značajno promijenjenih 58 metabolita identificirano je FIA-MS-analizom. Pet od tih metabolita bili su lizofosfatidilkolini, sedam ih je činilo skupinu diglicerida, dvadeset pet su bili fosfatidilkolini, jedanaest trigliceridi, osam sfingomijelina te dva estera kolesterola. Među njima, 5 značajno promijenjenih metabolita bili su: lizofosfatidilkolin 22:6, diacilgliceroli 36:2 i 36:3 te fosfatidilkolini O-38:6 i O-40:6.

4.1.3 GC-MS-metabolomska analiza seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis*

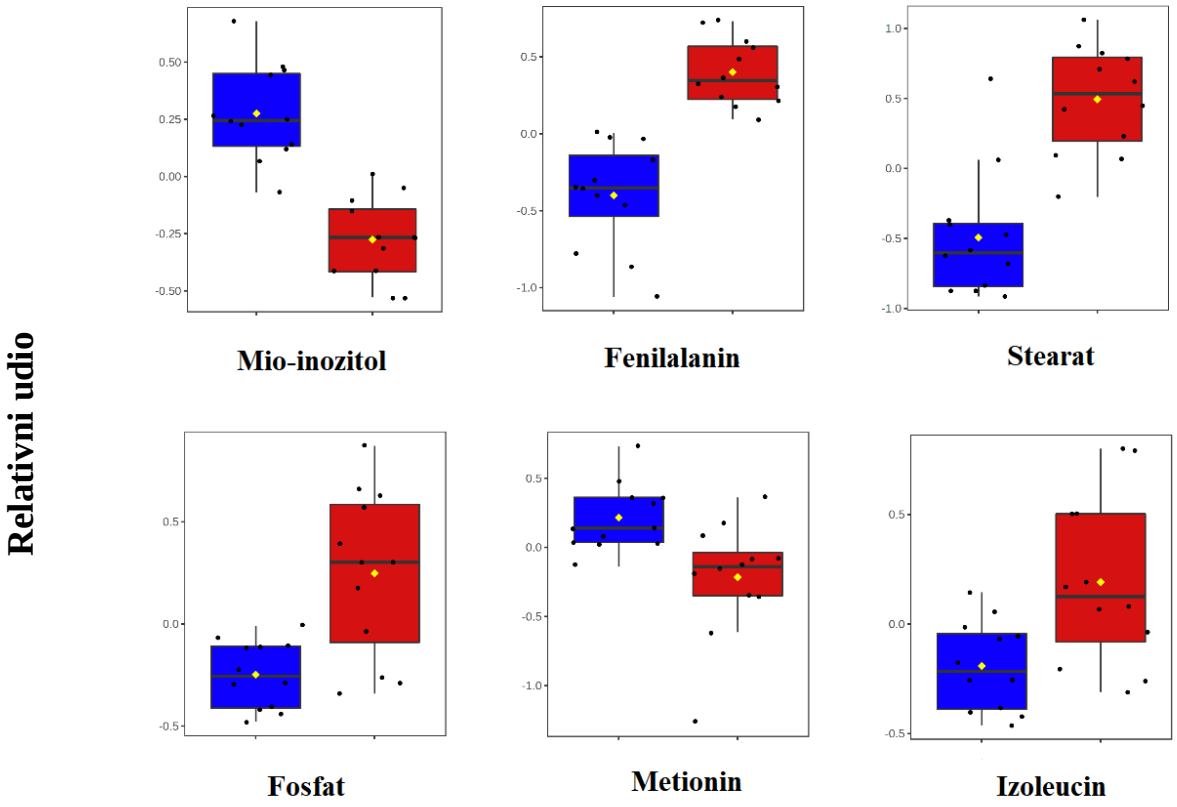
Ukupno su 24 uzorka seruma pasa analizirana GC-MS-metabolomskim pristupom: 12 uzoraka seruma invadiranih pasa i 12 kontrolnih uzoraka. Obradom rezultata u tim je uzorcima identificirano 26 metabolita. Pripadajući relativni udjeli pojedinog metabolita u ekstraktu seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* izraženog u postotku pokazani su u dodatku pod **Tablicom III i IV**. Većina identificiranih metabolita bile su aminokiseline, ali su bile zastupljene i organske kiseline, anorganski spoj, ugljikohidrati, masne kiseline te šećerni alkoholi (**Tablica 7**).

Tablica 7. Metaboliti identificirani u uzorcima seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* GC-MS-metabolomskom analizom.

Metaboliti	Skraćeno ime	HMDB ID	Kemijska grupa
Laktat	Lac	00190	Organska kiselina
Alanin	Ala	00161	Aminokiselina
Glicin	Gly	00123	Aminokiselina
Piruvat	-	00243	Organska kiselina
3-hidroksibutirat	-	00011	Organska kiselina
Valin	Val	00883	Aminokiselina
Urea	-	00294	Organska kiselina
Glicerol	-	00131	Ugljikohidrati
Fosfat	-	-	Anorganski spoj
Izoleucin	Ile	00172	Aminokiselina
Prolin	Pro	00162	Aminokiselina
Serin	Ser	00187	Aminokiselina
Treonin	Thr	00167	Aminokiselina
Metionin	Met	00696	Aminokiselina
L-Prolin	L-Pro	00162	Aminokiselina
Glutamat	Glu	00148	Organska kiselina
Fenilalanin	Phe	00159	Aminokiselina
Izoleucil-glutamin	Ile-Gln	28905	Aminokiselina
Citrat	CA	00094	Organska kiselina
Glukoza	Glc	00122	Ugljikohidrati
Lizin	Lys	00182	Aminokiselina
Tirozin	Tyr	00158	Aminokiselina
Galaktoza	Gal	00143	Ugljikohidrati
Palmitat	-	00220	Masne kiseline
Mio-inozitol	MI	00211	Šećerni alkohol
Stearat	-	00827	Masne kiseline

HMDB ID = identifikacijska oznaka prema bazi podataka o metabolomu čovjeka

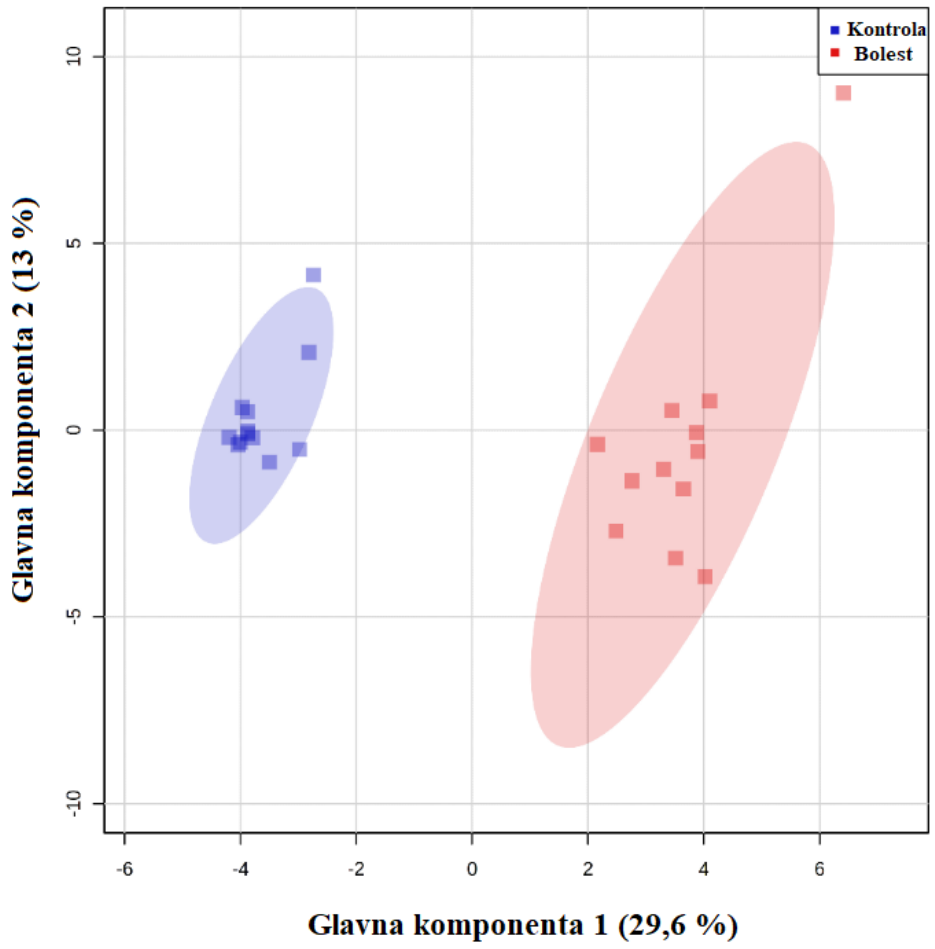
Statističkom je u serumu invadiranih pasa analizom otkriveno šest metabolita značajno promijenjenog udjela u odnosu na zdrave pse. Relativni udjeli mio-inozitola i metionina u zdravih pasa bili su sniženi, dok su relativni udjeli fenilalanina, stearata, fosfata i izoleucina bili povišeni (**Slika 6**).



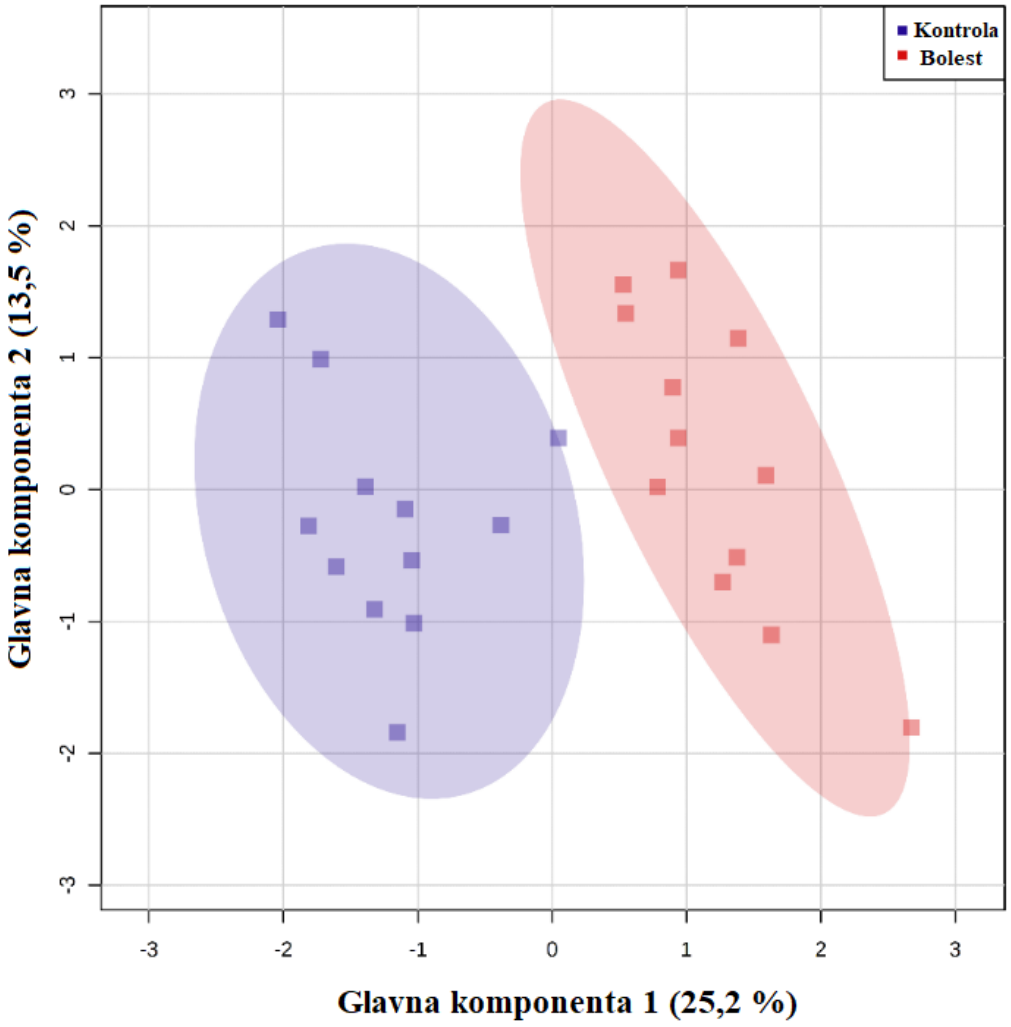
Slika 6. Usporedba relativnog udjela pojedinog značajno promijenjenog metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranog u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* GC-MS-metabolomskom analizom. Plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke, dok crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke seruma invadiranih pasa. Prikazani metaboliti pokazali su statistički značajnu razliku između skupina prema *t*-testu (p <0,05). Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

4.1.4 Analiza glavnih komponenata seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis*

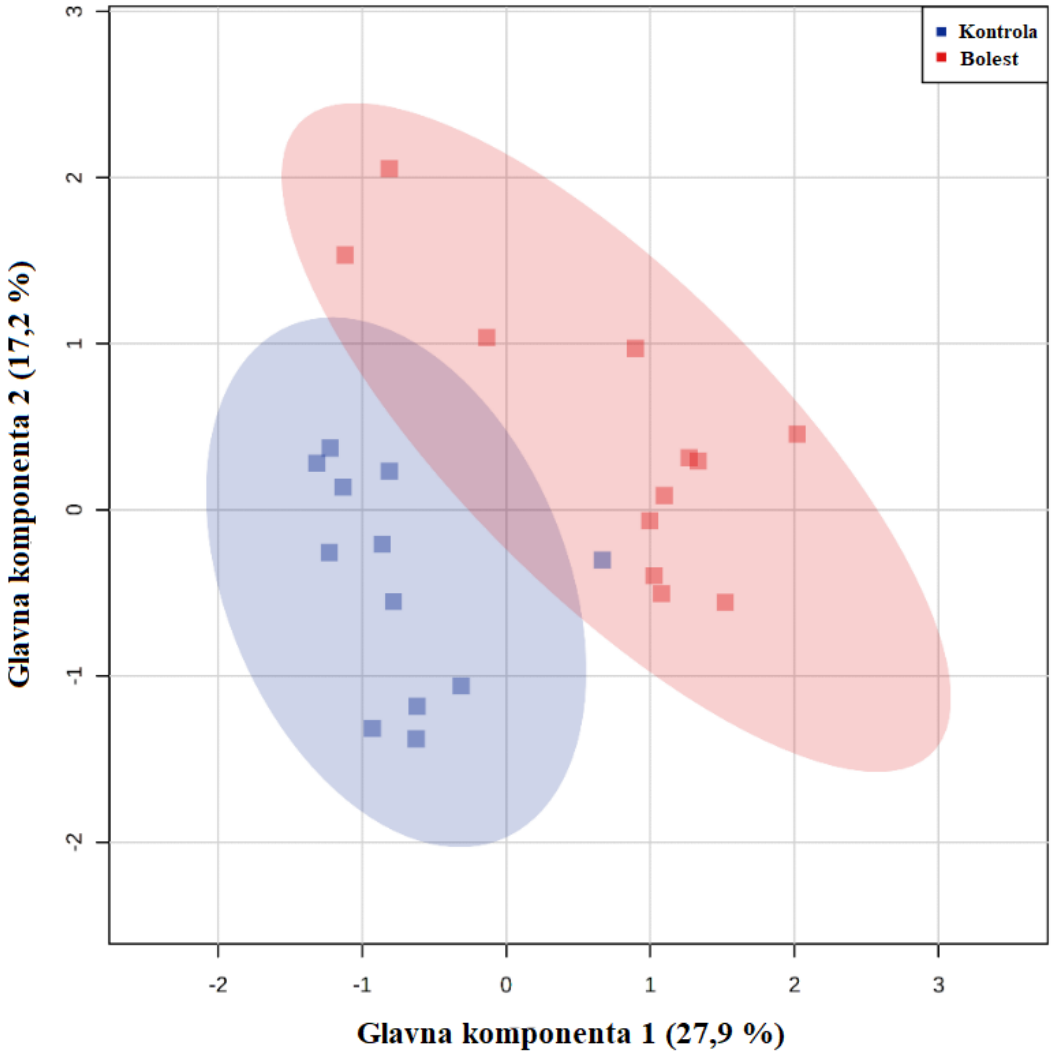
PCA-analizom istražene su unutarnje varijacije i odstupanja između dviju skupina uzoraka seruma analiziranih tehnikama LC-MS (neciljani i ciljani pristup) i GC-MS. Rezultati analize potvrdili su jasnu razdvojenost između analiziranih podataka dviju eksperimentalnih skupina istraživanih neciljanom i ciljanom LC-MS-analizom te metabolomskom GC-MS-analizom. Također, nisu zamijećena odstupanja u rezultatima između skupine zdravih pasa i skupine pasa invadiranih parazitom *B. canis* (**Slika 7**).



(a)


Kontrola
Bolest
Glavna komponenta 2 (13,5 %)
Glavna komponenta 1 (25,2 %)
-3
-2
-1
0
1
2
3

(b)

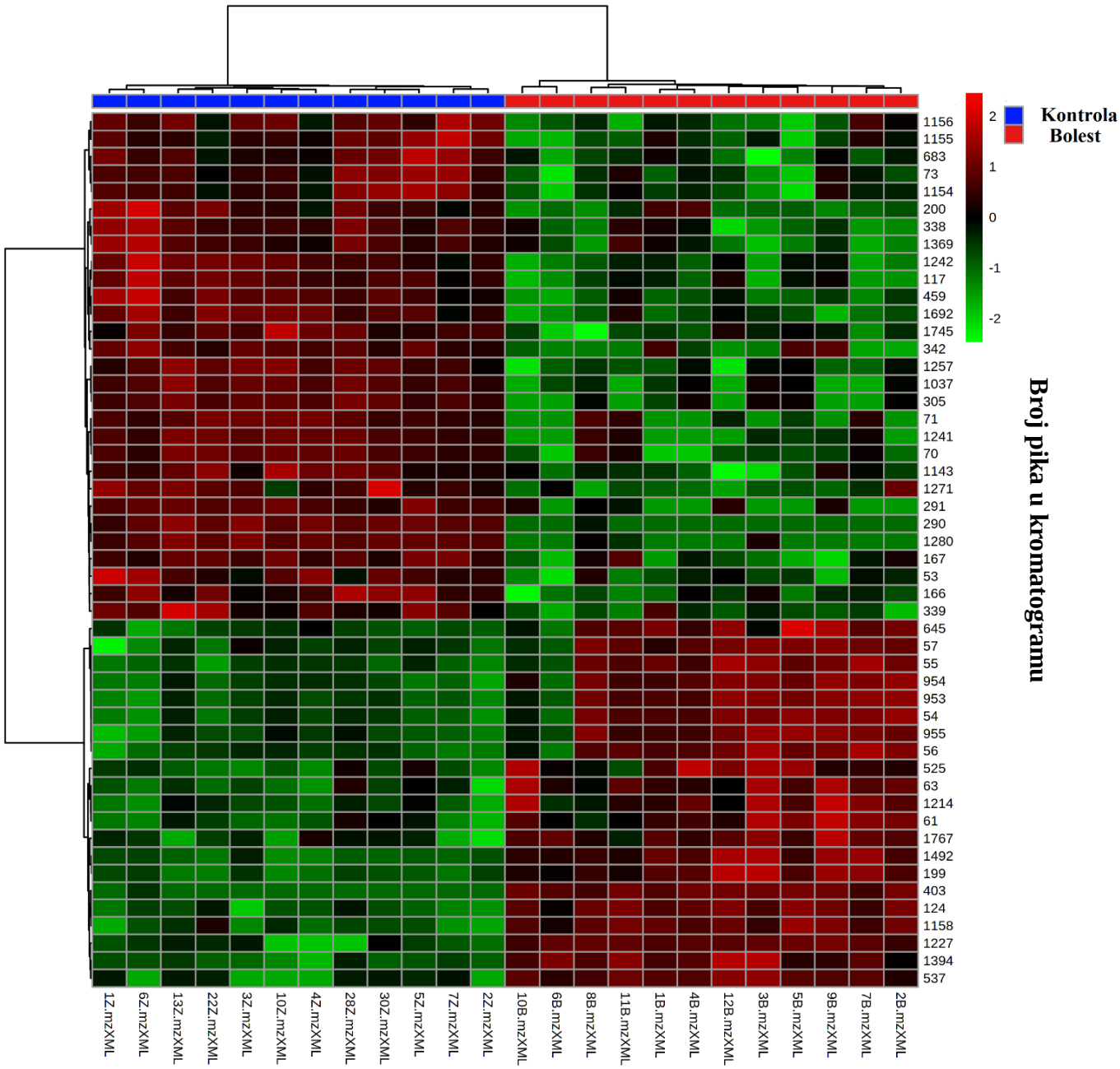


(c)

Slika 7. Rezultati analize glavnih komponenata u uzorcima seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* (*n* = 12) i zdravih pasa (*n* = 12) analiziranih neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (a), ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (b) i GC-MS-metabolomskom analizom (c). Plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke, dok crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke seruma invadiranih pasa.

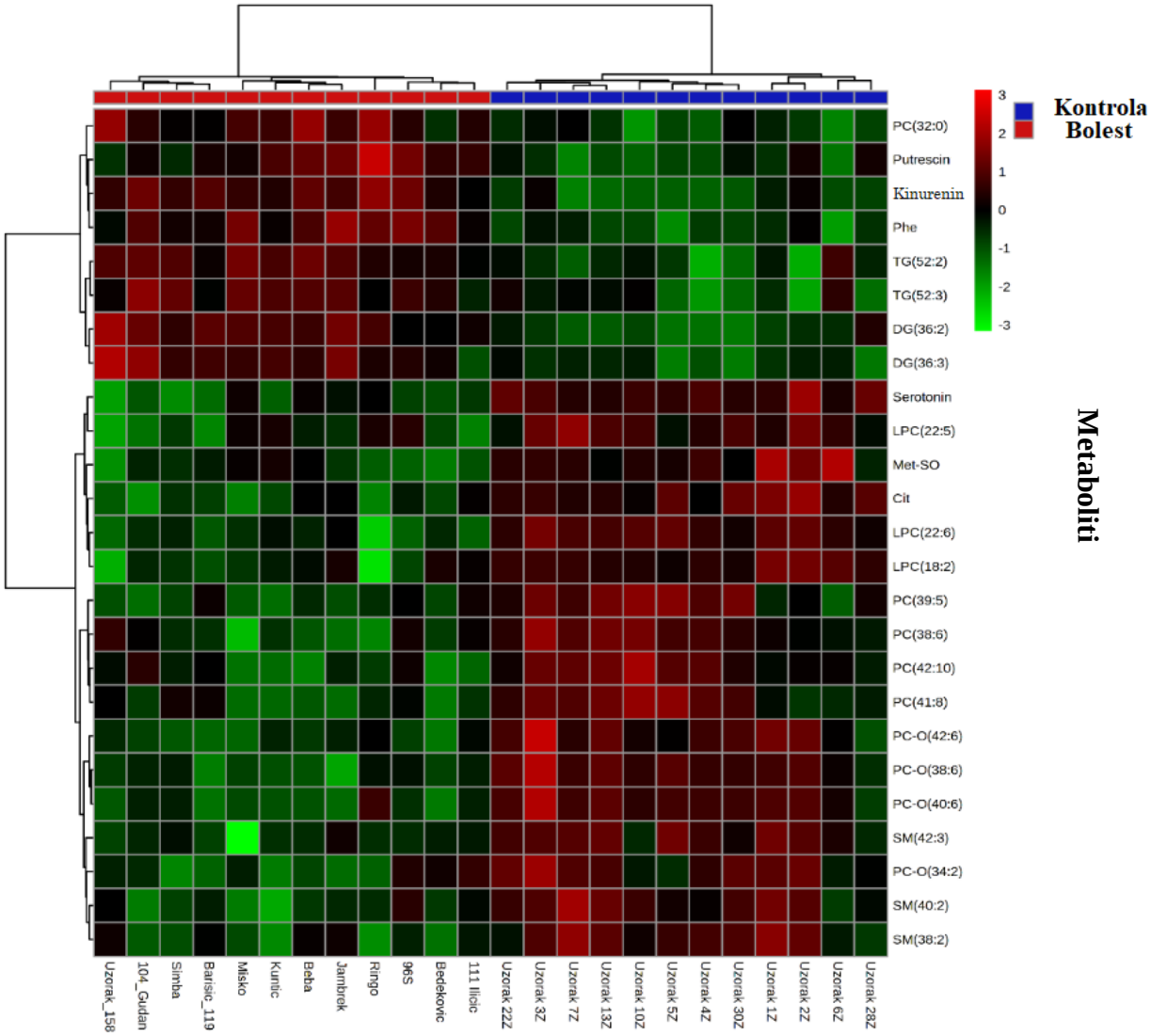
4.1.5 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Toplinske mape prikazale su grupiranja kromatografskih pikova detektiranih neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom i grupiranja metabolita identificiranih ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom i GC-MS-metabolomskom analizom. Hijerarhijsko grupiranje izvedeno je na temelju podataka o intenzitetima pikova detektiranih neciljanom LC-MS-analizom i podataka o koncentracijama/udjelima metabolita određenih ciljanom LC-MS-analizom i GC-MS-analizom. Pikovi i metaboliti su rangirani prema *t*-testu parametarima za hijerarhijsko grupiranje kao što su euklidska mjera udaljenosti te Wardov algoritam za grupiranje. **Slika 8** prikazuje ispravno grupiranje uzoraka analiziranih neciljanom i ciljanom LC-MS-analizom i GC-MS-analizom.



Uzorci seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis*

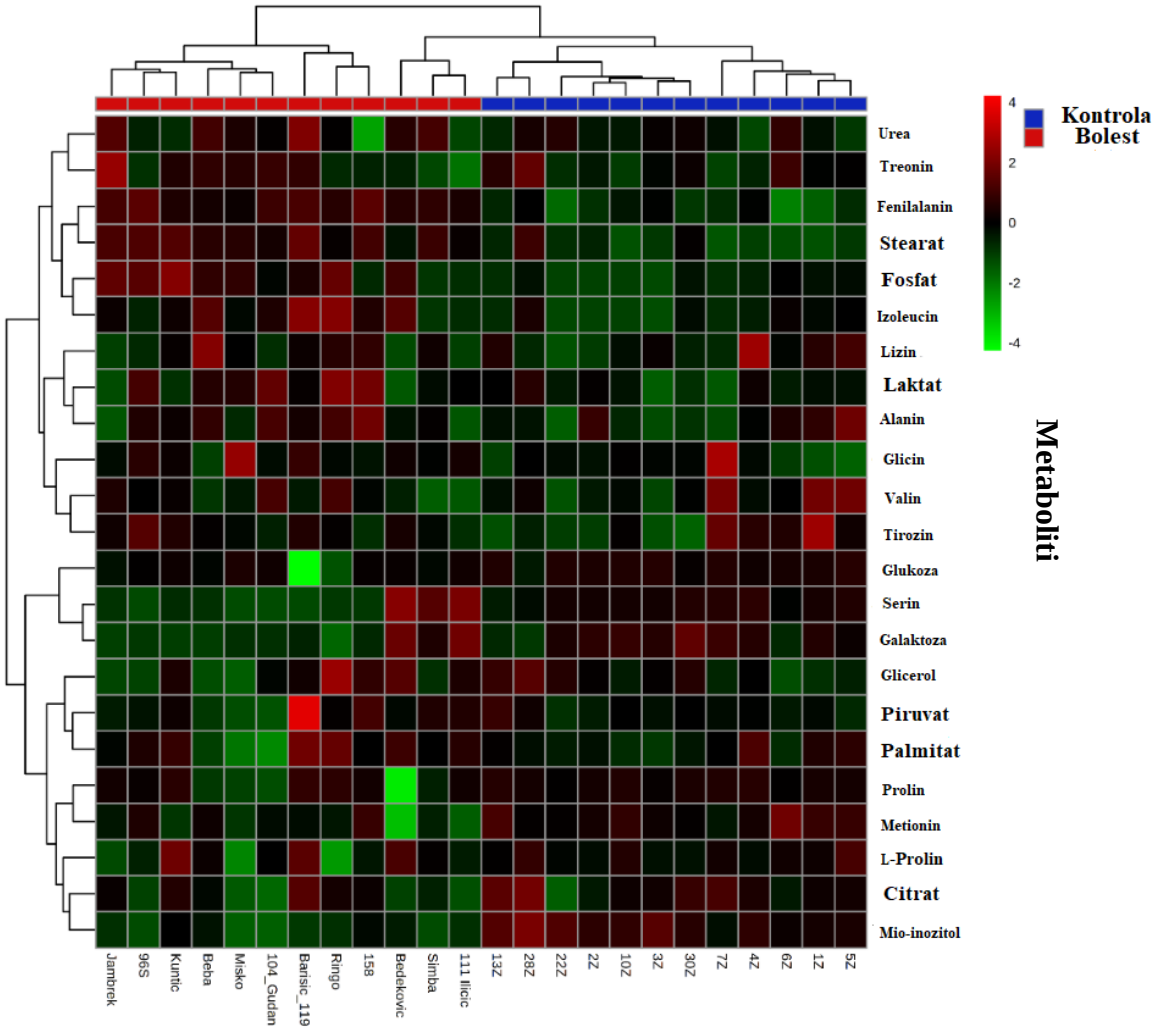
(a)



Uzorci seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis*

PC – fosfatidilkolini
TG – trigliceridi
DG – digliceridi
LPC – lizofosfatidilkolini
SM – sfingomijelini

(b)



Uzorci seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis*

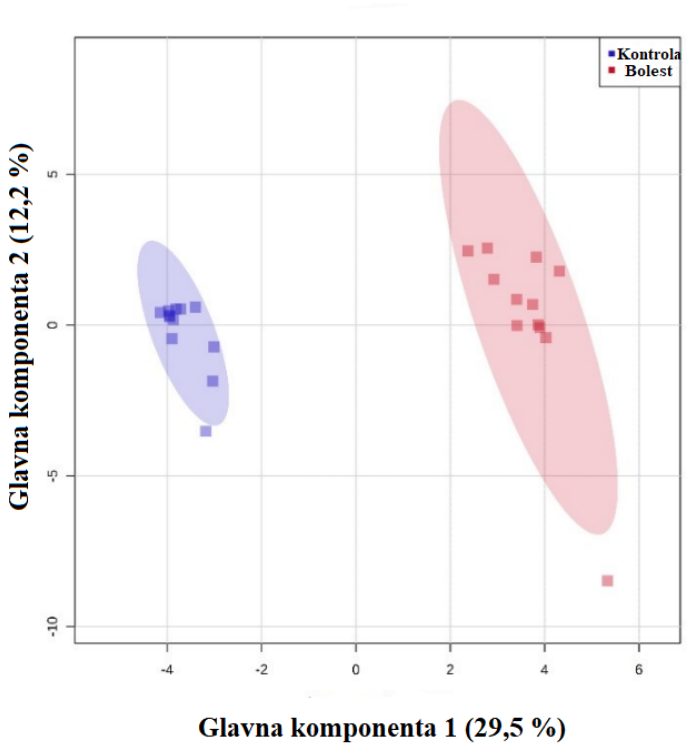
(c)

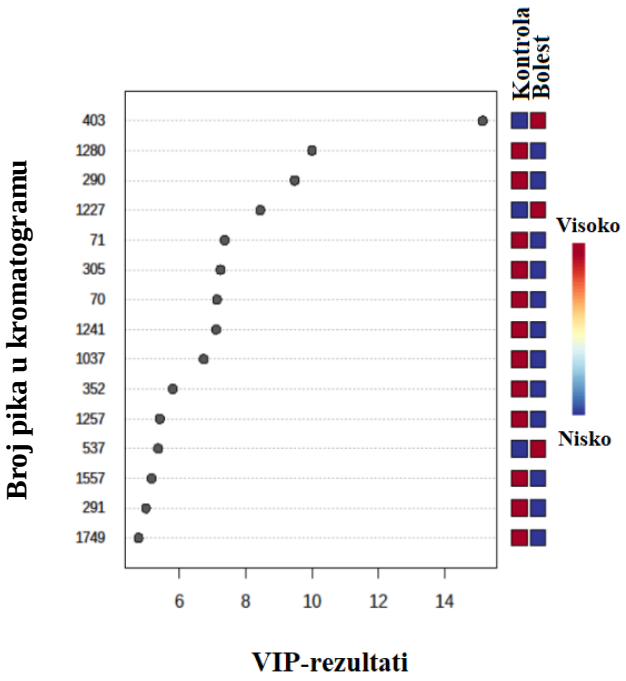
Slika 8. Toplinske mape kromatografskih pikova detektiranih neciljanom LC-MS-analizom (a), metabolita identificiranih ciljanom LC-MS-analizom i GC-MS-analizom (b, c). Crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis*, dok plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke. Nadalje, crvena boja označuje povišenu koncentraciju/udio pojedinog metabolita ili povećan intenzitet pika, dok zelena boja označuje sniženu koncentraciju/udio pojedinog metabolita ili smanjeni intenzitet pika u pasa invadiranih parazitom *B. canis* u odnosu na zdrave pse.

4.1.6 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu seruma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis*

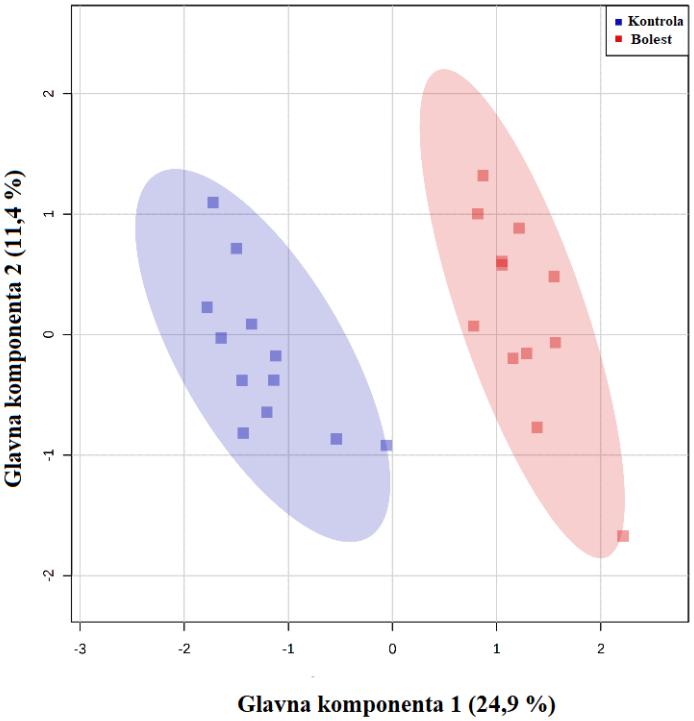
Diskriminantna analiza djelomičnih (parcijalnih) najmanjih kvadrata provedena je u svrhu identifikacije metabolita koji su najviše pridonijeli u razlikovanju metaboloma seruma zdravih pasa u odnosu na metabolom seruma invadiranih pasa. PLS-DA-analiza pokazala je jasnu podjelu između dviju eksperimentalnih skupina uključenih u istraživanje (**Slika 9, lijevi dio**).

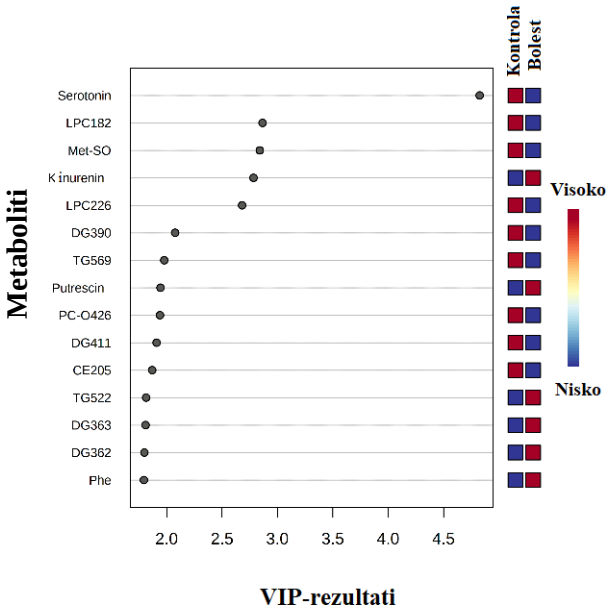
VIP-rezultati uputili su na 15 metabolita koji najviše pridonose razdvajanju u PLS-DA-analizi. Neki od važnih razlikovnih metabolita identificiranih neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom su: inozin (pik 1280, 290), hipoksantin (pik 70, 1241), kolin-fosfat (pik 352); ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom serotonin, metionin-sulfoksid, kinurenin, putrescin i fenilalanin; GC-MS-analizom stearat, fenilalanin, mio-inozitol, fosfat, metionin, galaktoza i izoleucin (**Slika 9, desni dio**).


Kontrola
Bolest
Glavna komponenta 2 (12,2 %)
Glavna komponenta 1 (29,5 %)


Broj pika u kromatogramu
403
1280
290
1227
71
305
70
1241
1037
352
1257
537
1557
291
1749
Kontrola
Bolest
Visoko
Nisko
VIP-rezultati

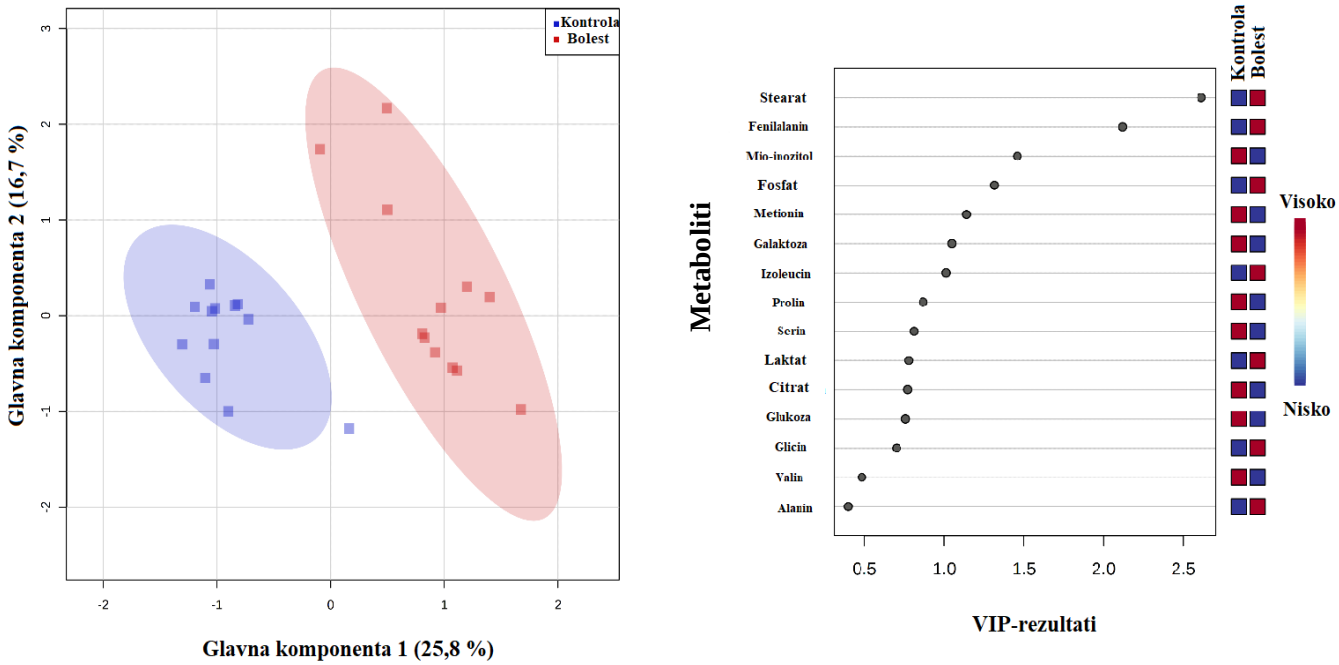
(a)





LPC – lizofosfatidilkolini
DG – digliceridi
TG – trigliceridi
PC – fosfatidilkolini
CE – ceramidi

(b)

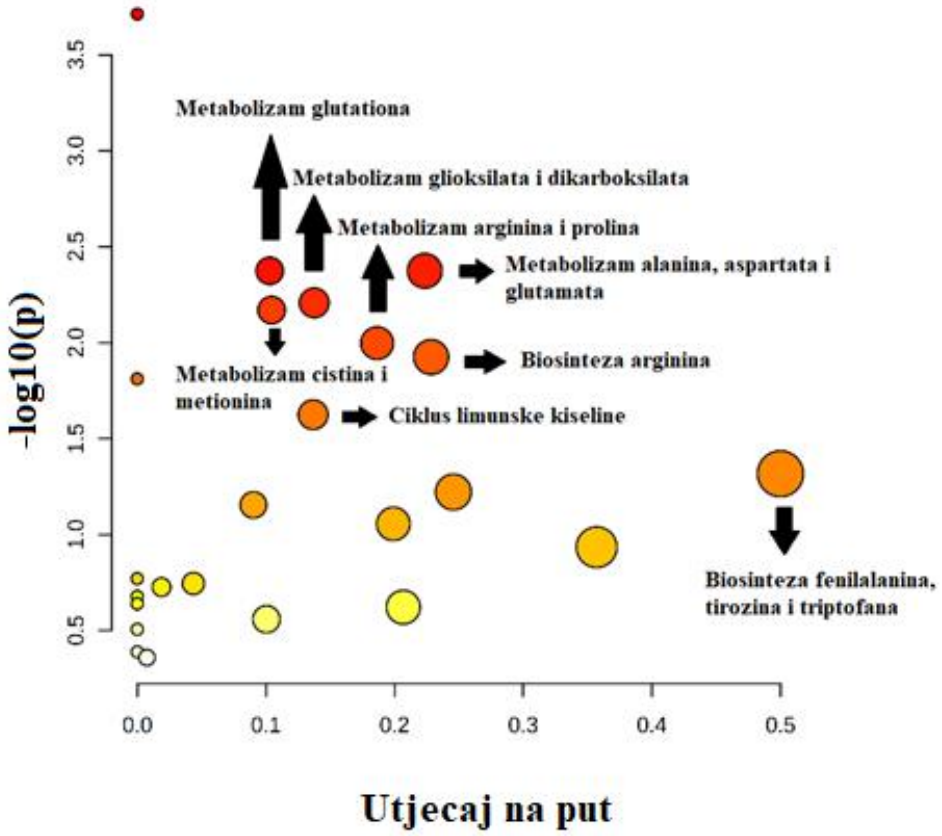


(c)

Slika 9. Rezultati PLS-DA-analize metabolita identificiranih u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* (*n* = 12) i zdravih pasa (*n* = 12) identificiranih neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (a), ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (b) te GC-MS-metabolomskom analizom (c). Crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke pasa invadiranih parazitom *B. canis*, a plavo obojeni okviri kontrolne uzorke. Nadalje, crvena boja označuje povišenu koncentraciju/udio svakog metabolita ili povećani intenzitet pika, dok plava boja predstavlja sniženu koncentraciju/udio svakog metabolita ili smanjeni intenzitet pika u pasa invadiranih parazitom *B. canis* u odnosu na zdrave pse.

4.1.7 Analiza metaboličkih puteva na temelju metabolita određenih u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Identificirani i značajno promijenjeni metaboliti otkriveni neciljanom i ciljanom LC-MS-analizom te GC-MS-analizom korišteni su za istraživanje nereguliranih metaboličkih puteva softverom MetaboAnalyst v.4.0. Analiza metaboličkih puteva omogućila je uvid u značajno promijenjene metaboličke puteve kod babezioze i metabolite uključene u njih. Najznačajnije promijenjeni metabolički putevi su: metabolizam glutationa, metabolizam alanina, aspartata i glutamata, metabolizam glioksilata i dikarboksilata, metabolizam cisteina i metionina, zatim metabolizam arginina i prolina, biosinteza arginina, ciklus limunske kiseline te biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana (**Slika 10**). Identificirani metaboliti koji u njima sudjeluju prikazani su u **Tablici 8**.



Slika 10. Grafički prikaz promjena metaboličkih puteva određenih na temelju razlika u metabolitima identificiranim u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* u odnosu na zdrave pse. Raspon boja od žute do crvene predstavlja metabolite s različitim razinama značajnosti u odgovarajućem metaboličkom putu. Crne strelice označavaju najznačajnije promijenjene metaboličke puteve u pasa s babeziozom.

Tablica 8. Identificirani metaboliti uključeni u značajno promijenjene metaboličke puteve u pasa invadiranih parazitom *B. canis*.

Metabolički putevi	Značajno promijenjeni metaboliti (prema stupnju promjene)	Vrijednost *p*	Utjecaj na put
Metabolizam glutationa	5-oksoprolin (gore) Glicin (dolje) Putrescin (gore)	0,0073447	0,10
Metabolizam alanina, aspartata i glutamata	Citrat (dolje) Aspartat (gore) Piruvat (gore)	0,0073447	0,22
Metabolizam glioksilata i dikarboksilata	Piruvat (gore) Glicin (dolje) Citrat (dolje)	0,010697	0,14
Metabolizam cisteina i metionina	Cistin (dolje) Metionin (dolje) Piruvat (gore)	0,011653	0,10
Metabolizam arginina i prolina	Prolin (dolje) Putrescin (gore) Piruvat (gore)	0,017166	0,19
Biosinteza arginina	Citrulin (dolje) Aspartat (gore)	0,017204	0,23
Ciklus limunske kiseline	Piruvat (gore) Citrat (dolje)	0,034034	0,14
Biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana	Fenilalanin (gore)	0,048184	0,50

4.2. Istraživanje metabolita u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis*

4.2.1 Biokemijski podatci o analiziranim uzorcima urina

U istraživanju metaboloma urina sudjelovalo je ukupno 12 zdravih pasa i 22 psa prirodno invadirana parazitom *B. canis*. Psi invadirani parazitom *B. canis* podijeljeni su prema procjeni bubrežne funkcije u tri skupine. Skupina zdravih pasa (kontrolna skupina) i skupine pasa invadiranih parazitom *B. canis* usklađene su prema dobi i spolu. Biokemijski podatci i podatci o analiziranim uzorcima urina prikazani su u **Tablici 9**.

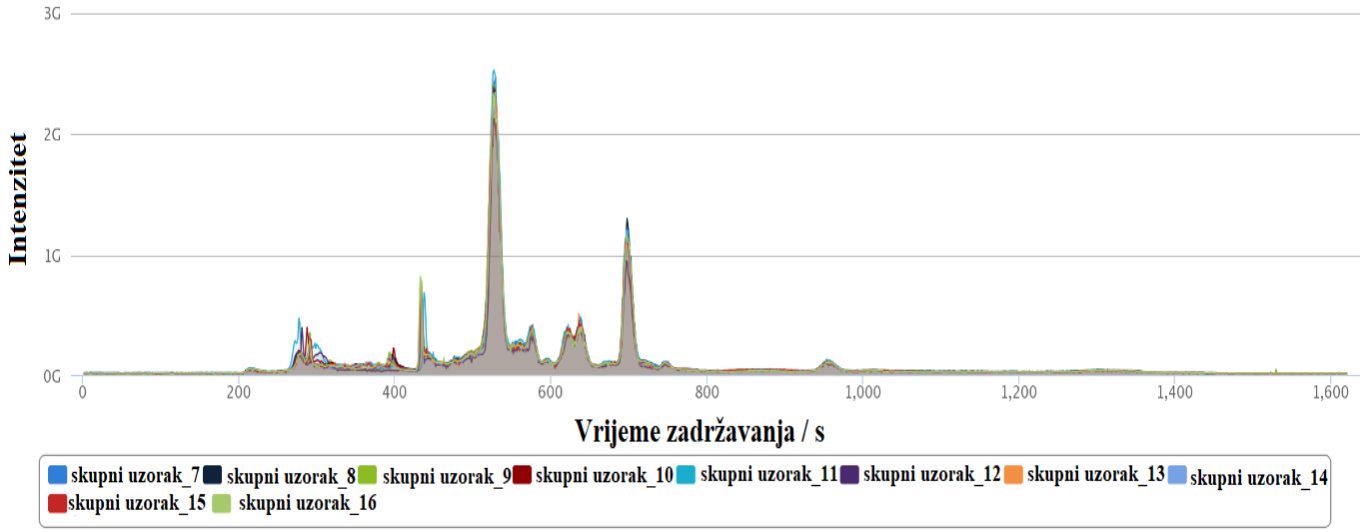
Tablica 9. Vrijednosti parametara u serumu i urinu neazotemičnih pasa s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5, skupina A), neazotemičnih pasa s babeziozom i vrijednosti UPC >0,5 (skupina B), azotemičnih pasa s babeziozom i vrijednosti UPC > 1 (skupina C) te zdravih pasa (kontrolna skupina).

Parametri (jedinica)	**Skupina A (*n* = 6)**	**Skupina B (*n* = 10)**	**Skupina C (*n* = 6)**	**Kontrolna skupina (*n* = 12)**	**Vrijednost *p***
Ukupni proteini / g L^{-1}	56,5 (53 – 62,3)	60,5 (56,8 – 62,3)	61 (48,5 – 69)	63 (48,5 – 69)	0,159
Albumin / g L^{-1}	26 (24,8 – 29,8)	28,5 (26,5 – 29,8)	26 (22,3 – 27,3)	30,5 (29,2 – 33,8)	0,003
Kreatinin u serumu / µmol L^{-1}	84,5 (66,8 – 154,5)	82 (59,8 – 102,8)	170 (138,8 – 296)	70 (64,5 – 85)	0,005
Bilirubin / µmol L^{-1}	7,1 (3,5 – 10,6)	8,7 (6,2 – 11,3)	20,4 (9,8 – 243,7)	2 (1,7 – 2,6)	< 0,001
Urea / mmol L^{-1}	4,85 (3,53 – 10,85)	6,1 (5,5 – 9,2)	19,6 (9,4 – 30,4)	5,3 (4,73 – 6,03)	0,004
Alanin aminotransferaza / U L^{-1}	37 (30 – 57,5)	62 (45 – 80)	55,5 (39,8 – 64,5)	39 (36 – 48,8)	0,254
Aspartat aminotransferaza / U L^{-1}	118 (33 – 141)	103,5 (65,5 – 168,5)	333 (140 – 396)	24 (19 – 48,5)	0,014
C-reaktivni protein / mg L^{-1}	162,9 (91 – 191,5)	132,9 (105,4 – 191,5)	159,8 (91,6 – 186)	3,4 (2 – 4,2)	< 0,001
Kreatinin u urinu / mmol L^{-1}	15,9 (9,4 – 22,7)	19,6 (8,1 – 29,4)	9,1 (4,5 – 14,7)	19,5 (13,4 – 30)	0,186
Omjer proteina i kreatinina (UPC)	0,28 (0,20 – 0,44)	1,54 (1,29 – 4,56)	4,17 (2,98 – 4,83)	0,09 (0,06 – 0,13)	< 0,001

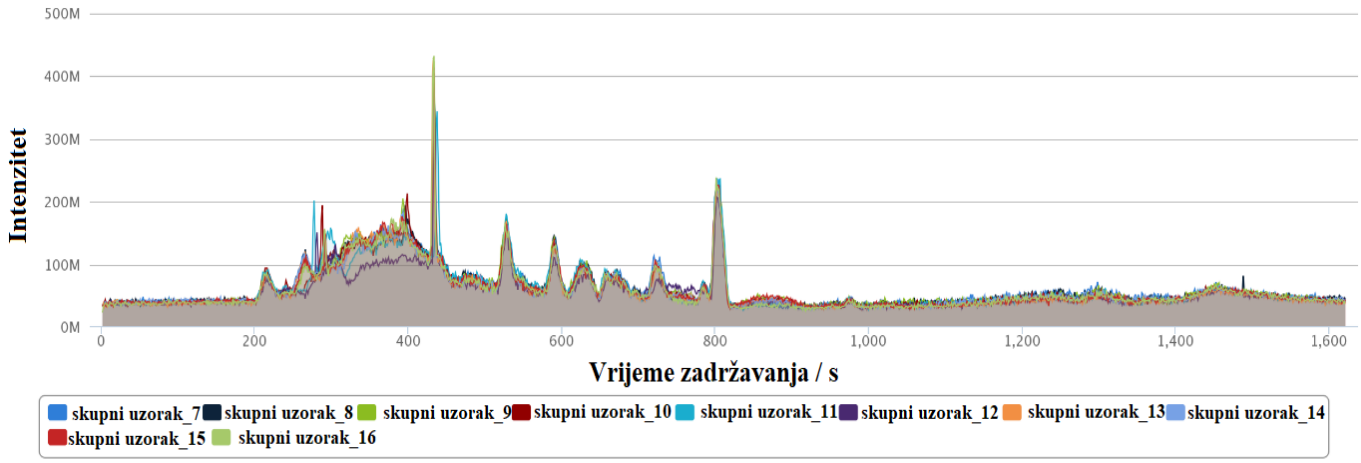
4.2.2 Neciljana LC-MS-metabolomska analiza urina pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Bioinformatičkom obradom rezultata neciljane LC-MS-analize metabolita u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis* softverom PiMP, detektirani pikovi označeni su s *annotated* ili su metaboliti identificirani prema molekulskoj masi i molekulskoj masi/vremenu zadržavanja u usporedbi s poznatim standardima. Ukupno je detektirano 3207 pikova, među kojima je identificirano 58 metabolita.

Ukupni ionski kromatogrami dali su pregled molekulskih masa metabolita iz ekstrakta urina zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* detektiranih instrumentom uz pozitivnu i negativnu ionizaciju (**Dodatak, Slike VI – XIII**). Uzorci su se u velikoj mjeri preklapali u istoj skupini, što je pokazatelj visoke reproducibilnosti instrumenta tijekom analize, odnosno dobrog eksperimenta. Također, skupni je uzorak u velikoj mjeri pokazao preklapanja u istoj skupini uzoraka, što znači da se radi o dobrom eksperimentu (**Slika 11**).



(a)



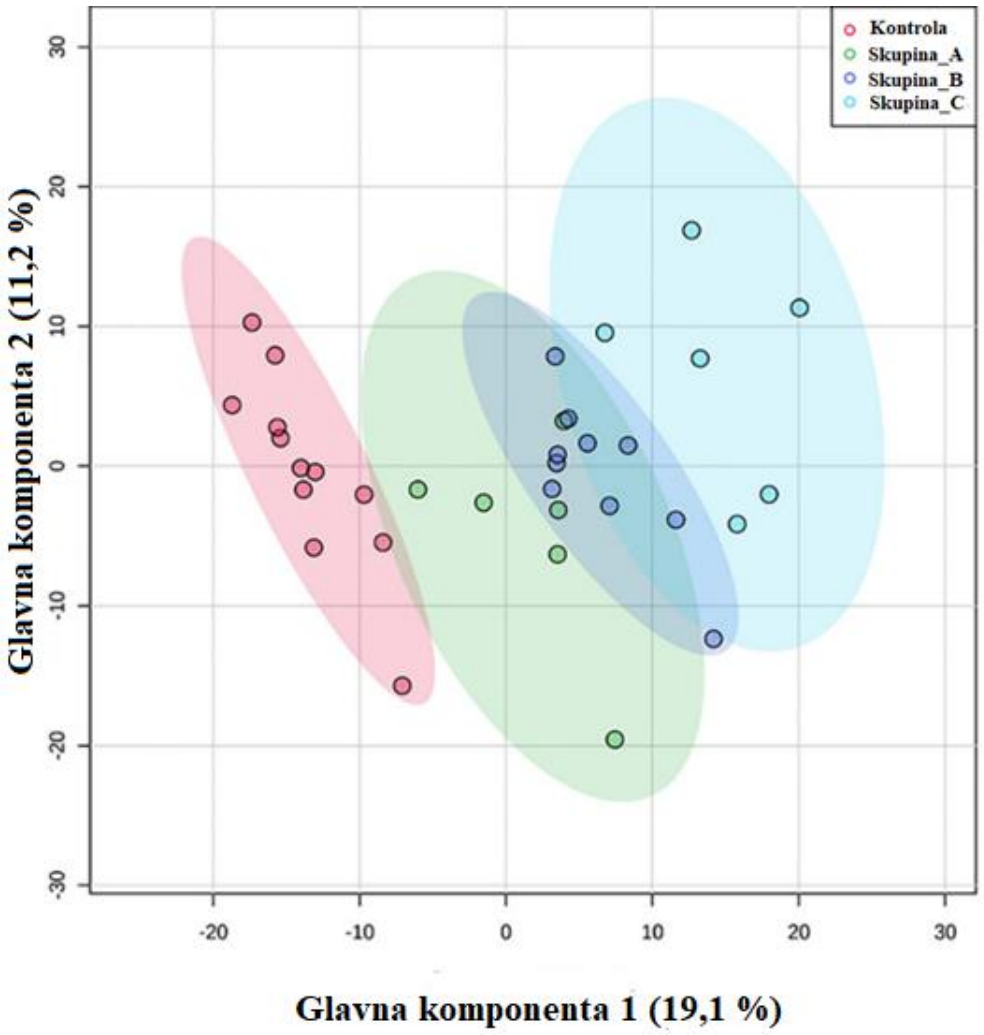
(b)

Slika 11. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta skupnog uzorka urina zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis* i promijenjenom funkcijom bubrega uz pozitivnu (a) i negativnu ionizaciju elektroraspršenjem (b). Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) skupnog uzorka.

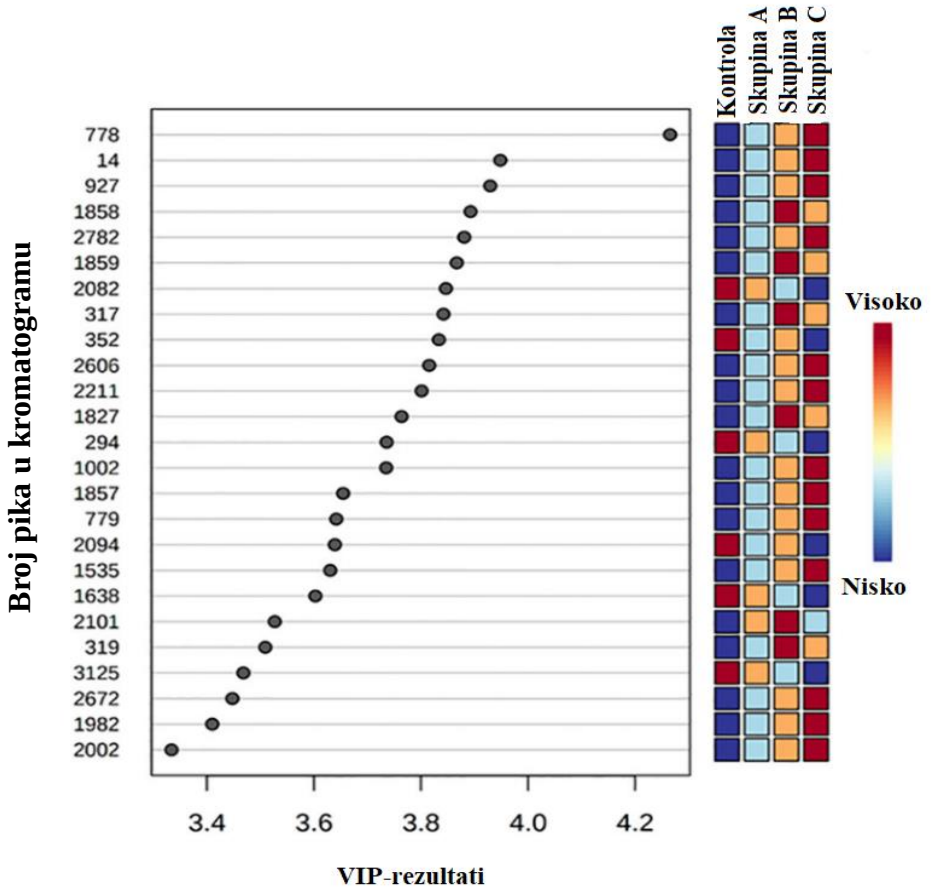
4.2.3 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu urina zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis*

PLS-DA-analizom prikazani su podatci podijeljeni po skupinama uključenima u istraživanje (**Slika 12**). Vidljiva je jasna podjela između zdravih pasa u kontrolnoj skupini i pasa s babeziozom, ali i jasna podjela skupine pasa C (azotemični psi s babeziozom i vrijednosti UPC >1) od ostalih skupina. Skupine pasa A (neazotemični psi s babeziozom i normalnim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5) i B (neazotemični psi s babeziozom i vrijednosti UPC >0,5) uglavnom su se preklapale.

VIP-rezultati prikazali su 25 pikova koji su najviše pridonijeli razlikovanju metaboloma urina zdravih pasa u odnosu na metabolom urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i s različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega. Također, prikazani su smanjeni ili povećani intenziteti odgovarajućih pikova u svakoj ispitivanoj skupini (**Slika 13**).



Slika 12. Rezultati PLS-DA-analize metabolita identificiranih neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom u urinu kontrolne skupine pasa (crveni krug) i urinu triju skupina pasa invadiranih parazitom *B.canis* i različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega (skupina A – zeleni krug, skupina B – tamnoplavi krug i skupina C – svjetloplavi krug). Skupina A – neazotemični psi s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5), skupina B – neazotemični psi s babeziozom i vrijednošću UPC >0,5 i skupina C – azotemični psi s babeziozom i vrijednošću UPC >1.

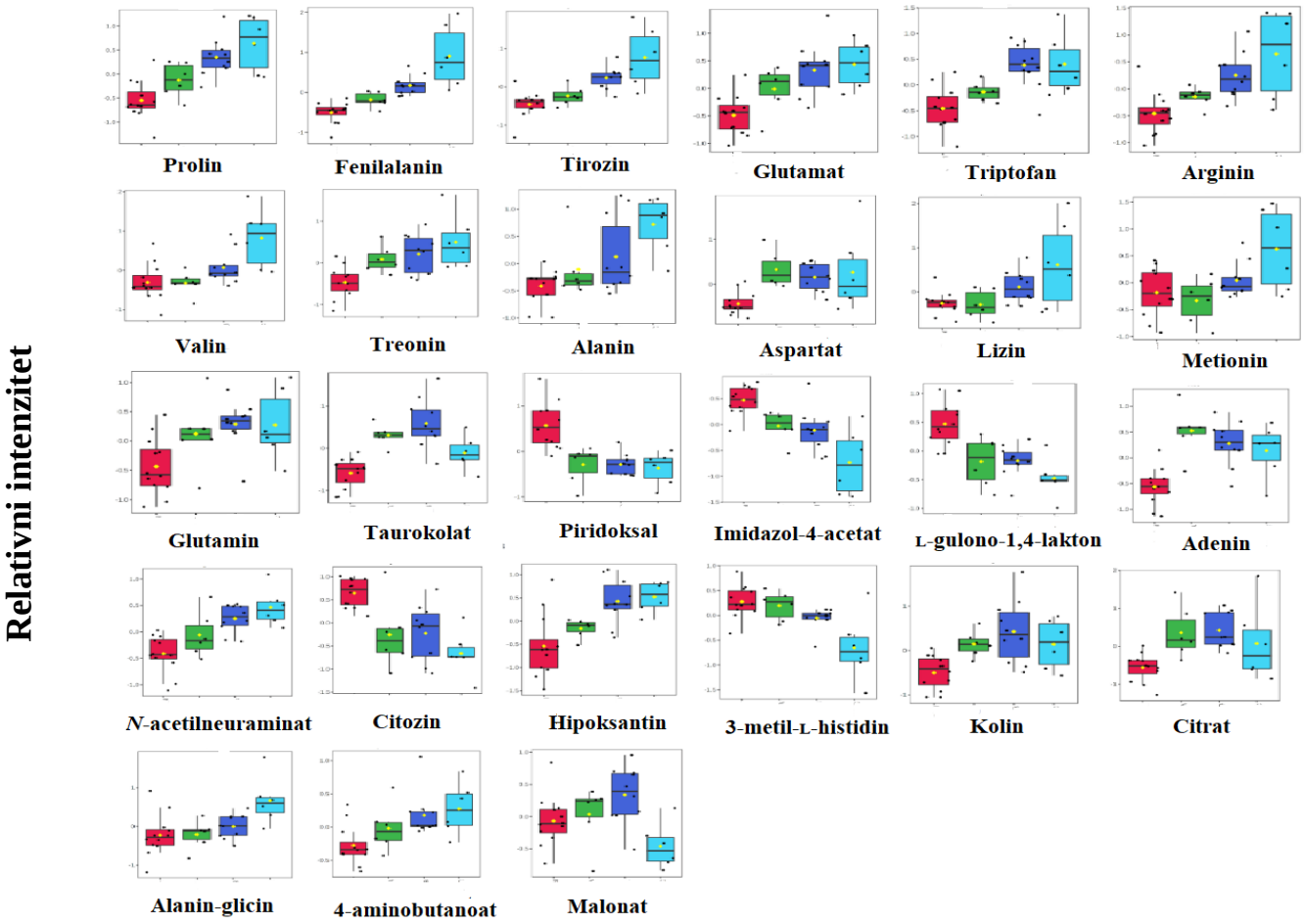


Slika 13. Grafički prikaz VIP-rezultata za 25 pikova detektiranih neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom koji su najviše pridonijeli u razlikovanju metaboloma urina zdravih pasa u odnosu na metabolom urina invadiranih pasa. Plavo obojeni okviri predstavljaju zdrave pse (kontrolni uzorci), svjetloplavo obojeni okviri neazotemične pse s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5, skupina A), narančasto obojeni okviri neazotemične pse s babeziozom i vrijednošću UPC >0,5 (skupina B), a crveno obojeni okviri azotemične pse s babeziozom i vrijednošću UPC >1 (skupina C). Crvena boja označuje povećani intenzitet, a plava boja smanjeni intenzitet određenog pika u pasa invadiranih parazitom *B. canis* u odnosu na zdrave pse.

4.2.4 Analiza varijancije metaboloma urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa

Metabolom urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa uspoređen je analizom varijancije. U istraživanim eksperimentalnim skupinama određen je 601 pik s različitom vrijednošću intenziteta. Među njima ukupno je 27 metabolita identificirano prema poznatim standardima, uključujući fenilalanin, prolin, tirozin, glutamat, triptofan, zatim piridoksal, adenin, *N*-acetilneuraminat, kolin, citrat i druge (**Slika 14**).

Istraživanja su pokazala da su citrat i malonat, metaboliti povezani s ciklusom limunske kiseline, značajno promijenjeni. Važno je istaknuti da se koncentracija metabolita malonata u neazotemičnih pasa s UPC >0,5 značajno povisila u odnosu na kontrolnu skupinu, za razliku od skupine C (azotemični psi s UPC >1) gdje je ustanovljena značajno snižena koncentracija malonata u usporedbi sa skupinama A i B. U urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis*, ustanovljene su i više koncentracije purina, adenina i hipoksantina, dok je u slučaju citozina uočena niža koncentracija u pasa s babeziozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Izlučivanje taurokolata bilo je povećano u svim skupinama pasa s babeziozom u odnosu na kontrolnu skupinu, ali kada se usporede skupine pasa s babeziozom međusobno, izlučivanje je bilo veće u skupini B nego u skupini C. Za piridoksal i L-gulono-1,4-lakton primijećene su niže koncentracije u urinu svih skupina pasa s babeziozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracije kolina u urinu svih skupina pasa s babeziozom bile su više u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Također, koncentracija *N*-acetilneuraminata bila je viša u urinu svih skupina pasa invadiranih parazitom *B. canis* nego u kontrolnih pasa, kao i u skupini invadiranih pasa C u odnosu na skupinu A.

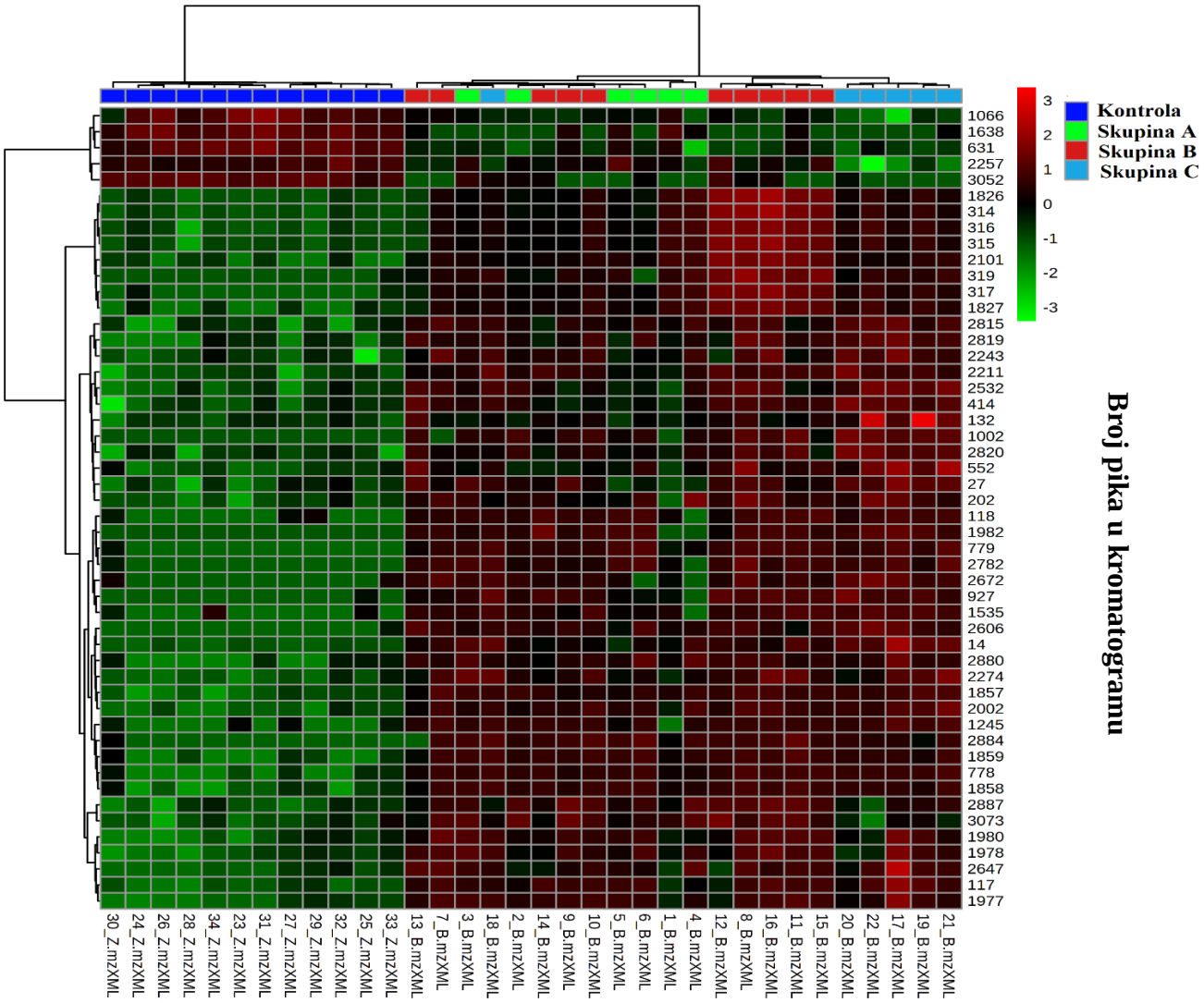


Slika 14. Usporedba relativnog intenziteta pikova značajno promijenjenih metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranih u urinu pasa invadiranih *B. canis* i zdravih pasa neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom. Skupina A (zeleni okviri) – neazotemični psi s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina (UPC <0,5), skupina B (tamnoplavi okviri) – neazotemični psi s babeziozom i UPC >0,5, skupina C (svjetloplavi okviri)) – azotemični psi s babeziozom i UPC >1 i kontrolna skupina (zdravi psi, crveni okviri). Prema ANOVA-i, svi se prikazani metaboliti statistički značajno razlikuju među skupinama. Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

4.2.5 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) urina pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Hijerarhijskim je grupiranjem prikazana raspodjela najznačajnijih pikova koji razdvajaju četiri skupine pasa uključene u istraživanje. Pikovi su rangirani prema ANOVA-i, a korišteni su parametri euklidska mjera udaljenosti i Wardov algoritam za grupiranje. Analizom su pokazane jasne razlike u intenzitetu pikova između kontrolne skupine i triju skupina pasa invadiranih parazitom *B. canis,* ali sa suptilnijim promjenama među trima skupinama s babeziozom.

Skupina A (zelena ploča)) – neazotemični psi s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina (UPC <0,5), skupina B (crvena ploča) – neazotemični psi s babeziozom i UPC >0,5, i skupina C (svjetloplava ploča)) – azotemični psi s babeziozom i UPC >1. Svaki obojeni kvadratić na karti predstavlja vrijednost intenziteta odgovarajućih pikova, pri čemu crvena boja znači povećani, a plava smanjeni intenzitet pika (**Slika 15**).



Uzorci urina zdravih pasa i triju skupina pasa s babeziozom

Slika 15. Rezultati hijerarhijskog grupiranja za ukupno 50 značajno promijenjenih pikova detektiranih neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom urina kontrolne skupine pasa (zdravi psi, plava ploča) i triju skupina pasa s babeziozom i različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega (skupina A – zelena ploča, skupina B – crvena ploča i skupina C – svjetloplava ploča).

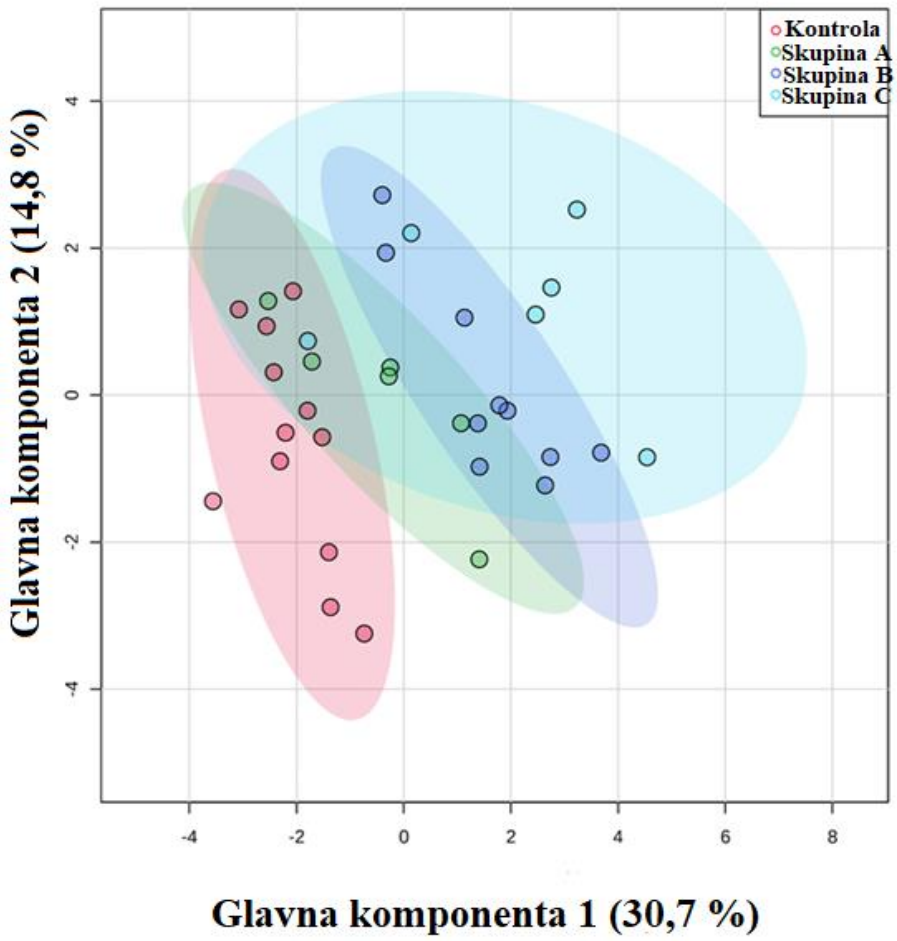
4.2.6 Ciljana LC-MS-metabolomska analiza urina pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Ciljana metabolomska analiza provedena je na uzorcima urina pasa kompletom kemikalija i potrošnog materijala Absolute IDQ-p400 Biocrates. Nakon probira valjanih vrijednosti metabolita u uzorcima urina svake skupine ukupno su 42 metabolita korištena za statističku analizu (**Dodatak, Tablice V** i **VI**). Kako je komplet kemikalija i potrošnog materijala Biocrates ponajprije namijenjen za istraživanja na uzorcima ljudske plazme, koncentracije nekih metabolita bile su izvan referencijskog raspona za urin, npr. za kreatinin.

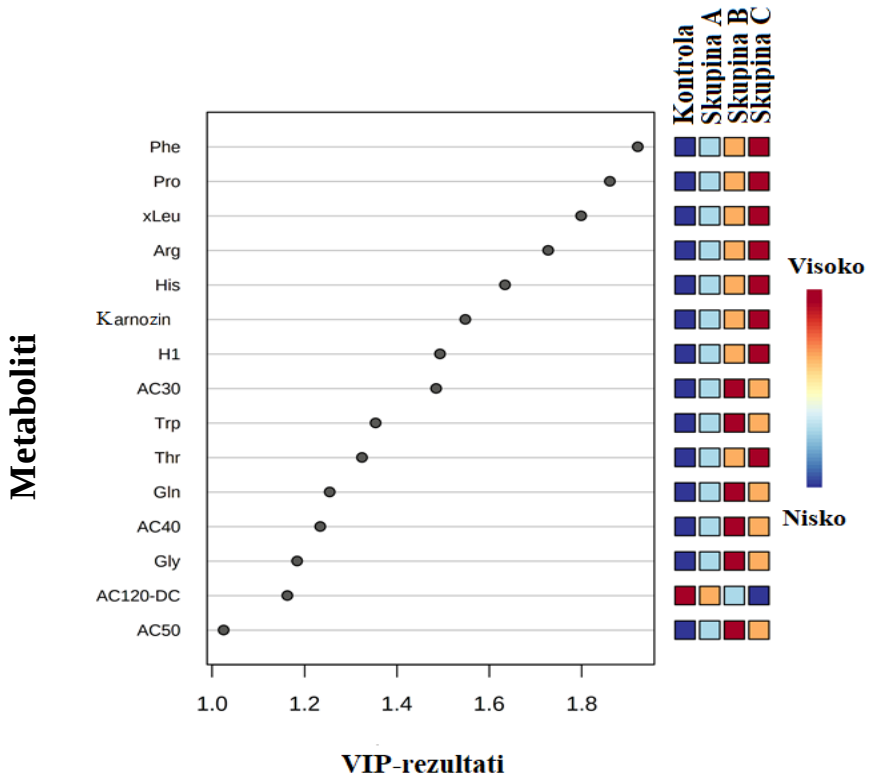
4.2.7 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu urina zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis*

PLS-DA-analiza metabolita identificiranih u urinu različitih skupina pasa pokazala je relativno jasnu podjelu između zdrave kontrolne skupine i skupine pasa s babeziozom, kao i preklapanje triju skupina pasa s različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega (**Slika 16**).

VIP-rezultati uputili su na 15 značajno promijenjenih metabolita obuhvaćenih PLS-DA-analizom koji su najviše pridonijeli razlikovanju metaboloma urina zdravih pasa od metaboloma urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i s različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega. Pet najznačajnije promijenjenih metabolita određenih ciljanom LC-MS-analizom bili su fenilalanin, prolin, izoleucin, arginin i histidin. Također, prikazane su snižene ili povišene koncentracije odgovarajućih metabolita u svakoj ispitivanoj skupini (**Slika 17**).



Slika 16. Rezultati PLS-DA-analize metabolita određenih ciljanom LC-MS-analizom u urinu pasa kontrolne skupine i pasa invadiranih parazitom *B. canis* i s različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega (skupina A – zeleni krug, skupina B – tamnoplavi krug i skupina C – svjetloplavi krug). Skupina A – neazotemični psi s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5), skupina B – neazotemični psi s babeziozom i vrijednošću UPC >0,5 i skupina C – azotemični psi s babeziozom i vrijednošću UPC >1.



AC – acil-karnitini

H1 – monosaharidi (heksoze)

Slika 17. Grafički prikaz VIP-rezultata za 15 metabolita određenih ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom koji su najviše pridonijeli u razlikovanju metaboloma urina zdravih pasa u odnosu na metabolom urina invadiranih pasa. Plavo obojeni okviri predstavljaju zdrave pse (kontrolni uzorci), svjetloplavo obojeni okviri neazotemične pse s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5, skupina A), narančasto obojeni okviri neazotemične pse s babeziozom i vrijednošću UPC >0,5, (skupina B), a crveno obojeni okviri azotemične pse s babeziozom i vrijednošću UPC >1 (skupina C). Crvena boja označuje povišenu koncentraciju, a plava boja sniženu koncentraciju određenog metabolita u pasa invadiranih parazitom *B. canis* u odnosu na zdrave pse.

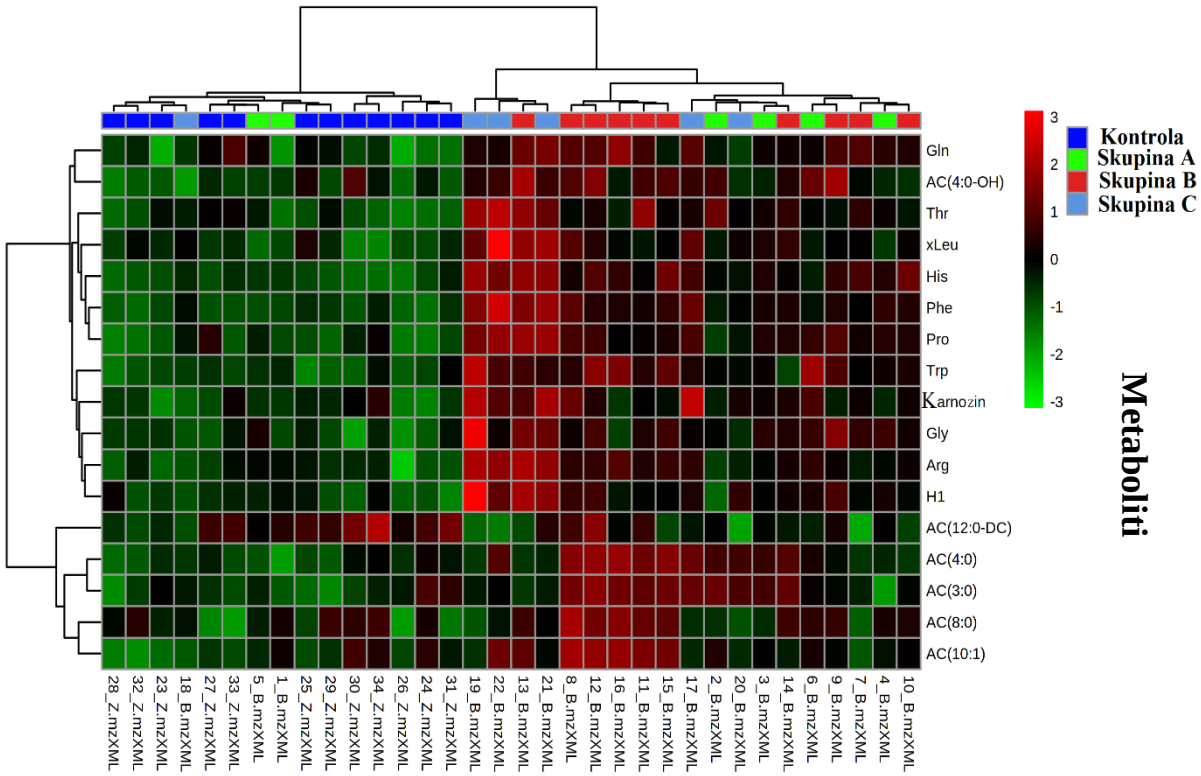
4.2.8 Analiza varijancije metaboloma urina pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Metabolom urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa uspoređen je analizom varijancije. U različitim eksperimentalnim skupinama identificirano je ukupno 17 metabolita značajno promijenjenih koncentracija, uključujući različite aminokiseline, heksoze, karnozine i acil-karnitine (**Dodatak, Slika I**).

Ukupno je devet aminokiselina izlučenih urinom značajno promijenjenih kod babezioze, među kojima je ukupno šest aminokiselina identificirano neciljanim i ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom. To su fenilalanin, prolin, triptofan, arginin, treonin i glutamin. Također, kod pasa invadiranih parazitom *B. canis* zabilježeno je povećano izlučivanje acil-karnitina kratkih lanaca (AC(3:0), AC(4:0), AC(4:0-0H)) i acil-karnitina srednjih lanaca (AC(8:0), AC(10:1)) te smanjeno izlučivanje acil-karnitina srednjeg lanca kao što je AC(12:0-DC).

4.2.9 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) urina pasa invadiranih parazitom *B. canis*

Hijerarhijskim je grupiranjem prikazana raspodjela značajno promijenjenih metabolita određenih ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom (**Slika 18**). Metaboliti su rangirani prema ANOVA-i, a korišteni su parametri euklidska mjera udaljenosti i Wardov algoritam za grupiranje. Analizom nisu pokazane jasne razlike između kontrolne skupine pasa i triju skupina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i s različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega. Također, međusobno nije jasna razlika između triju skupina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i s različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega. Razlog može biti u ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka te uvjetima prikupljanja uzoraka.



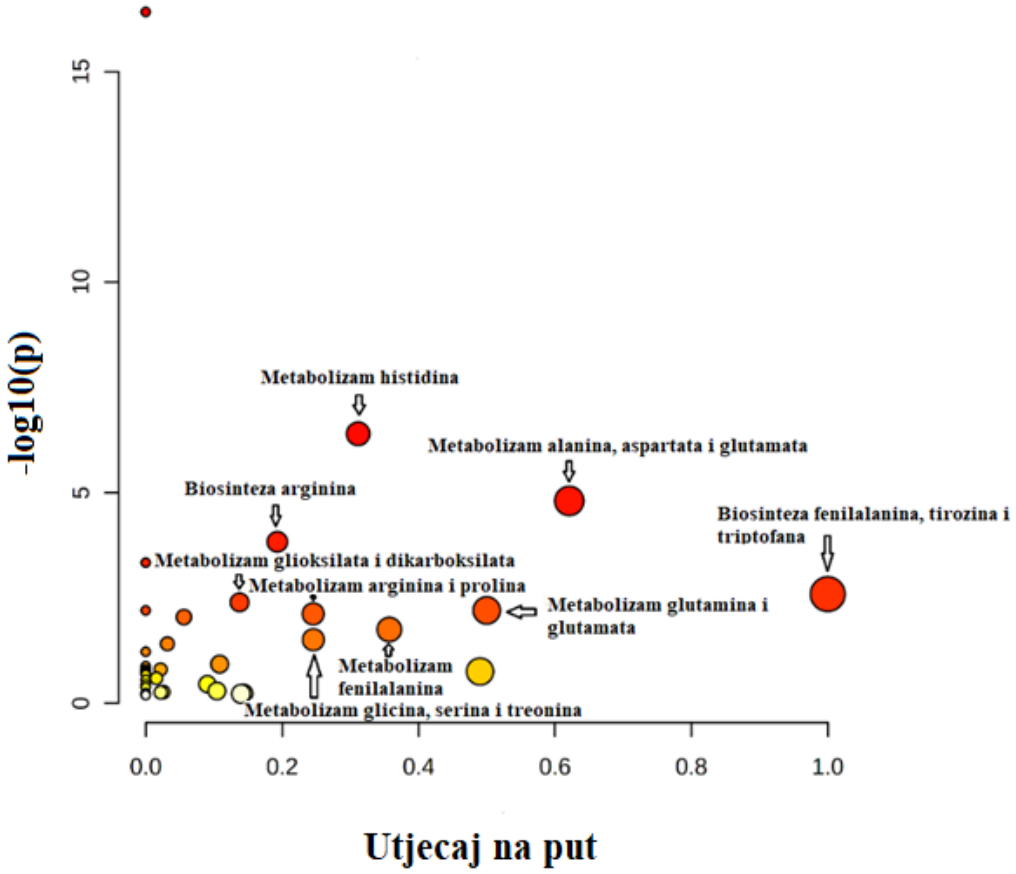
Uzorci urina zdravih pasa i triju skupina pasa s babeziozom

AC – acil-karnitini

Slika 18. Rezultati hijerarhijskog grupiranja značajno promijenjenih metabolita određenih ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom urina kontrolne skupine (zdravi psi, plava ploča) i triju skupina pasa s babeziozom i različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega. Skupina A (zelena ploča) – neazotemični psi s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina (UPC <0,5), skupina B (crvena ploča) – neazotemični psi s babeziozom i UPC >0,5, i skupina C (svjetloplava ploča) – azotemični psi s babeziozom i UPC >1. Svaki obojeni kvadratić na karti predstavlja vrijednost koncentracija odgovarajućih metabolita, pri čemu crvena boja znači povišenu, a zelena sniženu koncentraciju.

4.2.10 Analiza metaboličkih puteva na temelju metabolita određenih u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis*

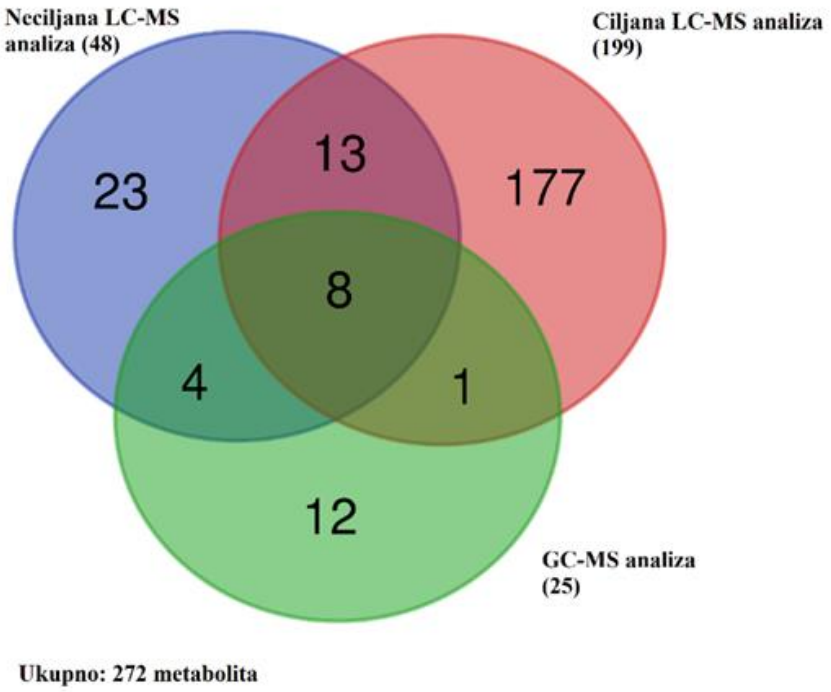
Ukupno su 43 značajno promijenjena metabolita određena neciljanom i ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom upotrijebljena za istraživanje nereguliranih metaboličkih puteva softverom MetaboAnalyst v.4.0. Analizom je otkriveno devet različitih metaboličkih puteva koji se smatraju značajnima za babeziozu. Metabolizam fenilalanina, metabolizam glicina, serina i treonina, metabolizam histidina, metabolizam alanina, aspartata i glutamata, biosinteza arginina, biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana, metabolizam glioksilata i dikarboksilata, metabolizam glutamina i glutamata te metabolizam arginina i prolina identificirani su kao značajno promijenjeni na temelju metaboloma urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* (**Slika 19**).



Slika 19. Grafički prikaz promjena metaboličkih puteva određenih na temelju razlika u metabolitima identificiranim u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis* u odnosu na zdrave pse. Raspon boja od žute do crvene predstavlja metabolite s različitim razinama značajnosti u odgovarajućem metaboličkom putu. Crne strelice označuju najznačajnije promijenjene metaboličke puteve u pasa s babeziozom.

4.3. Istraživanje metabolita u plazmi pasa s iDCM-om

U istraživanju pasa s dijagnosticiranim iDCM-om, primjenom neciljane i ciljane LC-MS-metabolomske analize i GC-MS-metabolomskom analizom ukupno su identificirana 272 različita metabolita (**Slika 20**).



Slika 20. Metaboliti identificirani u plazmi pasa s iDCM-om i zdravih pasa primjenom Vennova dijagrama. Neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom identificirano je 48 metabolita, ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom 199 metabolita, a GC-MS-metabolomskim pristupom identificirano je 25 metabolita. Ukupno su 272 metabolita identificirana primjenom svih triju analitičkih pristupa.

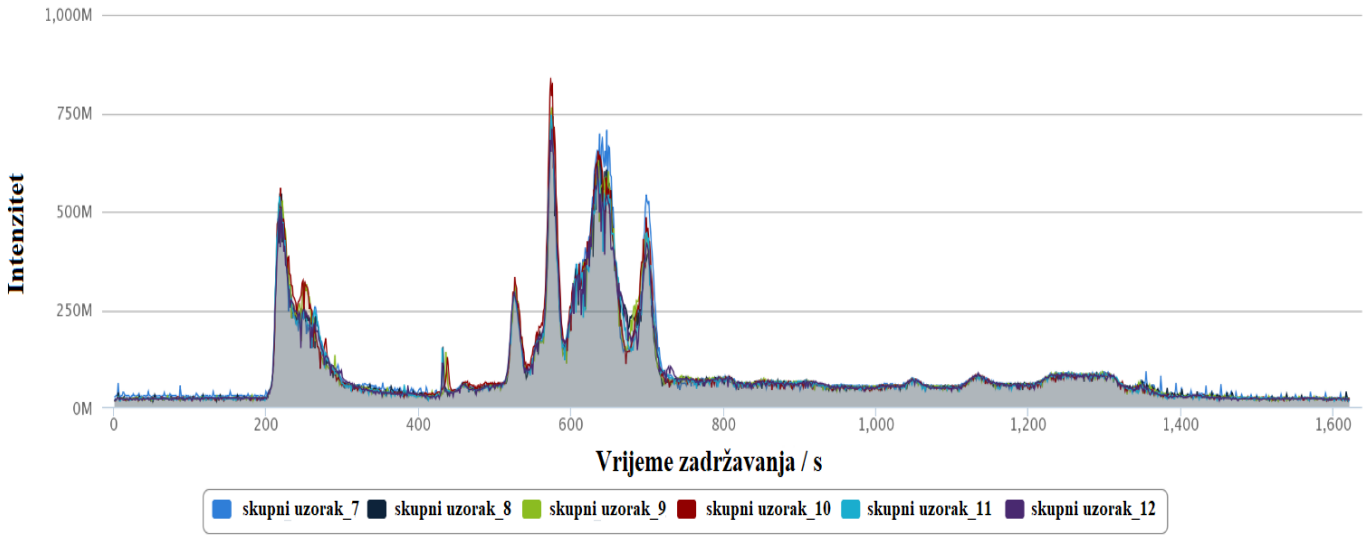
Vennov dijagram uputio je na identifikaciju 26 metabolita s više od jedne tehnike. Među njima je 13 metabolita detektirano LC-MS-analizom i GC-MS-analizom, 9 metabolita izmjereno je ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom i GC-MS-analizom i 21 metabolit neciljanim i ciljanim pristupom tehnikom LC-MS. Ukupno je 8 metabolita izmjereno primjenom svih triju analitičkih pristupa.

4.3.1 Neciljana LC-MS-metabolomska analiza plazme pasa s iDCM-om

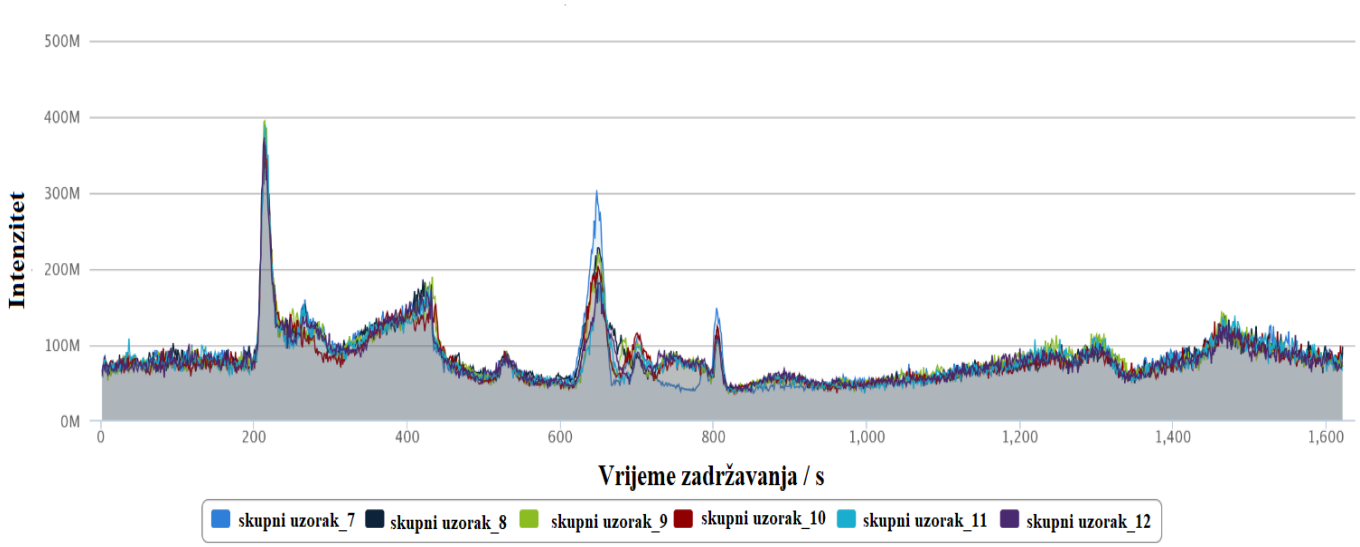
Neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom identificirani su u plazmi pasa metaboliti povezani s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom čime je dobiven uvid u metabolom plazme pasa s iDCM-om. U uzorcima plazme detektirano je 2636 pikova i 3291 mogućih metabolita. Među potencijalnim metabolitima ukupno je identificirano 48 metabolita prema poznatim standardima, dok su 3243 metabolita označena s *annotated* u softveru PiMP.

Ukupni ionski kromatogrami dali su pregled molekulskih masa metabolita iz ekstrakta plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om detektiranih instrumentom uz pozitivnu i negativnu ionizaciju (**Dodatak, Slike XIV – XVII**). Uzorci plazme pasa uključenih u istraživanje u velikoj su se mjeri preklapali u istoj skupini, što je pokazatelj visoke reproducibilnosti instrumenta tijekom analize. Također, skupni uzorak pokazao je u velikoj mjeri preklapanja u istoj skupini uzoraka, što znači da se radi o dobrom eksperimentu (**Slika 21**).

Statistička obrada rezultata pokazala je da je ukupno 397 pikova značajno promijenjeno. Među njima je identificirano ukupno 10 metabolita (**Tablica 10**).


1,000M
750M
500M
250M
0M
Intenzitet
0
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
Vrijeme zadržavanja / s
skupni uzorak_7
skupni uzorak_8
skupni uzorak_9
skupni uzorak_10
skupni uzorak_11
skupni uzorak_12

(a)



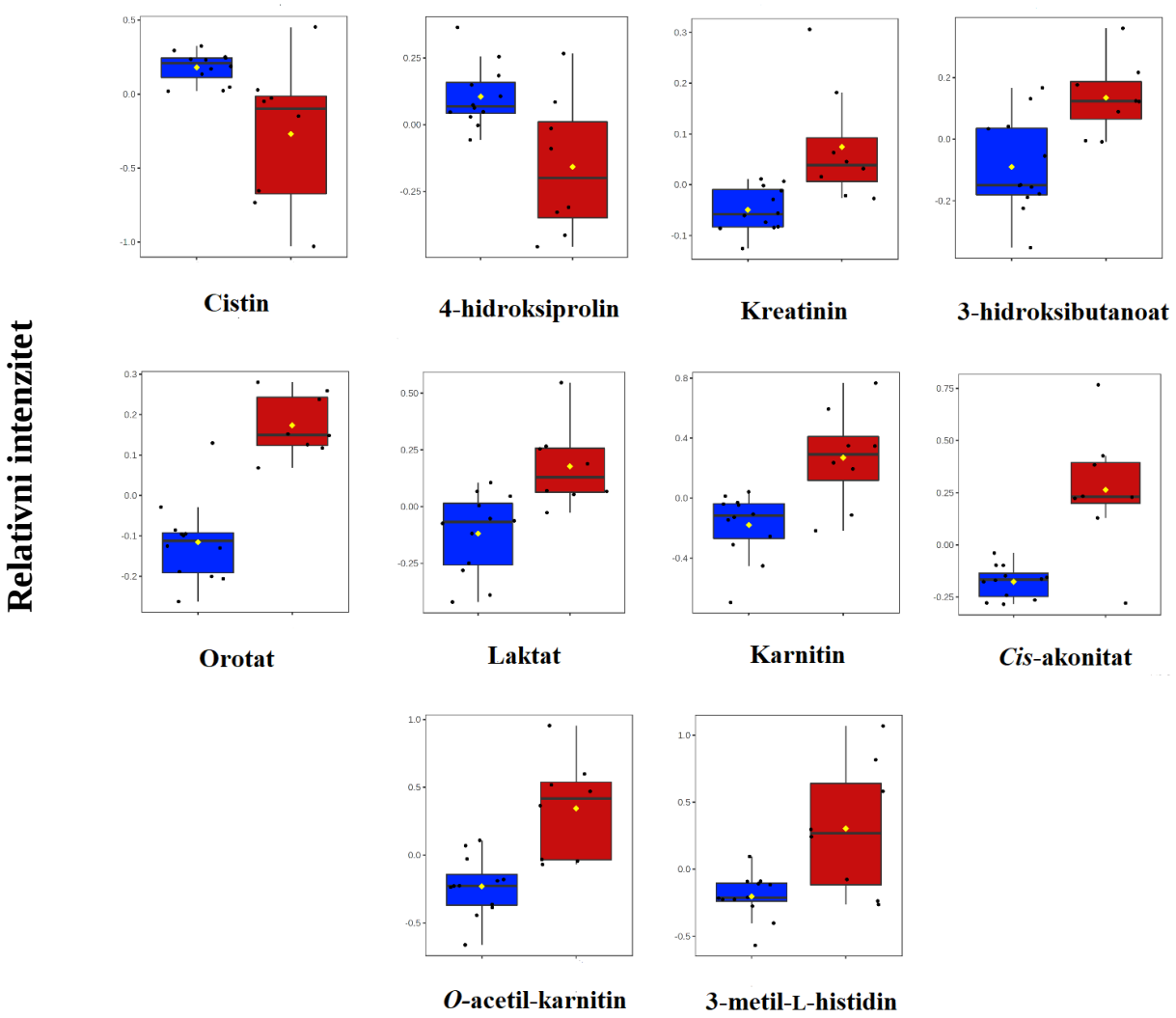
(b)

Slika 21. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta skupnog uzorka plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om uz pozitivnu (a) i negativnu ionizaciju elektroraspršenjem (b). Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) skupnog uzorka.

Prema vrijednosti $\log_2$ (FC) navedenoj u **Tablici 10**, u zdravih je pasa intenzitet pikova cistina i 4-hidroksiprolina bio smanjen, dok je intenzitet pikova kreatinina, 3-hidroksibutanoata, orotata, laktata, karnitina, *cis*-akonitata, *O*-acetil-karnitina i 3-metil-L-histidina bio povećan u usporedbi sa psima s dijagnosticiranim iDCM-om (**Slika 22**).

Tablica 10. Značajno promijenjeni metaboliti u plazmi zdravih pasa u odnosu na pse s iDCM-om identificirani neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom.

Metaboliti	Broj pika u kromatogramu	Molekulska masa	Vrijeme zadržavanja / s	Vrijednost *p*	$\log_2$ (FC)
Cistin	1021	241,0309	730,41	0,005814	0,83852
4-hidroksiprolin	180	132,0656	684,95	0,006224	0,69193
Kreatinin	4	114,0662	525,25	0,002923	-0,45215
3-hidroksibutanoat	2002	103,0403	514,83	0,002873	-0,71146
Orotat	2559	155,0103	555,73	$1{,}96\ 10^{-6}$	-0,94203
Laktat	1367	89,0246	528,32	0,001916	-1,0062
Karnitin	3	162,1124	636,28	0,00164	-1,702
***Cis*-akonitat**	2003	173,0097	800,83	9,86E-05	-1,7246
***O*-acetil-karnitin**	21	204,123	553,67	0,000338	-2,2026
3-metil-L-histidin	27	170,0924	616,4	0,003736	-2,3752

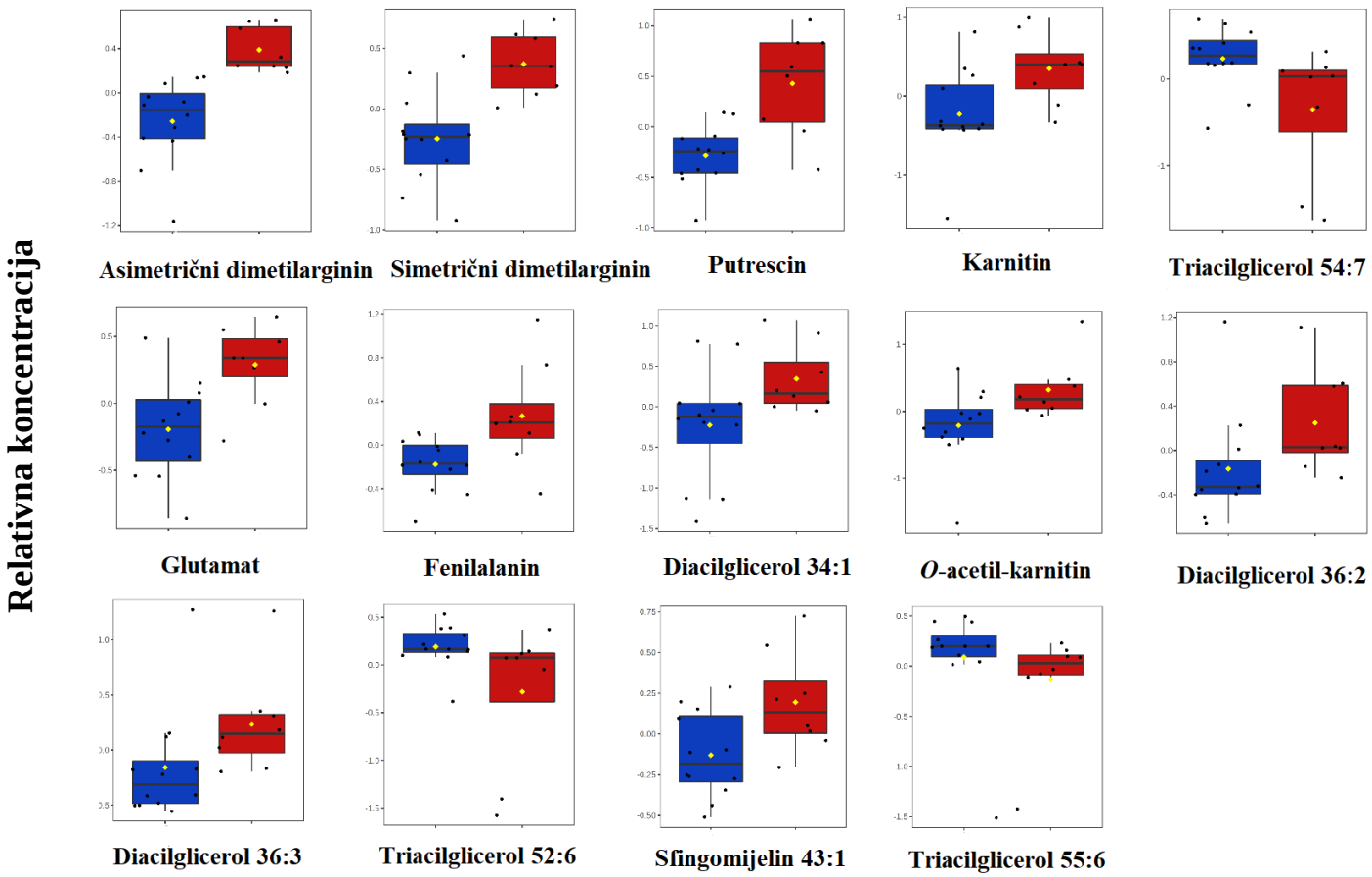


Slika 22. Usporedba relativnog intenziteta pikova značajno promijenjenih metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranih u plazmi pasa s iDCM-om i zdravih pasa neciljanom LC-MS-metabolomskom analizom. Plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke, dok crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke pasa s dijagnosticiranim iDCM-om. Prikazani metaboliti pokazali su statistički značajnu razliku između skupina prema *t*-testu (p <0,05). Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

4.3.2 Ciljana LC-MS-metabolomska analiza plazme pasa s iDCM-om

Ciljana metabolomska analiza uzoraka plazme pasa provedena je primjenom kompleta kemikalija i potrošnog materijala Absolute IDQ-p400 Biocrates. Nakon probira valjanih vrijednosti metabolita u uzorcima za svaku istraživanu skupinu ukupno je 199 metabolita odabrano za statističku analizu (**Dodatak, Tablica VII**). Među njima je 19 metabolita pripadalo u skupinu aminokiselina, 9 metabolita u skupinu biogenih amina, 1 metabolit bio je iz skupine monosaharida, 4 metabolita bili su acil-karnitini, 9 ih je pripadalo u skupinu estera kolesterola, 8 u skupinu diglicerida, a 29 u skupinu triglicerida. 11 metabolita činilo je skupinu lizofosfatidilkolina, 87 fosfatidilkolina, a 22 metabolita bili su sfingomijelini.

Univarijantnom metabolomskom analizom otkriveno je u plazmi pasa s iDCM-om ukupno 14 značajno promijenjenih metabolita u odnosu na kontrolne pse. Među njima su identificirane 2 aminokiseline, 3 biogena amina, 2 acil-karnitina, 3 triglicerida, 3 diglicerida te 1 sfinomijelin (**Slika 23**).



Slika 23. Usporedba relativnih koncentracija značajno promijenjenih metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranih u plazmi pasa s iDCM-om i zdravih pasa ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom. Plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke, a crveno obojeni okviri uzorke pasa s dijagnosticiranim iDCM-om. Prikazani metaboliti pokazali su statistički značajnu razliku između skupina prema *t*-testu ($p < 0,05$). Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

4.3.3 GC-MS-metabolomska analiza plazme pasa s iDCM-om

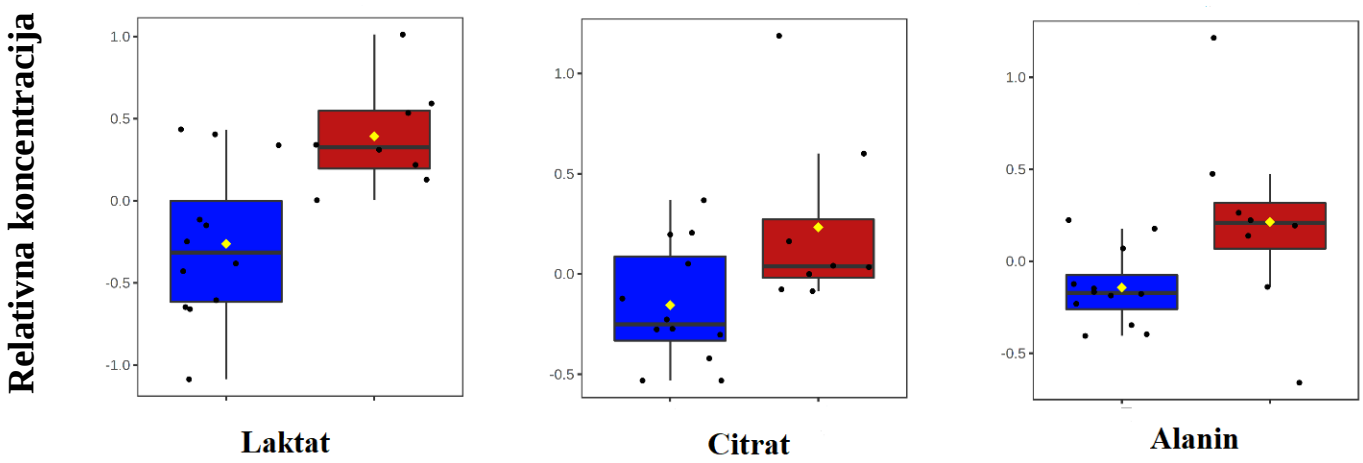
Ukupno je 20 uzoraka plazme pasa (12 uzoraka zdravih pasa i 8 uzoraka oboljelih pasa) analizirano GC-MS-metabolomskim pristupom. Obradom rezultata identificirano je ukupno 25 metabolita (**Dodatak, Tablica VIII**). Među njima je identificirano deset aminokiselina, sedam organskih kiselina, anorganski spoj, tri ugljikohidrata, tri masne kiseline i jedan šećerni alkohol (**Tablica 11**).

Statističkom analizom otkrivena su u plazmi zdravih pasa tri značajno promijenjena metabolita. Zabilježene su povišeni udjeli laktata i citrata te aminokiseline alanina (**Slika 24**).

Tablica 11. Metaboliti identificirani u uzorcima plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om GC-MS-metabolomskom analizom.

Metaboliti	Skraćeno ime	HMDB ID	Kemijska grupa
Laktat	Lac	0000190	Organska kiselina
Alanin	Ala	0000161	Aminokiselina
Piruvat	-	0000243	Organska kiselina
3-hidroksibutanoat	-	0000011	Organska kiselina
Valin	Val	0000883	Aminokiselina
Urea	-	0000294	Organska kiselina
Glicerol	-	0000131	Ugljikohidrati
Fosfat	-	-	Anorganski spoj
Izoleucin	Ile	0000172	Aminokiselina
Prolin	Pro	0000162	Aminokiselina
Serin	Ser	0000187	Aminokiselina
Treonin	Thr	0000167	Aminokiselina
5-oksoprolin	Glp	0000267	Organska kiselina
Glutamat	Glu	0000148	Organska kiselina
Fenilalanin	Phe	0000159	Aminokiselina
Glutamin	Gln	0000641	Aminokiselina
Citrat	CA	0000094	Organska kiselina
Glukoza	-	0000122	Ugljikohidrati
Lizin	Lys	0000182	Aminokiselina
Tirozin	Tyr	0000158	Aminokiselina
Galaktoza	Gal	0000143	Ugljikohidrati
Palmitat	-	0000220	Masne kiseline
Mio-inozitol	MI	0000211	Šećerni alkohol
Oleat	-	0000207	Masne kiseline
Stearat	-	0000827	Masne kiseline

HMDB ID= identifikacijska oznaka prema bazi podataka o metabolomu čovjeka

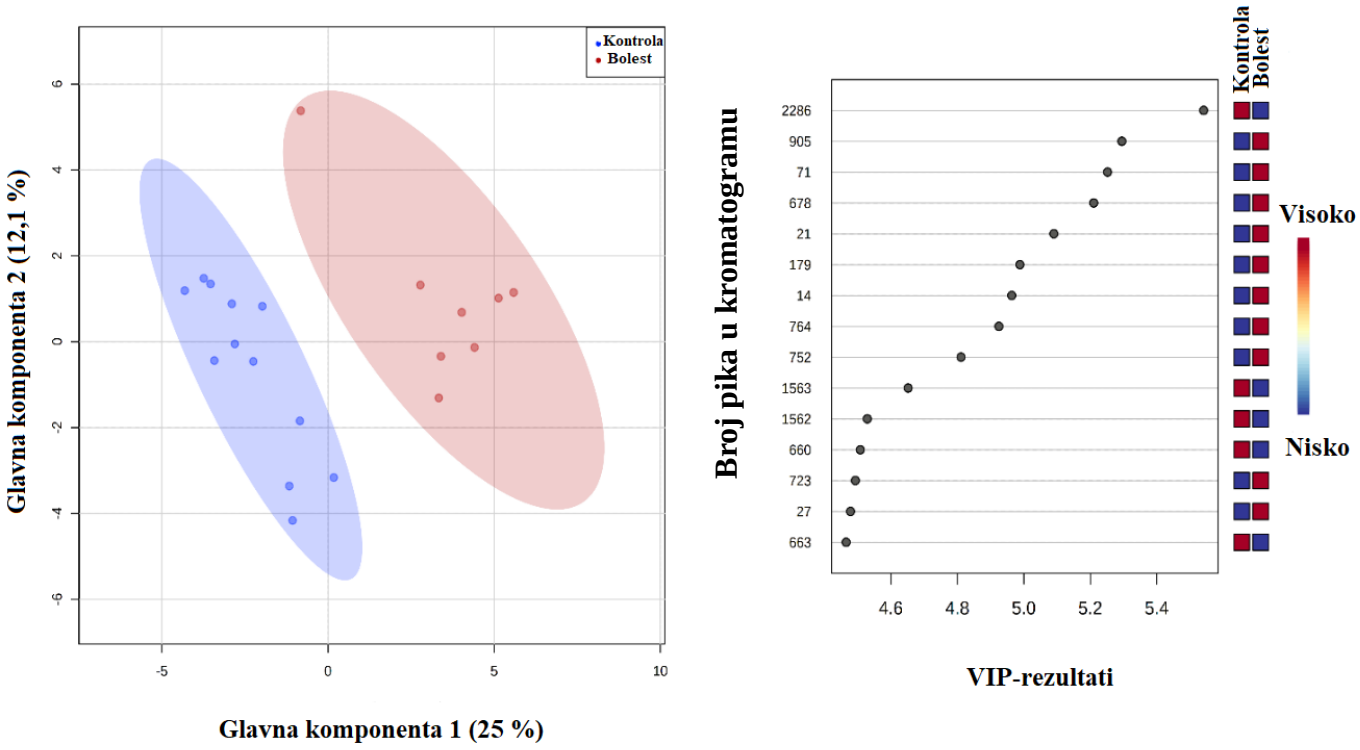


Slika 24. Usporedba relativog udjela značajno promijenjenih metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranih u plazmi pasa s iDCM-om i zdravih pasa GC-MS-metabolomskom analizom. Plavo obojeni okviri predstavljaju kontrolne uzorke, a crveno obojeni okviri uzorke pasa s iDCM-om. Prikazani metaboliti pokazali su statistički značajnu razliku između skupina prema *t*-testu (p <0,05). Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

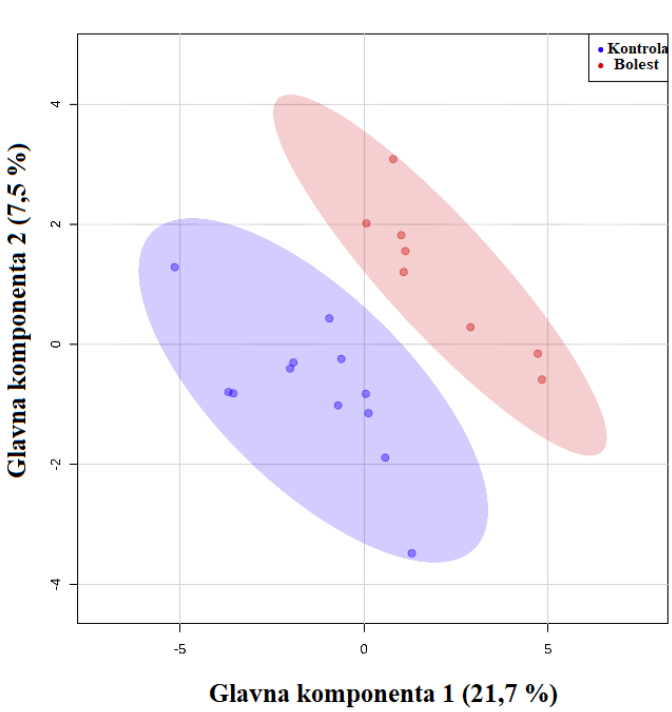
4.3.4 Identifikacija metabolita koji pridonose razlici u metabolomu plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om

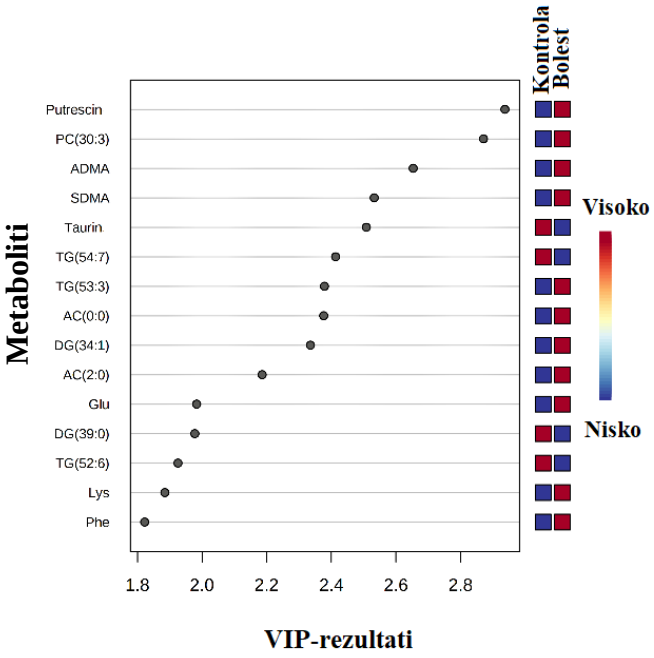
Diskriminantna analiza djelomičnih (parcijalnih) najmanjih kvadrata provedena je radi identifikacije metabolita koji su najviše pridonijeli u razlikovanju metaboloma plazme zdravih pasa u odnosu na metabolom plazme pasa s razvijenim iDCM-om. PLS-DA je pokazao jasnu podjelu između dviju eksperimentalnih skupina uključenih u istraživanje (**Slika 25, lijevi dio**).

VIP-rezultati uputili su na 15 metabolita koji najviše pridonose razlikovanju metaboloma plazme zdravih pasa u odnosu na metabolom plazme pasa s iDCM-om. Također, prikazane su snižene ili povišene koncentracije/udjeli odgovarajućih metabolita ili smanjeni ili povećani intenziteti pikova detektiranih u svakoj skupini (**Slika 25, desni dio**).


Kontrola
Bolest
Glavna komponenta 2 (12,1 %)
Glavna komponenta 1 (25 %)
Broj pika u kromatogramu
2286
905
71
678
21
179
14
764
752
1563
1562
660
723
27
663
4.6
4.8
5.0
5.2
5.4
VIP-rezultati
Kontrola
Bolest
Visoko
Nisko

(a)





PC – fosfatidilkolin

ADMA – asimetrični dimetiarginin

SDMA – simetrični dimetilarginin

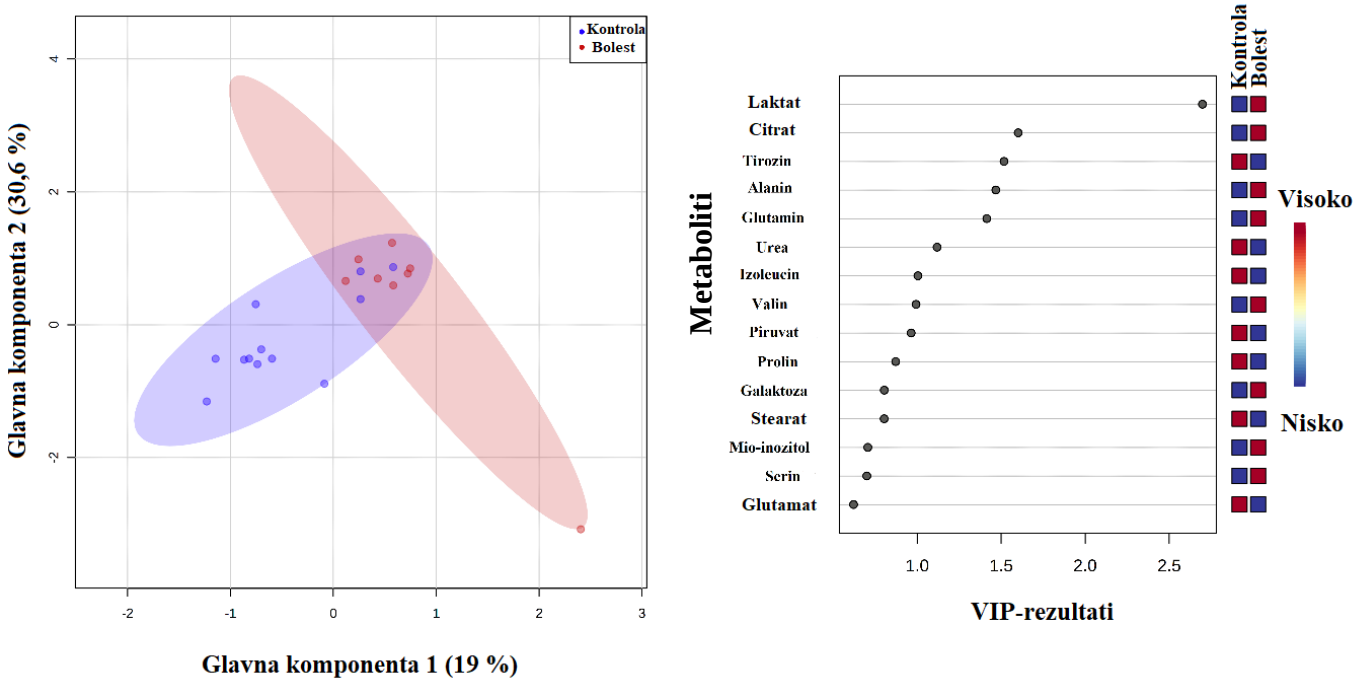
TG – trigliceridi

AC (0:0) – karnitin

AC (2:0) – *O*-acetil-karnitin

DG – digliceridi

(b)

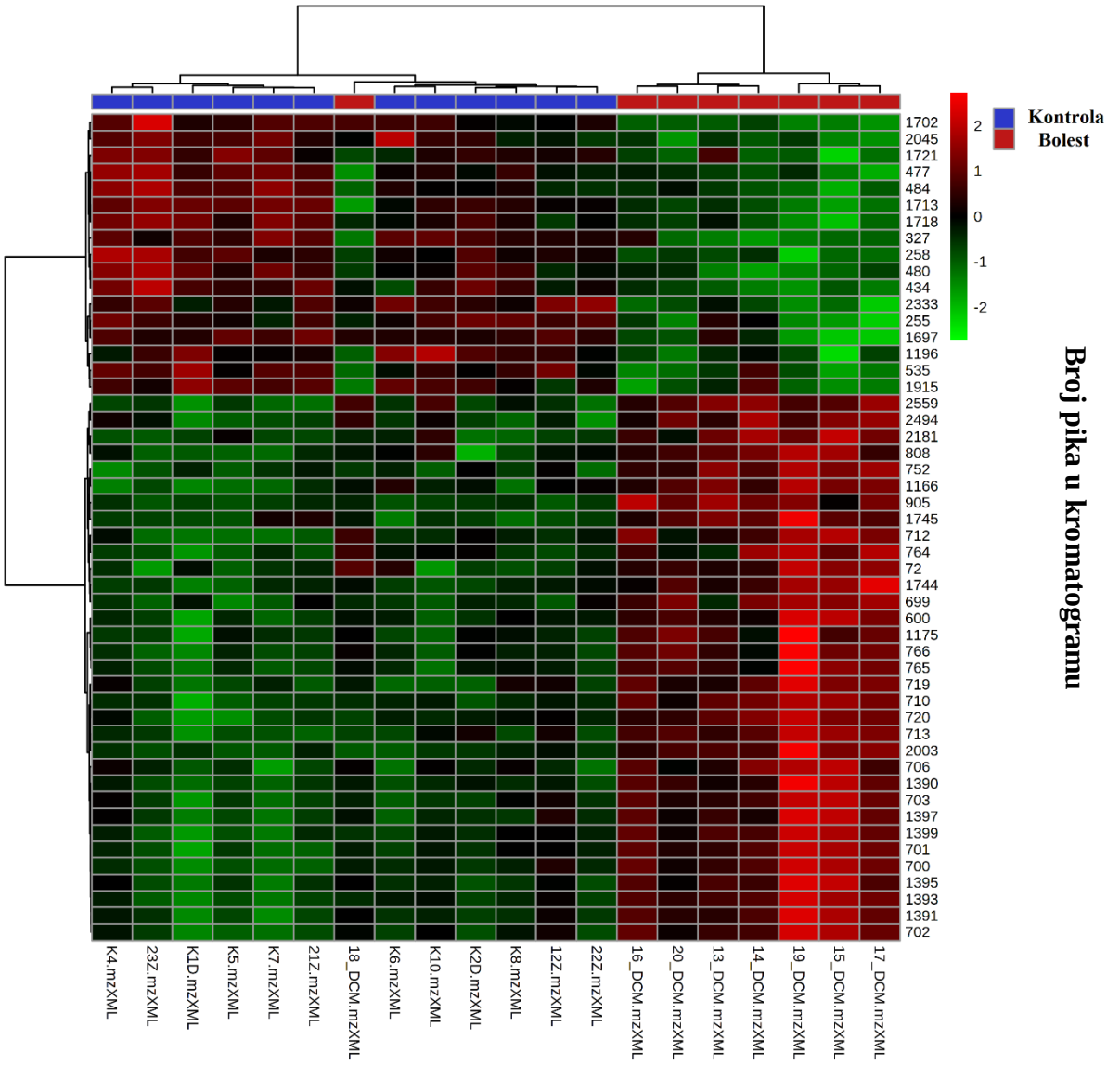


(c)

Slika 25. Rezultati PLS-DA provedenog za 20 uzoraka plazme pasa analiziranih neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (a), ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (b) te GC-MS-metabolomskom analizom (c). Crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke plazme pasa s iDCM-om, a plavo obojeni okviri kontrolne uzorke. Nadalje, crvena boja označuje povišenu koncentraciju/udio svakog metabolita ili povećani intenzitet pika, dok plava boja predstavlja sniženu koncentraciju/udio svakog metabolita ili smanjeni intenzitet pika u pasa s iDCM-om u odnosu na zdrave pse.

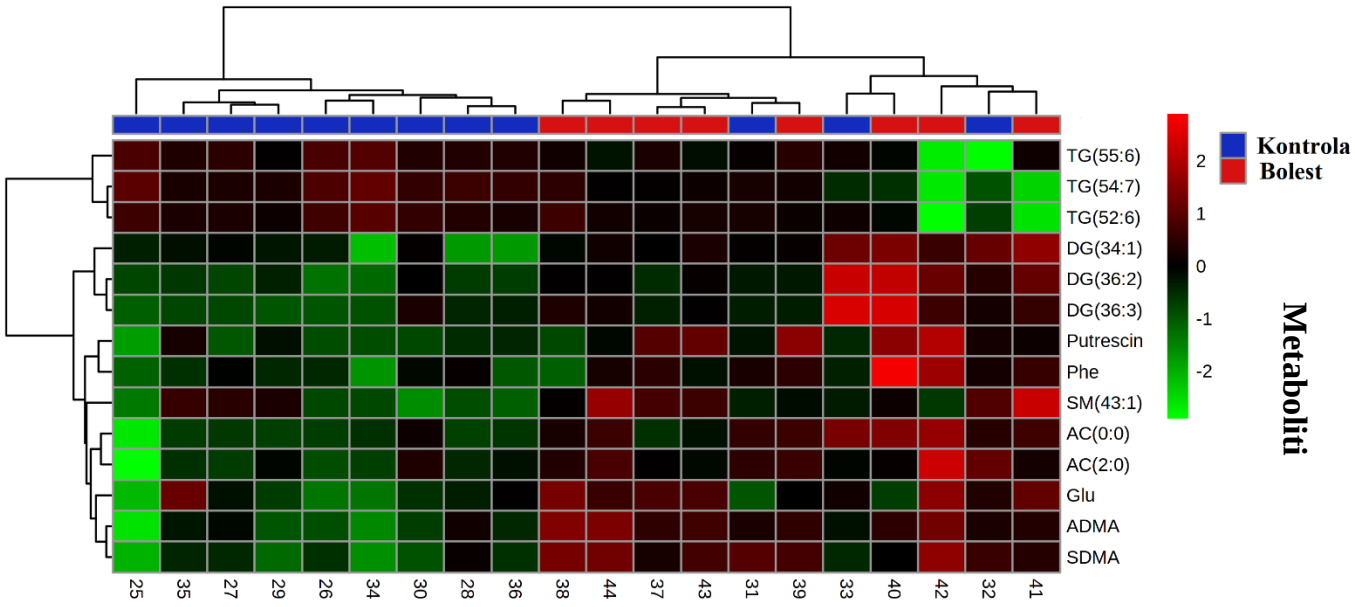
4.3.5 Hijerarhijsko grupiranje (klasteriranje) plazme pasa s iDCM-om

Hijerarhijskom analizom grupiranja prikazana je raspodjela najznačajnijih pikova/metabolita koji razdvajaju dvije skupine pasa uključene u istraživanje. Pikovi i metaboliti rangirani su prema *t*-testu, a korišteni su parametri euklidska mjera udaljenosti i Wardov algoritam za grupiranje. Analizom su uglavnom pokazane jasne razlike između kontrolne skupine i skupine pasa s razvijenim iDCM-om identificiranih neciljanom i ciljanom LC-MS-metabolomskom analizom (**Slike 26.a i b**). No u toplinskoj mapi koja prikazuje plazmu kontrolnih pasa i pasa s iDCM-om identificiranih GC-MS-metabolomskom analizom, četiri uzorka plazme zdravih pasa grupirala su se u skupinu pasa s iDCM-om (**Slika 26.c**). Razlog može biti u različitim vremenima sakupljanja zdravih uzoraka ili u tome da su navedeni psi ipak imali problema sa srcem koji se uobičajenim laboratorijskim pretragama i kliničkim pregledom nisu ustanovili.



Uzorci plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om

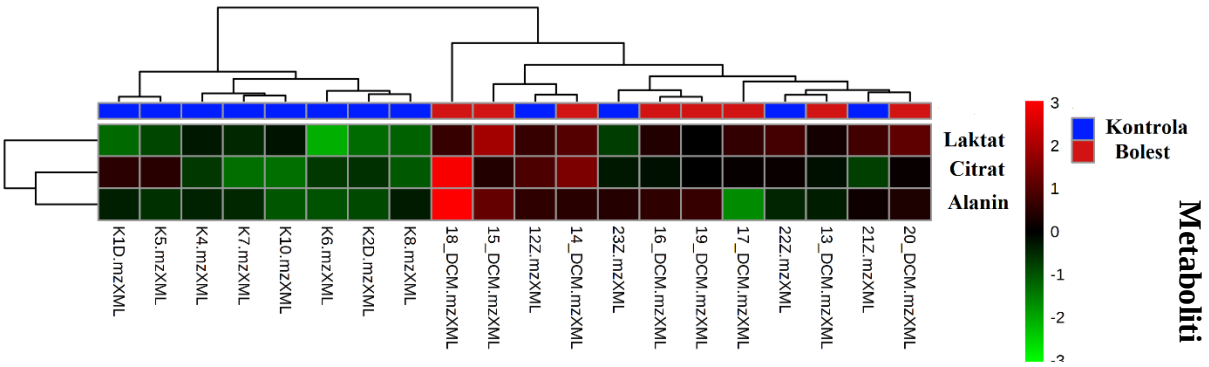
(a)



Uzorci plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om

TG – trigliceridi
DG – digliceridi
SM – sfingomijelini
AC (0:0) – karnitin
AC (2:0) – *O*-acetil-karnitin
ADMA – asimetrični dimetilarginin
SDMA – simetrični dimetilarginin

(b)



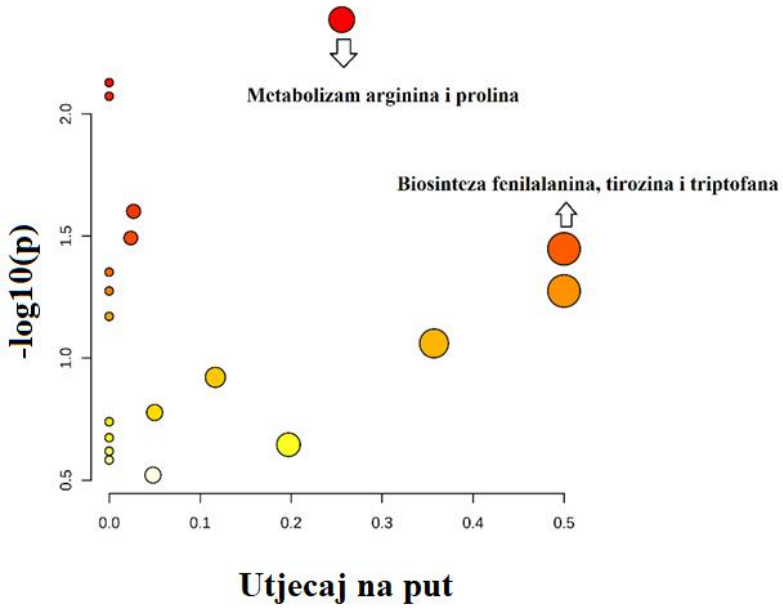
Uzorci plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om

(c)

Slika 26. Rezultati hijerarhijske analize grupiranja značajno promijenjenih pikova detektir neciljanom LC-MS-analizom (a), metabolita identificiranih ciljanom LC-MS-analizom i GC-MS-analizom (b, c) plazme kontrolne skupine pasa (zdravi psi, plava ploča) i pasa s iDCM-om (crvena ploča). Crveno obojeni okviri predstavljaju uzorke pasa s iDCM-om, a plavo obojeni okviri kontrolne uzorke. Nadalje, crvena boja označuje povišenu koncentraciju/udio metabolita ili povećani intenzitet pika, a zelena boja predstavlja sniženu koncentraciju/udio metabolita ili smanjeni intenzitet pika u pasa s iDCM-om u odnosu na zdrave pse.

4.3.6 Analiza metaboličkih puteva na temelju metabolita određenih u plazmi pasa s iDCM-om

Metaboliti identificirani neciljanom i ciljanom LC-MS-analizom te GC-MS-analizom i značajno promijenjeni prema univarijantnoj analizi korišteni su za istraživanje nereguliranih metaboličkih puteva pomoću softvera MetaboAnalyst v.4.0. Analiza je omogućila uvid u značajno promijenjene metaboličke puteve kod idiopatske dilatacijske kardiomiopatije. Najznačajnije promijenjeni metabolički putevi jesu metabolizam arginina i prolina i biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana (**Slika 27**).



Slika 27. Grafički prikaz promjena metaboličkih puteva određenih na temelju razlika u metabolitima identificiranim u plazmi pasa s iDCM-om u odnosu na zdrave pse. Raspon boja od žute do crvene predstavlja metabolite s različitim razinama značajnosti u odgovarajućem metaboličkom putu. Crne strelice označavaju najznačajnije promijenjene metaboličke puteve u pasa s babeziozom.

§ 5. RASPRAVA

Prema dostupnim literaturnim podatcima ne postoje istraživanja o metabolomici i promjenama u sastavu metabolita u serumu i urinu pasa invadiranih protozoonom *B. canis* te u plazmi pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom. Opsežan profil metabolita i povezanih bioloških puteva u pasa s invazijom *B. canis* i idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom dobiven je kombinacijom različitih metabolomskih pristupa uz primjenu više analitičkih tehnika. Istraživanja uzoraka pasa (serum, urin, plazma) provedena su spregnutim sustavima tekućinske i/ili plinske kromatografije sa spektrometrijom masa i upotrebom neciljanog i ciljanog metabolomskog pristupa.

U uzorcima seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* identificirano je primjenom neciljane i ciljane LC-MS-analize i GC-MS-analizom ukupno 295 metabolita. Neciljanom LC-MS-analizom ustanovljeno je 147 pikova koji su se značajno razlikovali između metaboloma zdravih pasa i metaboloma pasa s babeziozom. Važno je istaknuti da je ciljanom LC-MS-analizom ustanovljeno 68 pikova, dok je GC-MS-analizom ustanovljeno samo 6 pikova koji se značajno razlikuju između metaboloma zdravih pasa i pasa invadiranih parazitom *B. canis*.

U uzorcima urina invadiranih parazitom *B. canis*, neciljanim i ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom, identificirano je ukupno 100 različitih metabolita, odnosno 601 značajno promijenjeni pik neciljanim metabolomskim pristupom te 17 značajno promijenjenih metabolita ciljanim metabolomskim pristupom.

U uzorcima plazme pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom identificirana su primjenom tehnika LC-MS i GC-MS ukupno 272 metabolita. Pritom je neciljanom LC-MS-analizom ustanovljeno 397 pikova koji se značajno razlikuju između metaboloma zdravih pasa i pasa s iDCM-om. Ciljanom LC-MS-analizom ustanovljeno je 14 metabolita, a GC-MS-analizom 3.

5.1 Istraživanje metaboloma seruma pasa invadiranih parazitom B. canis

U uzorcima seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* otkriveno je osam značajno promijenjenih metaboličkih puteva povezanih s različitim metabolitima (**Tablica 9**). Metaboliti 5-oksoprolin, glicin i putrescin uključeni su u put metabolizma glutationa. Bioinformatičkom obradom seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* ustanovljena je povišena koncentracija metabolita 5-oksoprolina i putrescina, ali snižena koncentracija glicina. Prethodna istraživanja sugerirala su da porast koncentracije 5-oksoprolina može biti posljedica metaboličkog defekta gama-glutamil-ciklusa nužnog za sintezu i razgradnju glutationa.[147] No u slučaju metaboličkog defekta dolazi do manjka glutation-sintetaze. Nedostatak glutation-sintetaze može dovesti do razvoja hemolitičke anemije, metaboličke acidoze i teških neuroloških poremećaja. S obzirom na to da su psi invadirani parazitom *B. canis* anemični, pretpostavlja se da uzrok anemije može biti povezan s nedostatkom glutation-sintetaze. Prethodna su istraživanja pokazala sniženu koncentraciju antioksidacijskih biomarkera (SOD, GPx i katalaza) u pasa s babeziozom, što bi moglo ukazati na prisustvo oksidacijskog stresa uzrokovanog 5-oksoprolinom, koji se povisuje u cerebrospinalnoj tekućini, krvi i urinu pacijenata s nedostatkom glutation-sintetaze, odnosno glutationa.[147,148]

Glicin je jednostavna aminokiselina sintetizirana iz serina koja se sastoji od amino i karboksilne skupine povezane metilenskom skupinom. To je esencijalna aminokiselina za neonatalni rast i razvoj s protuupalnim, imunomodulatornim i citoprotektivnim djelovanjem u različitim bolestima kao što je oksidacijski stres.[149,150,151] Također, može terapijski djelovati kod upalnih bolesti poput upalne bolesti crijeva.[152,153,154] Zaštitni učinci glicina u uvjetima oksidacijskog stresa vjerojatno su posljedica njegovog izravnog djelovanja na upalne stanice (makrofagi) radi suzbijanja upalnog odgovora.[150] Pretpostavlja se da su isti mehanizmi prisutni u pasa invadiranih parazitom *B. canis*, naime odgovor akutne faze kod babezioze mogao bi poticati aktivaciju upalnih stanica. Prema tome, pretpostavlja se da glicin ima ulogu u supresiji oksidacijskog stresa i upalnim procesima kod babezioze. U uzorcima seruma pasa s babeziozom zabilježena je snižena koncentracija glicina. Zanimljivo je da je snižena koncentracija glicina

uočena i u akutnoj fazi malarije.[155] Snižena koncentracija glicina u serumu pasa s babeziozom mogla bi se objasniti time što parazit preuzima glicin iz organizma domaćina, kao što je primijećeno u akutnoj fazi malarije.[156]

Pretpostavlja se da u upalnim procesima kod babezioze sudjeluje i imidazol-4-acetat, metabolit histidina i histamina uključen u metabolizam histidina, čije su snižene koncentracije opažene u uzorcima seruma pasa s babeziozom. Prethodna su istraživanja pokazala da je histamin snažan upalni medijator i posrednik upale koji potiče upalne i regulatorne odgovore te pridonosi patološkim procesima. [157]

Provedena istraživanja pokazala su da je putrescin jedan od važnijih metabolita koji pridonosi razlici između metaboloma pasa s babeziozom i zdravih pasa (**Slika 9.b**). Putrescin je poliamin sintetiziran dekarboksilacijom ornitina,[158] aminokiseline koja je ustanovljena u pasa s babeziozom neciljanom i ciljanom LC-MS-analizom. U istraživanju Rojas-Martineza i suradnika ustanovljeno je da je putrescin bitan čimbenik za proliferaciju *B. bovis in vitro*.[159] S obzirom na to da je u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* opažena povišena koncentracija putrescina, pretpostavlja se da parazit *Babesia* koristi putrescin za proliferaciju. No osim uloge u proliferaciji, povišena koncentracija putrescina može biti povezana i s patogenezom babezioze, kao što je to s malarijom.[160] Istraživanja provedena u ovom radu pokazala su da putrescin, osim u metabolizmu glutationa, sudjeluje i u metabolizmu arginina i prolina koji je značajno promijenjen metabolički put u babeziozi.

Citrat je metabolit koji sudjeluje u različitim metaboličkim putevima značajno promijenjenima u babeziozi, kao što su metabolizam alanina, aspartata i glutamata, metabolizam glioksilata i dikarboksilata i ciklus limunske kiseline. Važno je napomenuti da je u prethodnim istraživanjima ustanovljeno da citrat može imati važnu ulogu u imunosti i upali.[161,162] U uzorcima seruma pasa s babeziozom ustanovljena je snižena koncentracija citrata, koja može narušiti staničnu signalizaciju, prekinuti staničnu diferencijaciju te u konačnici dovesti do apoptoze stanice zbog ograničene opskrbe staničnom energijom. Slični su stanični procesi ustanovljeni i kod aplastične anemije.[163]

Metabolit piruvat uključen je u pet različitih metaboličkih puteva značajno promijenjenih u babeziozi, a to su metabolizam alanina, aspartata i glutamata, metabolizam glioksilata i dikarboksilata, metabolizam cisteina i metionina, metabolizam arginina i prolina i ciklus limunske kiseline. Još je od davnina zabilježena zaštitna uloga piruvata u biološkim sustavima u uvjetima oksidacijskog stresa.[164] Dosadašnja su istraživanja pokazala da piruvat smanjuje oksidacijski stres i štiti metaboličke procese koji se zbivaju u mitohondrijima.[165,166] U pasa invadiranih parazitom *B. canis* zapažena je povišena koncentracija piruvata kao i u prethodnim istraživanjima parazita *B. rossi* i *B. bovis*.[167,168] To bi moglo dovesti do zaključka da piruvat ima zaštitnu ulogu u uvjetima oksidacijskog stresa i u pasa s babeziozom, s obzirom na to da je oksidacijski stres prisutan kod babezioze. Također, povišena koncentracija piruvata primijećena je i kod malarije.[169] Osim toga, smatra se da piruvat osim zaštite od oksidacijskog stresa može imati ulogu i u uvjetima hipoksičnog stresa, odnosno da pomaže u suzbijanju poremećenog energetskog statusa.

U istraživanjima malarije ustanovljeno je da je u akutnoj fazi bolesti snižena koncentracija neesencijalnih aminokiselina (glutamin, prolin, glicin, arginin, ornitin i citrulin).[155] U serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* koncentracije prolina, glicina i citrulina također su snižene. Važno je istaknuti da snižena koncentracija prolina upućuje na to da prolin kao univerzalni antioksidans u stanicama sisavaca[170] može imati zaštitnu ulogu i u pasa s babeziozom.

Fosfati i stearati jesu metaboliti identificirani neciljanim metabolomskim GC-MS-pristupom. Znatno pridonose razlici u metabolomu između zdravih pasa i pasa s babeziozom (**Slika 9.c**). U serumima pasa invadiranih parazitom *B. canis* opaženi su povećani udjeli fosfata i stearata. Povećani udio fosfata u pasa s babeziozom mogao bi se povezati s akutnom ozljedom bubrega kao posljedicom razvijenog komplikacijskog oblika babezioze pasa. S druge strane, stearat uzrokuje hiperkoagulabilnost krvi aktivacijom faktora XII i agregacijom krvnih pločica.[171] Također, istraživanje Barić Rafaj i suradnika potvrdilo je ulogu stearata u babeziozi.[172] Ustanovljeno je da se tijekom invazije parazitom *B. canis* aktivira Hagemanov

faktor.[172] Pretpostavlja se da povećan udio stearata može biti povezan s poremećenom funkcijom jetre u babeziozi.

Biogeni amini, serotonin i kinurenin među prvih su 5 metabolita s najvišim vrijednostima VIP-rezultata u ciljanoj metabolomici (**Slika 9.b**). Tijekom invazije parazitom *B. canis* aktivira se odgovor akutne faze, odnosno dolazi do prekomjernog oslobađanja upalnih medijatora, o čemu svjedoči povećana koncentracija fibrinogena, C-reaktivnog proteina i serumskog amiloida A u krvi. Fibrinogen oblaže trombocite, što u konačnici rezultira agregacijom trombocita i aktivacijom koagulacijskog sustava.[6] Osim toga, degranulacijom trombocita oslobađaju se vazoaktivne molekule, poput serotonina.[173] U istraživanju metaboloma seruma pasa s babeziozom zabilježena je snižena koncentracija serotonina. Uzrok snižene koncentracije serotonina mogao bi biti u broju trombocita. Naime, karakterističan je simptom povezan s babeziozom pasa trombocitopenija.[174] Koncentracija serotonina u punoj krvi smatra se dobrim pokazateljem serotonina u trombocitima, koji sadržavaju 99 % ukupnog serotonina u punoj krvi.[175]

Obradom rezultata istraživanja babezioze u serumima pasa ustanovljeno je i postojanje metabolita kinurenina, produkta metabolizma triptofana. U serumima pacijenata invadiranih parazitom *B. canis* zabilježena je povišena koncentracija kinurenina. Prethodna su istraživanja pokazala da je povišena koncentracija kinurenina povezana s oštećenjem funkcije endotela i povišenim oksidacijskim stresom.[176] Njegova je koncentracija također značajno povezana s prisutnošću trombomodulina, markera disfunkcije vaskularnog endotela.[177] Kuleš i suradnici ustanovili su da je koncentracija trombomodulina povišena u pasa s babeziozom, kao i drugih markera aktivacije endotela, pa se smatra da bi povišene koncentracije kinurenina mogle pridonijeti endotelnoj disfunkciji prisutnoj kod babezioze.[178]

U serumu pasa s babeziozom također su snižene koncentracije inozina i hipoksantina. Inozin je prirodni purin, dobiven razgradnjom adenozina enzimom adenozin-deaminazom, dok je hipoksantin prirodni derivat purina dobiven iz inozina enzimom purin-nukleozid-fosforilazom. Protozoe se koriste purinskim nukleozidima za svoj rast i razvoj, za sintezu

nukleinskih kiselina, koenzima te za sudjelovanje u sintezi adenozin-trifosfata u energetskom metabolizmu. U skladu s tim, paraziti malarije koriste hipoksantin za sintezu nukleotida na bazi purina.[179] Pretpostavlja se da slično mogu obavljati i paraziti iz roda *Babesia*.

Prethodna su istraživanja potvrdila da inozin ima snažne protuupalne učinke *in vivo* i *in vitro* tako da smanjuje proizvodnju proupalnih medijatora od strane domaćina. Prema tome, može se pretpostaviti da je učinak inozina sličan i u psima invadiranih parazitom *B. canis*. Za razliku od inozina, hipoksantin u plazmi služi kao alat u dijagnostici bolesti povezanih s hipoksijom, ali i s hemolitičkim poremećajima.[180,181] Snižene koncentracije hipoksantina u serumima pasa s babeziozom mogu biti povezane s manjim brojem eritrocita i trombocita u invaziji parazitom *B. canis*. U svom istraživanju iz 1980. godine autori Wung i Howell također spominju da je potrebna posebna pažnja kako bi se izbjeglo istjecanje hipoksantina iz eritrocita i trombocita.[182]

Neciljanom i ciljanom LC-MS-analizom te GC-MS-analizom metabolita u serumu pasa s babeziozom identificiran je metabolit fenilalanin. Fenilalanin je aromatska aminokiselina esencijalna za sisavce, prisutna u većini proteina. Pretvara se u jetri, a njezin metabolizam ovisi o funkciji jetre. U uzorcima seruma pasa s babeziozom zabilježena je povišena koncentracija/udio fenilalanina. Istraživanje Neummana i suradnika pokazalo je da povišena koncentracija, odnosno povećan udio fenilalanina može biti potencijalno uzrokovan poremećenom funkcijom jetre[183] ili oštećenjem aktivnosti enzima fenilalanin-4-hidroksilaze. Fenilalanin-4-hidroksilaza jetreni je i bubrežni enzim koji pretvara fenilalanin u tirozin, a povezan je s aktivacijom imunosnih stanica i upalom.[184] Osim toga Dawiskiba i suradnici izvijestili su da fenilalanin i izoleucin mogu biti potencijalni biomarkeri u upalnoj bolesti crijeva.[185]

U serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* otkriveni su metaboliti iz skupine lizofosfatidilkolina, diglicerida, fosfatidilkolina, triglicerida, sfingomijelina i estera kolesterola. Ustanovljena je povišena koncentracija fosfatidilkolina i diacilglicerola, a snižena koncentracija estera kolesterola. Istraživanje Christensena i suradnika pokazalo je da je u

eritrocitima invadiranima vrstom *B. bovis* zabilježena povećana razina fosfatidilkolina, fosfatidne kiseline, diacilglicerola i estera kolesterola u usporedbi s neinficiranim eritrocitima.[186] Slično je uočeno i za eritrocite invadirane vrstom *B. bigemina*. Povišene koncentracije fosfatidilkolina u invadiranim eritrocitima mogu se objasniti biosintetskim aktivnostima lipida u parazitima roda *Babesia*. Koncentracija triglicerida u uzorcima seruma pasa s babeziozom bila je povišena, a uzrok se može objasniti istraživanjem Khovidhunkita i suradnika.[187] Autori smatraju da se tijekom upale koncentracije triglicerida u serumu povisuju zbog metaboličkih promjena koje dovode do porasta koncentracije lipoproteina vrlo niske gustoće.[187] Uzrok povećanog izlučivanja lipoproteina vrlo niske gustoće posljedica je lipolize masnog tkiva, potiskivanja oksidacije masnih kiselina i povećane sinteze *de novo* masnih kiselina u jetri.[187] Sfingomijelin je jedna od najzastupljenijih sfingolipidnih molekula u membranama stanica sisavaca,[188] u kojima ima i strukturnu i funkcionalnu ulogu.[187,189] Prethodna su istraživanja pokazala da sfingomijelini imaju antioksidacijski učinak,[190,191] odnosno mogu inhibirati oksidaciju lipida stvaranjem mreže vodikovih veza unutar membrana.[192] Također, mogu spriječiti širenje peroksidacije lipida.[193] Invazija parazitom *B. canis* u pasa povezana je s visokim stupnjem peroksidacije lipida.[194] Pretpostavlja se da sfingomijelini mogu biti uključeni u prevenciju širenja peroksidacije lipida u psima invadiranima parazitom *B. canis*.

5.2 Istraživanje metaboloma urina pasa invadiranih parazitom B. canis

U uzorcima urina pasa s babeziozom i različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega otkrivene su promjene u sastavu aminokiselina, među kojima su identificirane značajne promjene za 13 aminokiselina. Prethodna su istraživanja ustanovila da klinička stanja povezana s promijenjenom funkcijom bubrega, kao što je upala ili metabolička acidoza, utječu na metabolizam aminokiselina i proteina.[195,196] Metabolizam aminokiselina i proteina zbiva se u bubregu u kojemu dolazi do gotovo potpune tubularne reapsorpcije aminokiselina.[197] No u

slučaju oštećenja bubrega filtracija i reapsorpcija mogu biti promijenjene i uzrokovati gubitke aminokiselina, odnosno proteinuriju.[196]

U urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis* ustanovljene su povišene koncentracije aromatskih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana u usporedbi sa zdravim psima. Istraživanja na ljudima i životinjama pokazala su da je kronično zatajenje bubrega povezano sa značajnim promjenama u razgradnji, sintezi ili izlučivanju aromatskih aminokiselina u urinu.[198] Spomenute promjene u profilu aromatskih aminokiselina kod babezioze mogle bi se povezati s upalom, oksidacijskim stresom i hipoksijom tkiva. Ove zaključke dodatno potkrepljuju povezani značajno promijenjeni biološki putevi identificirani istraživanjem urina, a to su biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana te metabolizam fenilalanina.

U ciljanoj i neciljanoj metabolomici fenilalanin je identificiran kao metabolit koji najviše pridonosi razlici u metabolomu između istraživanih skupina, što pokazuju VIP-rezultati. Time se može potvrditi dosljednost obaju LC-MS-metabolomskih pristupa primijenjenih u istraživanju.

Istraživanje urina zdravih pasa i pasa s babeziozom otkrilo je da su značajnoj razlici u metabolomu između istraživanih skupina pridonijele i promjene metabolizma arginina i prolina, kao i biosinteza arginina. Istraživanje Fenga i suradnika pokazalo je da su metaboliti uključeni u metabolizam arginina i prolina u korelaciji s bubrežnom funkcijom.[199] Arginin je prekursor prolina, ali i jedini supstrat koji sudjeluje u proizvodnji dušikova oksida. Dušikov je oksid glavni posrednik upalnog odgovora domaćina, marker oksidacijskog stresa i prekursor drugih važnih imunosnih molekula.[200] Izlučivanje arginina urinom moglo bi biti povezano s upalnim odgovorom kod babezioze i popratnim oštećenjem bubrega. Povišena koncentracija prolina mogla bi biti odgovor na povećanu sintezu ili smanjeni katabolizam enzima prolin-oksidaze, odnosno prolin-dehidrogenaze. Naime, s obzirom na to da je laktat inhibitor prolin-dehidrogenaze, njegove visoke koncentracije mogu dovesti do albuminurije i povišene koncentracije prolina.[201] Kod babezioze pasa uzrokovane vrstama *B. rossi*[202] i *B. canis*[203] uočene su povišene koncentracije laktata, dok povećano izlučivanje albumina upućuje na

oštećenje glomerula kod babezioze pasa.[204] Stoga bi spomenuti mehanizam metabolizma prolina povezan s albuminurijom mogao objasniti povišenu koncentraciju prolina u urinu pasa s babeziozom i različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega.

Značajne razlike u metabolomu urina između zdravih pasa i pasa s babeziozom uočene su i u metabolizmu glutamina i glutamata. Prema dostupnim je istraživanjima utvrđeno da su glutamin (preko glutamata), cistein i glicin prekursori za sintezu glutationa, što upućuje na njegovu ulogu u oksidacijskom stresu.[205] S druge strane, povišene koncentracije glutamata ustanovljene su u urinu pacijenata s kroničnom bolesti bubrega, čemu je razlog smanjena funkcija bubrega zbog djelovanja metaboličke acidoze.[206] Povećana zastupljenost glutamata pomaže u izlučivanju kiselinskog opterećenja putem metabolizma glutamina i ciklusa uree. Također, u prethodnim su istraživanjima u većine pasa s babeziozom zabilježene povišene koncentracije laktata i metabolička acidoza.[202,207,208] Prekomjerno oslobađanje upalnih medijatora i citokina zajedno s oksidacijskim stresom kod babezioze može pridonijeti promjenama u razinama spomenutih metabolita.[4,39]

U istraživanju urina pasa s babeziozom ustanovljena je povišena koncentracija aminokiselina razgranatog lanca kao što su valin, leucin i izoleucin. Povišene koncentracije aminokiselina razgranatog lanca povezane su s oksidacijskim stresom i upalom u različitim patološkim stanjima. Istraživanje Zhenyukha i suradnika pokazalo je da aminokiseline razgranatog lanca mogu potaknuti proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta i aktivaciju nuklearnog faktora κ B (NF-κB) u mononuklearnim stanicama periferne krvi.[209] Povišene koncentracije navedenih aminokiselina potiču upalu i oksidacijski stres u endotelnim stanicama, što omogućuje adheziju upalnih stanica i dovodi do disfunkcije endotela.[210] Aktivacija NF-κB-a rezultira oslobađanjem proupalnih molekula, kao što je interleukin-6, TNF-α, međustanična adhezijska molekula 1 ili interleukin-8, što je dokumentirano kod babezioze.[211-214] Prema svemu navedenom, promjene u razinama valina, leucina i izoleucina, mogu pridonijeti upali i oksidacijskom stresu kod babezioze.

Statističkom obradom rezultata utvrđeno je da je metabolizam alanina, aspartata i glutamata značajno promijenjen kod babezioze. U pasa invadiranih parazitom *B. canis* opažen je postupan porast koncentracije alanina koji odgovara stupnju promijenjene funkcije bubrega. Pretpostavlja se da se laktat pretvorio u alanin kao rezultat povećane aktivnosti glikolize tijekom babezioze. Ova je pretpostavka u skladu s nedavnim istraživanjem bolesnika s malarijom s kojom babezioza dijeli razne kliničke manifestacije bolesti.[215] Budući da je alanin također prekursor glukoneogeneze koja se zbiva u jetri, njegova povišena koncentracija može biti pokazatelj promijenjene funkcije jetre kod babezioze.

U istraživanju urina pasa s babeziozom u urinu su ustanovljene promjene u koncentracijama različitih komponenti metabolizma histidina; uočene su povišene koncentracije histidina i karnozina i snižene koncentracije imidazol-4-acetata i *N*(pi)- 1 metil-L-histidina (3-metil-L-histidin) u pasa s babeziozom u usporedbi sa skupinom zdravih kontrolnih pasa. Histidin je prekursor karnozina (β-alanil-L-histidin), koji je sintetiziran enzimom karnozin-sintazom iz L-histidina i β-alanina. Kao antioksidans, karnozin omogućuje uklanjanje od slobodnih radikala i nusproizvoda koji nastaju peroksidacijom membranskih lipida. Ovakav je proces pronađen kod različitih upalnih bolesti.[216] Prethodna su istraživanja sugerirala da se na temelju koncentracije 3-metil-L-histidina mogu razlikovati bolesnici s kroničnom bolesti bubrega od zdravih kontrolnih skupina.[217,218] Spomenuto je da imidazol-4-acetat kao metabolit histidina i histamina može sudjelovati u upalnim procesima kod babezioze, a sintetizira se transaminacijom histidina ili oksidacijom histamina, moćnog upalnog medijatora.[157] Prema tome, promjene u koncentracijama navedenih metabolita uključenih u metabolizam histidina mogu se pripisati upali i oksidacijskom stresu kod babezioze, s većim promjenama u uznapredovalim fazama promijenjene funkcije bubrega, što upućuje na ozljedu bubrega kod babezioze.

U istraživanju kronične bolesti bubrega primijećena je povezanost između proteinurije, koja uzrokuje povećanu razinu aminokiselina u urinu, i izlučivanja aminokiselina prolina, asparagina, valina, alanina, treonina, lizina, fenilalanina, metionina, serina, tirozina i triptofana

u urinu.[196] U uzorcima urina pacijenata s dijagnosticiranom dijabetičkom nefropatijom ustanovljene su povišene koncentracije aminokiselina valina, histidina, glicina, asparagina i aspartata, što upućuje na to da je metabolizam aminokiselina povezan s razvojem nefropatije.[219] U uzorcima urina pasa invadiranih parazitom *B. canis*, zabilježena je povišena koncentracija svih prethodno navedenih aminokiselina osim serina. Nadalje, koncentracije alanil-glicina bile su povišene u skupini C u usporedbi sa svim ostalim istraživanim skupinama pasa. Promjene u koncentracijama aminokiselina u urinu pasa oboljelih od babezioze najvjerojatnije su povezane s kataboličkim odgovorom domaćina na invaziju. No s obzirom na to da bubreg ima ulogu u metabolizmu aminokiselina i proteina, njegova poremećena funkcija progresivno utječe na izlučivanje aminokiselina urinom.

FIA-MS-analizom urina u ciljanoj metabolomici identificirani su acil-karnitini, koji također upućuju na promjene pasa s babeziozom. Beta-oksidacija masnih kiselina glavni je izvor energije za proksimalne tubularne stanice bubrega.[199] Promijenjeni metabolizam masnih kiselina i nepotpuna beta-oksidacija onemogućuju uklanjanje viška lipida u stanicama, što u konačnici rezultira povišenim razinama acil-karnitina u babeziozi. Osim toga, acil-karnitini povezani su s funkcijom mitohondrija i upućuju na oštećenje mitohondrijske aktivnosti zbog promijenjene funkcije bubrega. Istraživanje Bjorndala i suradnika pokazalo je da je sličan mehanizam promijenjene funkcije mitohondrija uočen u različitim metaboličkim bolestima.[220]

U urinu pasa s babeziozom koncentracije dvaju metabolita, citrata i malonata, uključenih u ciklus limunske kiseline, značajno su promijenjene. Kod kronične je bolesti bubrega zabilježeno smanjeno izlučivanje metabolita ciklusa limunske kiseline urinom kao i njihova genska ekspresija u bubregu.[221] No u miševa s dijabetesom ustanovljene su povišene koncentracije međuprodukata ciklusa limunske kiseline u urinu, uključujući citrat, što može biti posljedica sistemskog odgovora uzrokovanog hiperglikemijom ili lokalnog odgovora na tubularni transport i/ili funkciju mitohondrija u bubrezima.[222] Malonat je kompetitivni inhibitor enzima sukcinat-dehidrogenaze, uključen u ciklus limunske kiseline i lanac transporta elektrona. Zbog prisutnosti malonata snižena je aktivnost enzima sukcinat-dehidrogenaze, što

za posljedicu ima veći protok ugljika kroz ciklus limunske kiseline. Spomenuto povećanje toka kroz ciklus limunske kiseline može biti povezano s hipoglikemijom prethodno demonstriranom kod babezioze pasa.[223,224] Promjene u ciklusu limunske kiseline mogu upućivati na promjene u energetskom metabolizmu kod babezioze.

Purini i pirimidi uključeni su u neizmjerne biološke procese, kao što su sinteza RNA i DNA, transdukcija i translacija signala i modulacija energetskog metabolizma. Strukturne su komponente različitih koenzima.[225] Analizom uzoraka urina miševa u uvjetima upale izazvane lipopolisaharidom otkriveni su adenin i citozin.[226] Nadalje, klinička istraživanja pokazala su da je u urinu bolesnika s razvijenom kroničnom bolesti bubrega povišena koncentracija adenina.[227] Prema tome, povišene koncentracije adenina i hipoksantina u urinu mogu se pripisati većem stupnju procesiranja i obrade RNA zbog infekcije i njihovog lokalnog djelovanja u samom bubregu.

U urinu pasa s babeziozom otkrivena je povišena koncentracija taurokolata, soli žučne kiseline. U metabolizmu žučnih kiselina važnu ulogu imaju bubrezi. Žučne se kiseline gotovo u potpunosti reapsorbiraju u glomerulima posredovanjem prijenosnika ovisnih o natriju, čime se sprečava gubitak žučnih kiselina urinom.[228-230] Smanjenom regulacijom prijenosnika žučnih kiselina ovisnih o natriju u proksimalnim tubularnim stanicama povećava se izlučivanje žučnih kiselina urinom.[231,232] Prema tome, povećano izlučivanje taurokolata u pasa s babeziozom može biti posljedica pojačane tubularne sekrecije koja se događa radi promjene aktivnosti transportera tijekom babezioze.

Povišene koncentracije metabolita kolina primijećene su u svim skupinama pasa s babeziozom u usporedbi sa zdravim kontrolnim psima. Prethodna su istraživanja potvrdila da kolin ima protuupalne aktivnosti.[233,234] Povišene koncentracije kolina u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis* mogu biti povezane s upalnim odgovorom domaćina na parazit.

Metabolit L-gulono-1,4-lakton međuprodukt je u sintezi askorbinske kiseline, antioksidansa za uklanjanje slobodnih radikala.[235] Uočene niže koncentracije L-gulono-1,4-

laktona u urinu pasa s babeziozom mogu biti posljedica povećane potrošnje uzrokovane stanjem oksidacijskog stresa kod babezioze.

N-acetilneuraminat je konjugirana baza *N*-acetilneuraminske kiseline, poznate i kao sijalinska kiselina, esencijalne komponente glikoproteina i glikolipida. U urinu pasa s babeziozom i različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega otkrivena je povišena koncentracija *N*-acetilneuraminata u urinu. Povišena koncentracija ovog metabolita povezana je s oštećenjem stanica u krvnim žilama bubrega, ali upućuje i na ozljedu bubrežnih tubula.[236,237] Upalni odgovor akutne faze i hemolitička anemija izazvana babeziozom potiču aktivaciju i oštećenje endotelnih stanica, povećanje propusnosti krvnih žila i hipoksiju tkiva, što sve može biti povezano s pojačanim izlučivanjem *N*-acetilneuraminata.

5.3 Istraživanje metaboloma plazme pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom

Analizom metabolita u uzorcima plazme pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom pokazano je da je ova bolest povezana s promjenama u metabolomskom profilu plazme. Uočene su promjene u koncentracijama aminokiselina, organskih kiselina, masnih kiselina, ugljikohidrata, šećernih alkohola, acil-karnitina, estera kolesterola i drugih vrsta metabolita. Analizom metaboličkih puteva otkriveni su značajno promijenjeni putevi kod idiopatske dilatacijske kardiomiopatije, koji uključuju metabolizam arginina i prolina te biosintezu fenilalanina, tirozina i triptofana (**Slika 27**).

U uzorcima plazme pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom zabilježena je povišena koncentracija laktata detektiranog neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom i GC-MS-analizom. Smatra se da je mliječna kiselina jedan od prvih biomarkera za otkrivanje zatajenja srca.[238] Također, mliječna je kiselina uz masne kiseline i glukozu važan izvor energije u miokardu.[239] Istraživanja u posljednjih nekoliko godina sugeriraju da je pojava mliječne kiseline u krvi odgovor na stres kod srčanih bolesti, najčešće u bolesnika s ishemijom miokarda ili zatajenjem srca.[239] Hass i suradnici otkrili su povišenu koncentraciju mliječne kiseline u

pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom ciljanim metabolomskim pristupom, odnosno Biocrates-analizom.[240] No povišena koncentracija mliječne kiseline otkrivena je i u plazmi pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom. Povišene koncentracije mliječne kiseline samo u dijelu srca mogu upućivati na razlike u težini bolesti ograničavajući upotrebu ovoga biomarkera u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Nadalje, pretpostavlja se da je povišena koncentracija mliječne kiseline povezana sa smanjenom ekspresijom enzima laktat-dehidrogenaze A u krvi, ali ne i u tkivu miokarda. Također, povišene koncentracije mliječne kiseline u krvi posljedica su razvijenih sistemskih bolesti kao što su teške traume, hipoksemija, septički šok s lošim prognozama.[241-243]

Hass i suradnici primijetili su sniženu koncentraciju 3-hidroksimaslačne kiseline, odnosno 3-hidroksibutanoata kod pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom u odnosu na kontrolu skupinu.[240] Zanimljivo je da je u pasa s iDCM-om primjećen blag porast koncentracije 3-hidroksibutanoata identificiranog neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom. Istraživanje Hassa i suradnika utvrdilo je da se koncentracija metabolita piruvata u plazmi pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu skupinu.[240] To se podudara s rezultatima istraživanja provedenima na psima s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom u kojih također nije primijećena značajna promjena piruvata identificiranog GC-MS-metabolomskim pristupom.

U plazmi pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom identificiran je metabolit karnitin neciljanim i ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom. Karnitin je ključna komponenta u prijenosu dugolančanih masnih kiselina kroz unutarnju mitohondrijsku membranu.[244] Također, bitan je za oksidaciju masnih kiselina, važnog puta za proizvodnju energije u srcu čovjeka i životinje.[245-247] Ima važnu ulogu u hvatanju toksičnih metabolita dugolančanog acil-koenzima A, koji se mogu nakupljati u ishemiji i uzrokovati oštećenje sarkolemalne membrane. Nedostatak karnitina onemogućuje u mitohondriju oksidaciju masnih kiselina u ugljikov dioksid što može uzrokovati razvoj jetrene encefalopatije, hipoketotičnu hipoglikemiju ili kardiomiopatiju.[248] Osim toga, nedostatak karnitina za prijenos masnih

kiselina kroz unutarnju mitohondrijsku membranu potiče razvoj autosomno-recesivnog poremećaja oksidacije masnih kiselina koji se naziva primarnim nedostatkom karnitina.[249] Kardiomiopatija povezana sa spomenutim poremećajem često uzrokuje za život opasno zatajenje srca.[249]

Analiza rezultata istraživanja pasa s dilatacijskom kardiomiopatijom pokazala je povišenu koncentraciju karnitina u neciljanoj i ciljanoj metabolomici. U istraživanju Pierponta i suradnika primijećena je povišena koncentracija karnitina u krvi u pacijenata s kardiomiopatijom.[250] Nadalje, Aroussy i suradnici usporedili su koncentracije karnitina u plazmi i urinu pacijenata s kongestivnim zatajenjem srca i kontrolne skupine pacijenata.[251] Kongestivno zatajenje srca nastupilo je kao posljedica dilatacijske kardiomiopatije i reumatske bolesti srca. Rezultati istraživanja pokazali su povišenu koncentraciju karnitina u plazmi pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom i reumatskom bolesti srca. No u više kliničkih istraživanja provedenih na pacijentima s dilatacijskom kardiomiopatijom, akutnim miokarditisom i reumatskom bolesti srca otkrivene su niske koncentracije karnitina u lijevoj klijetki srca.[252-254] Smatra se da je povišena koncentracija karnitina u plazmi, ali i u mokraći posljedica propuštanja karnitina iz srčanog tkiva ili poteškoća u transportu karnitina do srčanih stanica.[251] Također, pretpostavlja se da je povišena koncentracija karnitina u plazmi i mokraći pacijenata s kongestivnim zatajenjem srca marker za oštećenje miokarda i promijenjene funkcije lijeve klijetke.[251]

Neciljanim i ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom identificiran je metabolit *O*-acetil-karnitin čija je koncentracija u plazmi oboljelih pasa bila povišena. Zhao i suradnici analizirali su plazmu pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom i ishemijskom kardiomiopatijom primjenom neciljanog metabolomskog pristupa.[67] Koncentracija *O*-acetil-karnitina bila je povišena u plazmi u obje skupine pacijenata.[67] Istraživanje plazme zdravih pacijenata i pacijenata s dijagnosticiranim kardiovaskularnim bolestima, kao što su hipertenzija, fibrilacija atrija, koronarna bolest srca ili vaskularna ateroskleroza, uputilo je na povišenu koncentraciju *O*-acetil-karnitina, acil-karnitina kratkog lanca, u pacijenata s kardiovaskularnim

bolestima u odnosu na zdrave pacijente.[255] Pretpostavlja se da su acil-karnitini potencijalni dijagnostički markeri kardiovaskularnih bolesti.[256] Također, mogu pomoći u razumijevanju razvoja temeljnih patoloških procesa i određivanju kardiometaboličkog rizika u ranim fazama kardiovaskularnih bolesti.[257]

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) i simetrični dimetilarginin (SDMA) dva su metabolita identificirana u plazmi pasa s iDCM-om ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom. Zbog svojih se bioloških funkcija oba metabolita smatraju kardiovaskularnim biomarkerima.[258] ADMA je modificirana aminokiselina i prirodni endogeni inhibitor sintaze dušikova oksida.[259] Smanjuje proizvodnju dušikova oksida što može rezultirati endotelnom disfunkcijom i povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti. U plazmi pasa s iDCM-om ustanovljena je povišena koncentracija obaju metabolita u odnosu na zdrave pse. Brojna su istraživanja izvijestila o povezanosti između povišene koncentracije ADMA-e i kardiovaskularnih bolesti. Tako su povišene koncentracije ADMA-e u plazmi zabilježene u pacijenata s koronarnom arterijskom bolesti,[260] perifernom arterijskom bolesti,[261,262] kroničnim zatajenjem srca,[263] plućnom hipertenzijom,[264] preeklampsijom,[265] moždanim udarom[266] i hipertrofičnom kardiomiopatijom.[267] Nadalje, nakupljanje ADMA-e zabilježeno je i kod bolesti srčanih zalistaka,[268] idiopatske dilatacijske kardiomiopatije,[269] kongenitalne bolesti srca,[270] zatajenja bubrega,[271] dijabetesa[272,273] i fibrilacije atrija.[274,275] Povišena koncentracija ADMA-e u plazmi jedan je od ključnih pokazatelja smrtnosti koja je nastupila u pacijenata nakon infarkta miokarda[276] ili koronarne bolesti.[277] Također, neovisan je čimbenik rizika za hipertenziju, koronarnu bolest arterija/aterosklerozu, dijabetes i promijenjenu funkciju bubrega koje pridonose razvoju zatajenja srca.[278]

S druge strane, simetrični dimetilarginin smatra se endogenim markerom bubrežne funkcije u ljudi, mačaka i pasa.[279,280] Nadalje, SDMA u pasa i mačaka služi za ranu identifikaciju i praćenje smanjene bubrežne funkcije kod bolesti bubrega.[279,281] Speer i suradnici pokazali su da se SDMA nakuplja u lipoproteinima visoke gustoće u pacijenata s oštećenom funkcijom bubrega.[282] Viša koncentracija SDMA-a pokazatelj je potencijalnog

rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti i smrtnost u različitim populacijama i kliničkim stanjima.[283] Djordjević i suradnici također su zamijetili povišenu koncentraciju ADMA-e i SDMA-a u plazmi pacijenata s ishemijskom bolesti srca.[284] Smatra se da su povišene koncentracije SDMA-a uz ADMA-u pokazatelji morbiditeta i mortaliteta u kardiovaskularnim bolestima.[285]

3-Metil-L-histidin metabolit je identificiran u plazmi pasa LC-MS-neciljanim metabolomskim pristupom. U pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom zabilježena je povišena koncentracija 3-metil-L-histidina u odnosu na zdrave kontrolne pse. U plazmi pacijenata s dilatacijskom kardiomiopatijom također je primijećena povišena koncentracija ovog metabolita u odnosu na zdrave pacijente.[286]

Ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom zabilježena je u plazmi pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom povišena koncentracija fenilalanina. Cheng i suradnici izvijestili su o povišenim koncentracijama fenilalanina u plazmi pacijenata s uznapredovalim zatajenjem srca i u pacijenata s rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti.[287,288] Smatra se da povišene koncentracije fenilalanina imaju dijagnostičku i prognostičku vrijednost.[289,290] Povišena koncentracija fenilalanina u plazmi može proizaći iz degradacije mišića zbog smanjena dotoka krvi u tkiva,[291] inzulinske rezistencije[292,293] i oštećene funkcije bubrega[294] ili funkcije jetre sa smanjenom hidroksilacijom fenilalanina.[295] Cheng i suradnici sugeriraju da upala utječe na porast koncentracije fenilalanina u bolesnika sa zatajenjem srca.[287] Istraživanja su pokazala da upala ima središnju ulogu u razvoju zatajenja srca.[296-298] Proupalni citokini, citokini koji nastaju aktivacijom urođene imunosti u pacijenata sa zatajenjem srca i upalom izazvana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta mogu utjecati na potrošnju znatnog dijela tetrahidrobiopterina (BH4), koji je pokazao korisne učinke u kardiovaskularnim bolestima.[299,300] Moens i suradnici proveli su istraživanje na životinjskim modelima i dokazali da je nedostatak BH4 povezan s kroničnim zatajenjem srca.[301] Cheng i suradnici istraživali su odnos povišene koncentracije fenilalanina u plazmi pacijenata s akutnim ili kroničnim zatajenjem srca i upale te imunosnih citokina.[302] Rezultati su pokazali da povišena

koncentracija fenilalanina u plazmi može uzrokovati smrtne ishode pretežno u pacijenata sa zatajenjem srca, neovisno o prognostičkim čimbenicima i citokinima povezanim s upalom i imunošću. Metabolit fenilalanin može se smatrati obećavajućim markerom za rano otkrivanje kardiovaskularnih bolesti.[288] Također, mogao bi postati novi biomarker za rano otkrivanje zatajenja srca u pacijenata.

§ 6. ZAKLJUČAK

Analiziranjem rezultata provedenih istraživanja te njihovom usporedbom s istraživanjima drugih znanstvenika može se zaključiti sljedeće:

- Istraživanjem je ustanovljeno da se metabolomski profili pasa invadiranih protozoonom *Babesia canis* i pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom značajno razlikuju od metabolomskog profila zdravih pasa
- U serumu pasa invadiranih protozoonom *Babesia canis* identificirano je 295 metabolita primjenom neciljanog i ciljanog LC-MS-metabolomskog pristupa i GC-MS-metabolomskom analizom
- Visoko statistički značajni metaboliti u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* su: inozin, hipoksantin i kolin-fosfat identificirani neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom; serotonin, metionin-sulfoksid, kinurenin i putrescin identificirani ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom te stearat i fenilalanin identificirani GC-MS-analizom (VIP >2,0)
- Metaboliti identificirani u serumu pasa invadiranih parazitom *B. canis* povezani su sa složenim patološkim interakcijama koje se zbivaju kod babezioze, kao što su oksidacijski stres, upalni odgovor domaćina, hipoksija, anemija i energetski metabolizam
- Promjene u metabolomu seruma pasa invadiranih protozoonom *B. canis* povezane su s metabolizmom a) glutationa; b) alanina, aspartata i glutamata; c) glioksilata i dikarboksilata; d) cisteina i metionina; e) arginina i prolina. Promjene su također povezane s biosintezom arginina, ciklusom limunske kiseline i biosintezom fenilalanina, tirozina i triptofana

- U istraživanju urina pasa invadiranih protozoonom *B. canis* identificirano je neciljanim i ciljanim LC-MS- metabolomskim pristupom 100 metabolita
- Pet visoko statistički značajnih pikova (VIP >2,0) detektiranih neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis* nije identificirano. Ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom (VIP >1,0) identificirani su značajni metaboliti kao što su fenilalanin, prolin, izoleucin, arginin i histidin
- Promjene u metabolomu urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* povezane su s metabolizmom a) fenilalanina; b) glicina, serina i treonina; c) histidina; d) alanina, aspartata i glutamata; e) glioksilata i dikarboksilata; f) glutamina i glutamata; g) metabolizmom arginina i prolina. Promjene su također povezane s biosintezom arginina i biosintezom fenilalanina, tirozina i triptofana
- U pasa invadiranih parazitom *B. canis* i poremećenom funkcijom bubrega ustanovljene su promjene u metabolizmu aminokiselina, energetskom metabolizmu i metabolizmu masnih kiselina
- U uzorcima plazme pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom identificirano je 272 metabolita upotrebom neciljanog i ciljanog LC-MS-metabolomskog pristupa i GC-MS-metabolomskom analizom
- U metabolomskom profilu plazme pasa s iDCM-om ustanovljene su promjene u koncentracijama aminokiselina, biogenih amina, acil-karnitina, triglicerida, diglicerida, sfingomijelina i organskih kiselina
- Visoko statistički značajni metaboliti u plazmi pasa s idiopatskom dilatacijskom kardiomiopatijom su *O*-acetil-karnitin i 3-metil-L-histidin identificirani neciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom; putrescin, asimetrični dimetilarginin, simetrični dimetilarginin, taurin i karnitin identificirani ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom te laktat identificiran GC-MS-analizom (VIP >2,0)
- Analizom bioloških puteva u pasa s iDCM-om otkrivene su promjene u metabolizmu arginina i prolina te biosintezi fenilalanina, tirozina i triptofana

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ADMA – asimetrični dimetilarginin (engl. *Asymmetric Dimethylarginine*)

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

ANOVA – analiza varijancije (engl. *Analysis Of Variance*)

ARF – akutna insuficijencija bubrega (engl. *Acute Renal Failure*)

B. canis – Babesia canis

B. gibsoni – Babesia gibsoni

B. microti – Babesia microti

B. rossi – Babesia rossi

B. vogeli – Babesia vogeli

BH4 – tetrahidrobiopterin (engl. *Tetrahydrobiopterin*, BH4)

cTnI – srčani troponin I (engl. *Cardiac Troponin I*)

FDR – mjera lažnih otkrića (detekcije) (engl. *False Discovery Rate*)

FIA-MS – analiza injektiranjem u protok uz detekciju spektrometrijom masa (engl. *Flow Injection Analysis-Mass Spectrometry*)

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

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

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

iDCM – idiopatska dilatacijska kardiomiopatija (engl. *Idiopathic Dilated Cardiomyopathy*)

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

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

Log_2 (FC) – logaritam stupnja promjene po bazi 2

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

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

MS/MS – tandemna spektrometrija masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*)

m/z – omjer mase i naboja (engl. *Mass-To-Charge Ratio*)

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

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

NT-proBNP – N-terminalni pro B-tip natriuretskih peptid (engl. *N-terminal Pro-Brain Natriurethic Peptide*)

PAF – čimbenik aktivacije trombocita (engl. *Platelet Activating Factor*)

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

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PiMP – *Polyomics integrated Metabolomics Pipeline*

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

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

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

SDMA – simetrični dimetilarginin (engl. *Symmetric Dimethylarginine*)

TNF- α – čimbenik tumorske nekroze α

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

UPC – omjer ukupnih proteina i kreatinina (engl. *Urine Protein To Creatinine Ratio*)

VIP – važnost varijable u projekciji (engl. *Variable Importance In Projection*)

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. G. Uilenberg, F. F. J. Franssen, N. M. Perie i A. M. M. Spanjer, Three groups of Babesia canis distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q* **11** (1989) 33-40.
2. A. T. Camacho, E. Pallas, J. J. Gestal, F. J. Guitian, A. S. Olmeda, H. K. Goethert i S.R. Telford, Infection of dogs in north-west Spain with a Babesia microti-like agent. *Vet Rec* **149** (2001) 552–555.
3. G. Karbowiak, The occurrence of the Dermacentor reticulatus tick-its expansion to new areas and possible causes. *Ann Parasitol* **60** (2014) 37-47.
4. L. S. Jacobson i I. A. Clark, The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. *J S Afr Vet Assoc* **65** (1994) 134-145.
5. D. Purvis i R. Kirby, Systemic inflammatory response syndrome: septic shock. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **24** (1994) 1225–1247.
6. T. P. Schetters, J. A. Kleuskens, J. Van De Crommert, P. W. De Leeuw, A. L. Finizio i A. Gorenflot, Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with Babesia canis; a haematological study. *Vet Parasitol* **162** (2009) 7-15.
7. C. Welzl, A. L. Leisewitz, L. S. Jacobson, T. Vaughan-Scott i E. Myburgh, Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc* **72** (2001) 158–162.
8. W. K. Han i J. V. Bonventre, Biologic Markers for the Early Detection of Acute Kidney Injury. *Curr Opin Crit Care* **10** (2004) 476-482.
9. J. Wynne i E. Braunwald, The cardiomyopathies and myocarditides. In: Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine 5th ed. Ed Braunwald, E. W. B. Saunders, Philadelphia. pp. 1404. (1997)
10. P. Richardson, W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarfas, I. Martin i P. Nordet, Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* **93** (1996) 841–842.

11. A. Tidholm, J. Häggström, M. Borgarelli i A. Tarducci, Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part I: Aetiology, Clinical Characteristics, Epidemiology and Pathology. *Vet. J.* **162** (2001) 92–107.
12. D. P. Schild, S. I. Ricciardi, J. G. Hellige, R. Vogel i N. Arenja. Current Pathophysiological and Genetic Aspects of Dilated Cardiomyopathy. Visions of Cardiomyocyte - Fundamental Concepts of Heart Life and Disease [Working Title] (2019).
13. D. D. Sisson i W. P. Thomas. Myocardial diseases. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. 4th edn. Ed Ettinger, S. J. W. B. Saunders, Philadelphia. pp. 995–1005 (1995).
14. A. Tidholm i L. Jönsson, A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). *J Am Anim Hosp Assoc.* **33** (1997) 544–50.
15. M. R. O'Grady, M. L. O'Sullivan, S. L. Minors i R. Horne, Efficacy of benazepril hydrochloride to delay the progression of occult dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med.* **23** (2009) 977–983.
16. N. J. Summerfield, A. Boswood, M. R. O'Grady, S. G. Gordon, J. Dukes-McEwan, M. A. Oyama, S. Smith, M. Patteson, A. T. French, G. J. Culshaw, L. Braz-Ruivo, A. Estrada, M. L. O'Sullivan, J. Loureiro, R. Willis i P. Watson, Efficacy of Pimobendan in the Prevention of Congestive Heart Failure or Sudden Death in Doberman Pinschers with Preclinical Dilated Cardiomyopathy (The PROTECT Study). *J. Vet. Intern. Med.* **26** (2012) 1337 – 1349.
17. J. Dukes-McEwan, M. Borgarelli, A. Tidholm, A. C. Vollmar i J. Häggström, Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Vet. Cardiol.* **5** (2003) 7–19.
18. A. C. Dona, S. Coffey i G. Figtree, Translational and emerging clinical applications of metabolomics in cardiovascular disease diagnosis and treatment. *Eur J Prev Cardiol.* **23** (2016) 1578-1589.
19. M. Kordalewska i M. J. Markuszewski, Metabolomics in cardiovascular diseases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **113** (2015) 121-136.
20. G. A. Nagana Gowda i D. Raftery, Biomarker Discovery and Translation in Metabolomics. *Curr. Metabolomics.* **1** (2013) 227–240.
21. S. W. Robinson, M. Fernandes i H. Husi, Current advances in systems and integrative biology. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **11** (2014) 35-46.

22. E. Karakitsou, C. Foguet, P. de Atauri, K. Kultima, P. E. Khoonsari, V. A. P. Martins dos Santos, E. Saccenti, A. Rosato i M. Cascante, Metabolomics in systems medicine: An overview of methods and applications. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **15** (2019) 91–99.
23. L. D. Roberts, A. L. Souza, R. E. Gerszten i C. B. Clish, Targeted Metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **30** (2012) 30.2.1–30.2.24.
24. J. L. Spratlin, N. J. Serkova i S. G. Eckhardt, Clinical applications of metabolomics in oncology: a review. *Clin. Cancer Res.* **15** (2009) 431-440.
25. H. G. Gika, G. A. Theodoridis, R. S. Plumb i I. D. Wilson, Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2014) 12-25.
26. L. Solano-Gallego, A. Sainz, X. Roura, A. Estrada-Peña i G. Miró, A review of canine babesiosis: The European perspective. *Parasites Vectors* **9** (2016) 336.
27. R. Beck, L. Vojta, V. Mrljak, A. Marinculić, A. Beck, T. Živičnjak i S. M. Cacciò, Diversity of Babesia and Theileria species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int. J. Parasitol.* **39** (2009) 843–848.
28. A. Chauvin, E. Moredau, S. Bonnet, O. Plantard i L. Malandri, Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* **40** (2009) 37.
29. S. M. Caccio, B. Antunovic, A. Moretti, V. Mangili, A. Marinculic, R. Baric Rafaj, S. B. Slemenda i N. J. Pieniazek, Molecular characterization of Babesia canis canis and Babesia canis vogeli from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* **106** (2002) 285-292.
30. V. Matijatko, V. Mrljak, I. Kiš, N. Kučer, J. Foršek, T. Živičnjak, Ž. Romić, Z. Šimec i J. J. Ceron, Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with Babesia canis. *Vet. Parasitol.* **144** (2007) 242-250.
31. M. Brkljačić, V. Matijatko, I. Kiš, N. Kučer, J. Foršek, R. Barić Rafaj, D. Grden, M. Torti, I. Mayer i V. Mrljak. Molecular evidence of natural infection with Babesia canis canis in Croatia. *Acta Vet. Hung.* **58** (2010) 39-46.
32. V. Matijatko, M. Torti, T. P. Schetters. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol* **28** (2012) 99-105.

33. P. Bilić, J. Kuleš, R. Barić Rafaj i V. Mrljak, Canine babesiosis: Where do we stand? *Acta Vet. Beogr*. **68** (2018) 127–160.
34. F. Beugnet i Y. Moreau, Babesiosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **34** (2015) 627-639.
35. G. Uilenberg, Babesia – A historical overview. *Vet Parasitol* **138** (2006) 3-10.
36. R. G. Lobetti, Canine babesiosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* **20** (1998) 418-431.
37. L. S. Jacobson, The South African form of severe and complicated canine babesiosis: Clinical advances 1994-2004. *Vet. Parasitol.* **138** (2006) 126-139.
38. A. L. Boozer i D. K. Macintire, Canine babesiosis. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **33** (2003) 885–904.
39. J. Taboada i S. R. Merchant, Babesiosis of Companion Animals and Man. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **21** (1991) 103–123.
40. R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein i W. J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* **101** (1992) 1644–1655.
41. C. E. Greene, Babesiosis. In Infectious Diseases of the Dog and Cat; Taboada, J., Ed.; W.B. Saunders Company: St. Louis, MO, USA, 1998; pp. 473–481. ISBN 9780323266215.
42. L. Horváth i L. Papp, Incidence, symptomatology and treatment of canine babesiosis (in Hungarian, with English abstract). Magyar Állatorvosok Lapja **51** (1996) 180–187.
43. A. Máthé, K. Vörös, L. Papp i J. Reiczigel, Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet. Hung.* **54** (2006) 367–385.
44. R. G. Lobetti, F. Reyers i J. W. Nesbit, The comparative role of haemoglobinaemia and hypoxia in the development of canine babesial nephropathy. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **67** (1996) 188–198.
45. A. Máthé, M. Dobos-Kovács i K. Vörös, Histological and ultrastructural studies of renal lesions in Babesia canis infected dogs treated with imidocarb. *Acta Vet. Hung.* **55** (2007) 511–523.
46. L. S. Jacobson, R. G. Lobetti i T. Vaughan-Scott, Blood pressure changes in dogs with babesiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **71** (2000) 14–20.
47. W. Zygner i O. Gójska-Zygner, Association between decreased blood pressure and azotaemia in canine babesiosis. *Pol. J. Vet. Sci.* **17** (2014) 173–175.

48. R. G. Lobetti i L. S. Jacobson, Renal involvement in dogs with babesiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **72(1)** (2001) 23–28.
49. R. G. Lobetti, F. Reyers, Met-haemoglobinuria in naturally occurring Babesia canis infection. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **67(2)** (1996) 88–90.
50. L. S. Koster, R. G. Lobetti i P. Kelly, Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment. *Vet. Res.* **6** (2015) 119–128
51. G. E. Lees, S. A. Brown, J. Elliott, G. F. Grauer i S. L. Vaden, Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). *J. Vet. Intern. Med.* **19** (2005) 377–385.
52. M. P. De Scally, R. G. Lobetti, F. Reyers i D. Humphris, Are urea and creatinine values reliable indicators of azotaemia in canine babesiosis? *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **75(3)** (2004) 121–124.
53. J. Sun, M. Shannon, Y. Ando, L. K. Schnackenberg, N. A. Khan, D. Portilla, R. D. Beger. Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: A pilot study. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **893-894** (2012) 107–113.
54. F. M. van der Kloet, F. W. A. Tempels, et al., Discovery of early-stage biomarkers for diabetic kidney disease using ms-based metabolomics (FinnDiane study). *Metabolomics* **8** (2012) 109-119.
55. D. B. Diercks, K. Owen, V. Tolstikov i M. Sutter, Urinary Metabolomic Analysis for the Identification of Renal Injury in Patients With Acute Heart Failure. *Acad. Emerg. Med.* **19** (2012) 18–23.
56. E. Ferlizza, G. Isani, F. Dondi, et al., Urinary proteome and metabolome in dogs (Canis lupus familiaris): The effect of chronic kidney disease. *J. Proteomics* (2020).
57. M. Oyama, Cardiomyopathy. In: Smith, F., L. Tilley, M. Oyama i M. Sleeper, editors. Manual of canine and feline cardiology. St. Louis (MO): Elsevier; p. 141–151 (2015).
58. B. J. Maron, J.A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A.J. Moss,
59. T. J. Niiranen i R. S. Vasan, Epidemiology of cardiovascular disease: recent novel outlooks on risk factors and clinical approaches. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* **14** (2016) 855–869.
60. S. H. Shah, J. L. Sun, R. D. Stevens, J. R. Bain, M. J. Muehlbauer, K. S. Pieper, C. Haynes, E. R. Hauser, W. E. Kraus, C. B. Granger, C. B. Newgard, R. M. Califf, L. K. Newby, Baseline

metabolomics profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease. *Am. Heart J*. **163** (2012) 844-850.

61. Z. Wang, E. Klipfell, et al., Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472** (2011) 57-63.
62. W. B. Dunn, D. I. Broadhurst, et al., Serum metabolomics reveals many novel metabolic maskers of heart failure including pseudouridine and 2-oxoglutarate. *Metabolomics* **3** (2007) 413-426.
63. K. Maekawa, A. Hirayama, et al., Global metabolomic analysis of heart tissue in a hamster model for dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol*. **59** (2013) 76-85.
64. Q. Li, L. M. Freeman, et al., Veterinary medicine and multi-omics research for future nutrition targets: Metabolomics and Transcriptomics of the common degenerative mitral valve diosease in dogs. *OMICS* **19** (2015) 461-470.
65. D. Alexander, R. Lombardi, et al., Metabolomic distinction and insights into the pathogenesis of human primary dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Clin. Invest*. **41** (2011) 527-38.
66. J. A. West, A. Beqqali, et al., A targeted metabolomics assay for cardiac metabolism and demonstration using a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Metabolomics* **12** (2016) 59.
67. J. Zhao, S. Yang, et al., Plasma Metabolomic Profiles Differentiate Patients With Dilated Cardiomyopathy and Ischemic Cardiomyopathy. *Front. Cardiovasc. Med*. **7** (2020).
68. K. Dettmer, P. A. Aronov i B. D. Hammock, Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **26** (2007) 51–78.
69. G. J. Patti, O. Yanes i G. Siuzdak, Innovation: metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13** (2012) 263–269.
70. M. M. Khamis, D. J. Adamko i A. El-Aneed, Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrom. Rev.* **36** (2017) 115–134.
71. R. E. Moore, J. Kirwan, M. K. Doherty i P. D. Whitfield, Biomarker Discovery in Animal Health and Disease: The Application of Post-Genomic Technologies. Biomark. Insights **2** (2007) 185–196.
72. W. B. Dunn i D. I. Ellis, Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal. Chem.* **24(4)** (2005) 285-294.
73. J. L. Griffin i J. P. Shockcor, Metabolic profiles of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **4** (2004) 551-561.

74. B. N. Ametaj, Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, 2018.
75. H. Bi, Z. Guo, et al., The key points in the pre-analytical procedures of blood and urine samples in metabolomics studies. *Metabolomics* **16** (2020) 68.
76. E. J. Want, I. D. Wilson, et al., Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC–MS. *Nat. Protoc*. **5** (2010) 1005–1018.
77. D. Ryan, K. Robards, et al., Recent and potential developments in the analysis of urine: a review. *Anal. Chim. Acta* **684** (2011) 17–29.
78. P. Ambroise-Thomas, Malaria and babesiosis: two diseases but one fight. *Biofutur* **116** (1992) 27.
79. I. A. Clark i L. S. Jacobson, Do babesiosis and malaria share a common disease process? *Ann Trop Med Parasitol.* **92 (4)** (1998) 483–488.
80. T. R. Sana, D. B. Gordon, et al., Global Mass Spectrometry Based Metabolomics Profiling of Erythrocytes Infected with Plasmodium falciparum. *PLoS ONE* **8(4)** (2013) e60840.
81. A. Sengupta, S. Gnosh, et al., Host metabolic responses to Plasmodium falciparum infections evaluated by 1H NMR metabolomics. *Mol. BioSyst.* **12(11)** (2016) 3324-3332.
82. S. Ghosh, S. Pathak, et al., Metabolomic changes in vertebrate host during malaria disease progression. *Cytokine* **112** (2018) 32-43.
83. T. Paget, N. Haroune, S. Bagchi i E. Jarroll, Metabolomics and protozoan parasites. *Acta Parasitol.* **58(2)** (2013) 127-31.
84. S. Akpunarlieva, S. Weidt, D. Lamasudin, C. Naula, D. Henderson, M. Barrett, R. Burchmore, Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in Leishmania. *J. Proteom.* **155** (2017) 85–98.
85. N. A. D. Atan, M. Koushki, N. A. Ahmadi, M. Rezaei-Tavirani, Metabolomics-based studies in the field of Leishmania /leishmaniasis. *Alexandria J. Med*. **54(4)** (2018) 383-390.
86. I. M. Vincent, D. J. Creek, K. Burgess, D. J. Woods, R. J. S. Burchmore, M. P. Barrett, Untargeted Metabolomics Reveals a Lack Of Synergy between Nifurtimox and Eflornithine against Trypanosoma brucei. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **6(5)** (2012) e1618.
87. M. P. Barrett, B. M. Bakker i R. Breitling, Metabolomic systems biology of trypanosomes. *Parasitology* **137(09)** (2010) 1285–1290.

88. X. Yu, G. Feng, Q. Zhang i J. Cao, From Metabolite to Metabolome: Metabolomics Applications in Plasmodium Research. *Front. Microbiol.* **11** (2021) 626183.
89. J. Na, A. Khan, J. K. Kim, et al., Discovery of metabolic alterations in the serum of patients infected with Plasmodium spp. by high-resolution metabolomics. *Metabolomics* **16** (2020) 9.
90. G. L. Salvagno, E. Danese i G. Lippi, Preanalytical variables for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of human blood specimens. *Clin. Biochem* **50(10-11)** (2017) 582–586.
91. C. Morris, C. O'Grada, M. Ryan, H. M. Roche, M. J. Gibney, E. R. Gibney i L. Brennan, The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids. *P NUTR SOC* **71(04)** (2012) 634–638.
92. Q. Li, L. M. Freeman, et al., Veterinary medicine and multi-omics research for future nutrition targets: metabolomics and transcriptomics of the common degenerative Mitral Valve Disease in Dogs. *OMICS* **19** (2015) 461–470.
93. G. M. Forster, J. Stockman, et al., A comparative study of serum biochemistry, metabolome and microbiome parameters of clinically healthy, normal weight, overweight, and obese companion dogs. *Top. Companion Anim. Med.* **33** (2018) 126–135.
94. A. Muñoz-Prieto, L. G. González-Arostegui et al., Untargeted metabolomic profiling of serum in dogs with hypothyroidism.*Vet. Sci. Res. J.* **136** (2021), 6-10.
95. A. Horvatić, A. Gelemanović, et al., Multi-Omics Approach to Elucidate Cerebrospinal Fluid Changes in Dogs with Intervertebral Disc Herniation. *Int. J. Mol. Sci*. **22** (2021) 11678.
96. R. Tamai, M. Furuya, et al., Profiling of serum metabolites in canine lymphoma using gas chromatography mass spectrometry. *J Vet Med Sci* **76(11)** (2014) 1513–1518.
97. Y. Minamoto, C. C. Otoni, et al., Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes* **6(1)** (2015) 33–47.
98. A. L. O'Kell, T. J. Garrett, C. Wasserfall i M. A. Atkinson, Untargeted metabolomic analysis in naturally occurring canine diabetes mellitus identifies similarities to human Type 1 Diabetes. *Sci.Re.* **7(1)** (2017) 1–7.

99. M. Abdullah, J. N. Kornegay, et al., Non-targeted metabolomics analysis of Golden Retriever Muscular Dystrophy-affected muscles reveals alterations in arginine and proline metabolism, and elevations in glutamic and oleic acid in vivo. *Metabolites* **7(3)** (2017) 1–19.

100. A. I. de Souza, S. Cardin, et al., Proteomic and metabolomic analysis of atrial profibrillatory remodelling in congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49(5)** (2010) 851–863.

101. J. Shibayama, T. N. Yuzyuk, et al., Metabolic remodeling in moderate synchronous versus dyssynchronous pacing-induced heart failure: Integrated metabolomics and proteomics study. *PLoS ONE* **10(3)** (2015) 1–32.

102. J. Zhang, S. Wei, et al., NMR-based metabolomics study of canine bladder cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1822(11)** (2012) 1807–1814.

103. S. Maity, I. Rubić, et al., Integrated Metabolomics and Proteomics Dynamics of Serum Samples Reveals Dietary Zeolite Clinoptilolite Supplementation Restores Energy Balance in High Yielding Dairy Cows. *Metabolites* **11** (2021) 842.

104. J. Pontes, F. B. de Santana, et al., Biomarkers of the caseous lymphadenitis in sheep by NMR-based metabolomics. *Metabolomics* **7** (2017) 190.

105. F. J. Gonzalez, Z. -Z. Fang i X. Ma, Transgenic mice and metabolomics for study of hepatic xenobiotic metabolism and toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11(6)** (2015) 869–881.

106. M. Zheng, Y. -Y. Li, et al., Protective effect of cultured bear bile powder against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Biomed. Pharmacother.* **112** (2019) 108701.

107. F. C. Thomas, M. Mudaliar, R. Tassi, T. N. McNeilly, R. Burchmore, K. Burgess, P. Herzyk, R. N. Zadoks i P. D. Eckersall, Mastitomics, the integrated omics of bovine milk in an experimental model of Streptococcus uberis mastitis: 3. Untargeted metabolomics. *Mol. Biosyst.* **12(9)** (2016) 2762–2769.

108. G. Carlos, F. P. dos Santos i P. E. Fröehlich, Canine metabolomics advances. *Metabolomics* **16** (2020) 16.

109. Ö. C. Zeki, C. C. Eylem, T. Reçber, S. Kır I E. Nemutlu, Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. *J. Pharm. Biomed.* **190** (2020) 113509.

110. G. A. N. Gowda i D. Djukovic, Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods Mol Biol.* **1198** (2014) 3-12.

111. E. De Hoffmann i V. Stroobant, Mass Spectrometry-Principles and Applications, Third Edition, John Wiley, Chichester, 2007.

112. M. L. Gross, Charge-remote fragmentation: an account of research on mechanisms and applications. *J. Mass. Spectrom*. **200** (2000) 611-624.

113. D. A. Skoog, F. J. Holler i T. A. Nieman, Principles of Instrumental Analysis, Harcourt College Publishers, Philadelphia, 1998.

114. A. Klupczyska, P. Derezinski i Z. J. Kokot, METABOLOMICS IN MEDICAL SCIENCES-TRENDS, CHALLENGES AND PERSPECTIVES. *Acta Pol. Pharm.* **72(4)** (2015) 629-41.

115. J. F. Xiao, B. Zhou i H. W. Ressom, Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends Anal. Chem.* **32** (2012) 1-14.

116. A. Periat, I. S. Krull i D. Guillarme, Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins. *J. Sep. Sci.* **38** (2015) 357-367.

117. T. M. O'Connell TM, Recent advances in metabolomics in oncology. *Bioanalysis* **4(4)** (2012) 431-51.

118. M. D. Williams, R. Reeves, L. S. Resar i H. H. Hill Jr, Metabolomics of colorectal cancer: past and current analytical platforms. *Anal Bioanal Chem.* **405(15)** (2013) 5013-30.

119. B. J. Trock, Application of metabolomics to prostate cancer. *Urol Oncol.* **29(5)** (2011) 572-81.

120. N. Abbassi-Ghadi, S. Kumar, J. Huang, R. Goldin, Z. Takats i G. B. Hanna, Metabolomic profiling of oesophago-gastric cancer: a systematic review. *Eur J Cancer.* **49(17)** (2013) 3625-37.

121. S. H. Shah, W. E. Kraus I C. B. Newgard, Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation* **126(9)** (2012) 1110-20.

122. E. P. Rhee i R. E. Gerszten, Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clin Chem*. **58(1)** (2012) 139-47.

123. R. H. Weiss I K. Kim K, Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. **8(1)** (2011) 22-33.

124. M. Mamas, W. B. Dunn, L. Neyses I R. Goodacre, The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol.* **85(1)** (2011) 5-17.

125. D. G. Robertson, P. B. Watkins I M. D. Reily, Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. *Toxicol Sci*. **120(S1)** (2011) S146-S170.

126. A. Scalbert, L. Brennan, et al., Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* **5(4)** (2009) 435-458.

127. M. L. Reaves i J. D. Rabinowitz, Metabolomics in systems microbiology. *Curr Opin Biotechnol.* **22(1)** (2011) 17-25.

128. N. Zamboni, S. M. Fendt, M. Rühl i U. Sauer, ^{13}C-based metabolic flux analysis. *Nat Protoc.* **4(6)** (2009) 878-92.

129. M. -H. Zhang, J. -Q. Chen, H. -M. Guo, R. -T. Li, Y.-Q. Gao, Y. Tian, Z.-J. Zhang i Y. Huang, Combination of LC/MS and GC/MS based metabolomics to study the hepatotoxic effect of realgar nanoparticles in rats. *Chin. J. Nat. Med*. **15(9)** (2017) 684-694.

130. G. G. Harrigan i R. Goodacre (Editors), Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis, Kluwer Academic Publishers, London, UK, 2003.

131. C. Wagner, M. Sefkow i J. Kopka, Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry* **62** (2003) 887-900.

132. R. Bakhtiar, L. Ramos i F.L.S. Tse, HIGH-THROUGHPUT MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF XENOBIOTICS IN BIOLOGICAL FLUIDS. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **25** (2002) 507-540.

133. P. Jandera i P. Janás, Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Anal. Chim. Acta* **967** (2017) 12-32.

134. P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal. Chim. Acta* **692** (2011) 1-25.

135. B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* **402** (2012) 231-247.

136. P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* **29** (2006) 1784-1821.

137. Y. Guo, S. Gaiki, Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **1074** (2005) 71-80.

138. D. V. McCalley, Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A* **1171** (2007) 46-55.

139. A. J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* **499** (1990) 177-196.

140. T. Kind, O. Fiehn, What are the obstacles for an integrated system for comprehensive interpretation of cross-platform metabolic profile data? *Bioanalysis* **1(9)** (2009) 1511-1514.

141. E. Melamud, L. Vastag i J. D. Rabinowitz. Metabolomic analysis and visualization engine for LC-MS data. *Anal. Chem.* **82** (2010) 9818-9826.

142. E. Zelena, W. B. Dunn, D. Broadhurst, S. Francis-McIntyre, K. M. Carroll, et al., Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal. Chem.* **81** (2009) 1357-1364.

143. R. Tautenhahn, C. Bottcher i S. Neumann. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* **9** (2008) 504.

144. W. Windig, The use of the Durbin-Watson criterion for noise and background reduction of complex liquid chromatography/mass spectrometry data and a new algorithm to determine sample differences. *Chemometr Intell Lab Syst* **77** (2004) 206-214.

145. B. Zhou, J. F. Xiao, L. Tuli i H. W. Ressom, LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst* **8(2)** (2012) 470-81.

146. J. Chong, D. S. Wishart i J. Xia, Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* **68** (2019) e86.

147. C. D. Pederzolli, Â. M. Sgaravatti; C. A. Braum, C. C. Prestes, G. K. Zorzi, M. B. Sgarbi i A. T. Wyse, 5-Oxoproline Reduces Non-Enzymatic Antioxidant Defenses in vitro in Rat Brain. *Metab. Brain Dis.* **22** (2007) 51–65.

148. M. Crnogaj, J. J. Cerón, I. Šmit, I. Kiš, J. Gotić, M. Brkljačić, V. Matijatko, C. P. Rubio, N. Kučer, N i V. Mrljak, Relation of antioxidant status at admission and disease severity and outcome in dogs naturally infected with Babesia canis canis. *BMC Vet. Res.* **13** (2017) 114.

149. W. Wang, Z. Wu, G. Lin, S. Hu, B. Wang, Z. Dai i G. Wu, Glycine stimulates protein synthesis and inhibits oxidative stress in pig small intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **144** (2014) 1540–1548.

150. Z. Zhong, M. D. Wheeler, X. Li, M. Froh, P. Schemmer, M. Yin, H. Bunzendaul, B. Bradford, i J. J. Lemasters, L-Glycine: A novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **6** (2003) 229–240.

151. Y. Liu, X. Wang, H. Wu, S. Chen, H. Zhu, J. Zhang, Y. Hou, C. -A. A Hu i G. Zhang, Glycine enhances muscle protein mass associated with maintaining Akt-mTOR-FOXO1 signaling and suppressing TLR4 and NOD2 signaling in piglets challenged with LPS. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **311** (2016) R365–R373.

152. H. T. Wu, Regulative Effect of Glycine on Intestinal Injury and Muscle Protein Sythesis and Degradation of Piglets after Lipopolysaccharide Challenge. Master's Thesis, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, China, 2015.

153. Y. Liu, X. Wang, i C. A. Hu, Therapeutic Potential of Amino Acids in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* **9** (2017) 920.

154. I. Tsune, K. Ikejima, M. Hirose, M. Yoshikawa, N. Enomoto, Y. Takei i N. Sato, Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. *Gastroenterology* **125** (2003) 775–785.

155. R. J. Cordy, R. Patrapuvich, L. N. Lili, M. Cabrera-Mora, J. T. Chien, G. K. Tharp, M. Khadka, E. V. Meyer i S. A. Lapp, Distinct amino acid and lipid perturbations characterize acute versus chronic malaria. *JCI Insight* **4** (2019) e125156.

156. I. W. Sherman, Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull World Health Organ.* **55** (1977) 265–276.

157. A. C. C. C. Branco, F. S. Y. Yoshikawa, A. J. Pietrobon i M. N. Sato, Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediat. Inflamm.* **2018** (2018) 1–10.

158. I. D. Algranati, Polyamine metabolism in Trypanosoma cruzi: Studies on the expression and regulation of heterologous genes involved in polyamine biosynthesis. *Amino Acids* **38** (2010) 645–651.

159. C. Rojas-Martínez, R. I. Rodríguez-Vivas, J. V. Figueroa Millán, K. Y. Acosta Viana, E. J. Gutiérrez Ruiz i J. A. Álvarez Martínez, Putrescine: Essential factor for in vitro proliferation of Babesia bovis. *Exp. Parasitol*. **175** (2017) 79–84.

160. K. Clark, J. Niemand, S. Reeksting, S. Smit, A. C. van Brummelen, M. Williams, A. I. Louw i L. Birkholtz, Functional consequences of perturbing polyamine metabolism in the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Amino Acids* **38** (2010) 633–644.

161. A. Zotta, Z. Zaslona i L. A. O'Neill, Is Citrate A Critical Signal in Immunity and Inflammation? *J. Cell. Signal.* **1** (2020) 87–96.

162. M. J. Ashbrook, K. L. McDonough, J. J. Pituch, P. L. Christopherson, T. T. Cornell, D. T. Selewski, T. P. Shanley i N. B. Blatt, Citrate modulates lipopolysaccharide-induced monocyte inflammatory responses. *Clin. Exp. Immunol*. **180** (2015) 520–530.

163. P. Zhong, J. Zhang i X. Cui, Abnormal metabolites related to bone marrow failure in aplastic anemia patients. *Genet. Mol. Res.* **14** (2015) 13709–13718.

164. J. O. Tormey, C. F. Nathan, K. Lanks, C. J. Deboer i J. D. L. Harpe, Secretion of pyruvate. An Antioxidant Defense of Mammalian Cells. *J. Exp. Men* **165(2)** (1987) 500-514.

165. Y. J. Lee, I. J. Kang, R. Bünger i Y. H. Kang, Mechanisms of pyruvate inhibition of oxidant-induced apoptosis in human endothelial cells. *Microvasc. Res*. **66(2)** (2003) 91–101.

166. E. M. Knott, J. Sun, Y. Lei, M. G. Ryou, A. H. Olivencia-Yurvati i R. T. Mallet, Pyruvate Mitigates Oxidative Stress During Reperfusion of Cardioplegia-Arrested Myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* **81(3)** (2006) 928–934.

167. L. S. Jacobson i R. G. Lobetti, Glucose, lactate, and pyruvate concentrations in dogs with babesiosis. *AJVR* **66(2)** (2005) 244-250.

168. I. G. Wright, D. J. Waltisbuhl, D. F. Mahoney i B. V. Goodger, Acute Babesia bovis infections: Metabolic and blood gas changes during infection. *Br. Vet. J.* **138(1)** (1982) 61-9.

169. T. M. E. Davis, J. J. Benn, Y. Suputtamongkil, J. Weinberg, A. M. Umpleby, N. Chierakul i N. White, Lactate turnover and forearm lactate metabolism in severe falciparum malaria. *Endocrinol Metab* **3** (1996) 105–115.

170. N. Krishnan, M. B. Dickman i D. F. Becker, Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **44(4)** (2008) 671–681.

171. J. C. Hoak, Stearic acid, clotting, and thrombosis. *Am J Clin Nutr* **60** (1994) 1050S-1053S.

172. R. B. Rafaj, A. Marinculić, B. Raić, V. Mrljak, Z. Žvorc i P. Ramadan, Activation du facteur Hageman chez les chiens atteints de babesiose. *Rev.Med.Vet.* **152(7)** (2001) 545-547.

173. I. H. Page i J. W. McCubbin, The variable arterial pressure response to serotonin in laboratory animals and man. *Circ. Res.* **1** (1953) 354–362.

174. G. Kirtz, M. Leschnik, E. Hooijberg, A. Tichy i E. Leidinger, In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (Babesia canis canis) for veterinary practitioners in Central Europe. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* **40(2)** (2012) 87-94.

175. A. J. Cleare, Reduced whole blood serotonin in major depression. *Depress. Anxiety* **5** (1997) 108–111.

176. K. Pawlak, M. Mysliwiec i D. Pawlak, Haemostatic system, biochemical profiles, kynurenines and the prevalence of cardiovascular disease in peritoneally dialyzed patients. *Thromb. Res*. **125** (2010) e40–e45.

177. K. Pawlak, T. Domaniewski, M. My´sliwiec i D. Pawlak, Kynurenines and oxidative status are independently associated with thrombomodulin and von Willebrand factor levels in patient with endstage renal disease. *Thromb. Res.* **124** (2009) 452–457.

178. J. Kuleš, J. Gotić, V. Mrljak i R. B. Rafaj Rafaj, Blood markers of fibrinolysis and endothelial activation in canine babesiosis. *BMC Vet. Res.* **13** (2017) 82.

179. S. G. Tewari, K. Rajaram, P. Schyman, R. Swift, J. Reifman, S. T. Prigge i A. Wallqvist, Short-term metabolic adjustments in Plasmodium falciparum counter hypoxanthine deprivation at the expense of long-term viability. *Malar J* **18** (2019) 86.

180. C. Michiels, Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am.J.Pathol* **164** (2004) 1875-1882.

181. M. Furuhashi, M. Koyama, et al. Differential regulation of hypoxanthine and xanthine by obesity in a general population. *J Diabetes Investig.* **11(4)** (2020) 878-887.

182. W. E. Wung i S. B. Howell, Simultaneous liquid chromatography of 5-flurouracil, uridine, hypoxanthine, xanthine, allopurinol, and oxypurinol in plasma. *Clin Chem* **26** (1980) 1704–1708.

183. S. Neumman, H. Welling i S. Thuere, Evaluation of Serum L-phenylalanine Concentration as Indicator of Liver Disease in Dogs: A Pilot Study. *J Am Anim Hosp Assoc* **43(4)** (2007) 193-200.

184. S. S. Bürgi, S. Schroecksnadel, M. Jenny, D. Karall i D. Fuchs, Chronic Immune Stimulation May Cause Moderate Impairment of Phenylalanine 4-hydroxylase. *Pteridines* **22(1)** (2011) 120-125.

185. T. Dawiskiba, Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* **20(1)** (2014) 163.

186. J. Florin-Christensen, C. E. Suarez, M. Florin-Christensen, S. A. Hines, T. F. McElwain i G. H. Palmer, Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite Babesia bovis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **106** (2000) 147–156.

187. W. Khovidhunkit, M. S. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold i C. Grunfeld, Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* **45(7)** (2004) 1169–1196.

188. J. P. Slotte, Biological functions of sphingomyelins. *Prog. Lipid Res.* **52** (2013) 424–437.

189. I. -G. Rivera, M. Ordoñez, N. Presa, A. Gomez-Larrauri, J. Simón, M. Trueba i A. Gomez-Muñoz, Sphingomyelinase D/Ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammation. *Toxins* **7(5)** (2015) 1457–1466.

190. R. M. Sargis i P. V. Subbaiah, Protection of membrane cholesterol by sphingomyelin against free radical-mediated oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **40** (2006) 2092–2102.

191. E. M. Oborina, M. C. Yappert, Efect of sphingomyelin versus dipalmitoylphosphatidylcholine on the extent of lipid oxidation. *Chem. Phys. Lipids* **123** (2003) 223–232.

192. T. Lupanova, N. Stefanova, D. Petkova, G. Staneva, A. Jordanova, K. Koumanov, R. Pankov i A. Momchilova, Alterations in the content and physiological role of sphingomyelin in plasma membranes of cells cultured in three-dimensional matrix. *Mol. Cell Biochem.* **340** (2010) 215–222.

193. G. Coliva, M. Lange, S. Colombo, J. P. Chervet, M. R. Domingues i M. Fedorova, Sphingomyelins Prevent Propagation of Lipid Peroxidation- LC-MS/MS Evaluation of Inhibition Mechanisms. *Molecules* **25(8)** (2020) 1925.

194. M. Crnogaj, I. Kiš, N. Kučer, I. Šmit, I. Mayer, M. Brkljačić, J. Selanec i V. Mrljak, Lipid peroxidation in dogs naturally infected with Babesia canis canis. *Vet. Arhiv* **85** (2015) 37–48.

195. M. E. Suliman, A. R. Qureshi, et al., Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Clin. Nutr*. **82** (2005) 342–349.

196. F. Duranton, U. Lundin, et al., Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. **9** (2014) 37–45.

197. G. Garibotto, A. Sofia, S. Saffioti, A. Bonanni, I. Mannucci i D. Verzola. D, Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. *Clin. Nutr*. **29** (2010) 424–433.

198. J. D. Kopple, Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. *J. Nutr.* **137** (2007) 1586S–1590S.

199. Q. Feng, Y. Li, Y. Yang i J. Feng, Urine metabolomics analysis in patients with normoalbuminuric diabetic kidney Disease. *Front. Physiol.* **11** (2020) 578799.

200. G. Wu i S. M. Jr. Morris, Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336** (1998) 1–17.

201. L. Elsherif, W. Pathmasiri, S. Mcritchie, D. R. Archer i K. I. Ataga, Plasma metabolomics analysis in sickle cell disease patients with albuminuria – an exploratory study. *Br. J. Haematol.* **185** (2019) 620–623.

202. M. Nel, R. Lobetti, N. Keller i P. Thompson, Prognostic value of blood lactate, blood glucose, and hematocrit in canine babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.* **18** (2004) 471–476.

203. M. Torti, J. Kuleš, et al., Acidbase status in canine babesiosis caused by Babesia canis. *Vet. Arh.* **90** (2020) 603–610.

204. J. Kuleš, P. Bilić, et al., Glomerular and tubular kidney damage markers in canine babesiosis caused by Babesia canis. *Ticks Tick Borne Dis.* **9** (2018) 1508–1517.

205. E. L. Mills, B. Kelly i L. A. J. O'Neill, Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat. Immunol.* **18** (2017) 488–498.

206. M. Posada-Ayala, I. Zubiri, et al., Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease. *Kidney Int.* **85** (2014) 103–111.

207. A. L. Leisewitz, L. S. Jacobson, H. S. A. de Morais i F. Reyers, The mixed acid-base disturbances of severe Canine Babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.* **15** (2001) 445–452.

208. W. Zygner, O. Gójska-Zygner i H. Wedrychowicz, Strong monovalent electrolyte imbalances in serum of dogs infected with Babesia canis. *Ticks Tick Borne Dis.* **3** (2012) 107–113.

209. O. Zhenyukh, E. Civantos, et al., High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free Radic. Biol. Med.* **104** (2017) 165–177.

210. O. Zhenyukh, M. González-Amor, et al., Branched-chain amino acids promote endothelial dysfunction through increased reactive oxygen species generation and inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* **22** (2018) 4948–4962.

211. R. B. Rafaj, J. Kuleš, et al., Markers of coagulation activation, endothelial stimulation, and inflammation in dogs with babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.* **27** (2013) 1172–1178.

212. W. Zygner i O. Gójska-Zygner, Association between decreased blood pressure and azotaemia in canine babesiosis. *Pol. J. Vet. Sci.* **17** (2014) 173–175.

213. A. Goddard, A. L. Leisewitz, M. Kjelgaard-Hansen, A. T. Kristensen i J. P. Schoeman, Excessive pro-inflammatory serum cytokine concentrations in virulent Canine Babesiosis. *PLoS One* **11** (2016) e0150113.

214. A. Galán, I. Mayer, et al., MCP-1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by Babesia canis. *PLoS One* **13** (2018) e0190474.

215. S. Abdelrazig, C. A. Ortori, et al., A metabolomic analytical approach permits identification of urinary biomarkers for Plasmodium falciparum infection: a case–control study. *Malar. J.* **16** (2017) 229.

216. G. Andrea, C. Andrea, R. Paolo i B. Gianfranco, Carnosine and carnosine-related antioxidants: a review. *Curr. Med. Chem.* **12** (2005) 2293–2315.

217. Z. H. Zhang, F. Wei, et al., Metabolomics insights into chronic kidney disease and modulatory effect of rhubarb against tubulointerstitial fibrosis. *Sci. Rep.* **5** (2015) 14472.

218. Z. -H. Zhang, H. Chen, et al., Metabolomic signatures of chronic kidney disease of diverse etiologies in the rats and humans. *J. Proteome Res.* **15** (2016) 3802–3812.

219. M. Shao, H. Lu, et al., Serum and urine metabolomics reveal potential biomarkers of T2DM patients with nephropathy. *Ann. Transl. Med.* **8** (2020) 199–199.

220. B. Bjørndal, E. K. Alterås, C. Lindquist, A. Svardal, J. Skorve i R. K. Berge, Associations between fatty acid oxidation, hepatic mitochondrial function, and plasma acylcarnitine levels in mice. Nutr. Metab. **15** (2018) 10.

221. S. Hallan, M. Afkarian, et al., Metabolomics and gene expression analysis reveal down-regulation of the citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients. *EBioMedicine* **26** (2017) 68–77.

222. R. M. Salek, M. L. Maguire, et al., A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol. Genomics* **29** (2007) 99–108.

223. N. Keller, L. S. Jacobson, M. Nel, M. de Clerq, P. N. Thompson i J. P. Schoeman, Prevalence and risk factors of hypoglycemia in virulent canine babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.* **18** (2004) 265–270.

224. P. Rees i J. Schoeman, Plasma insulin concentrations in hypoglycaemic dogs with Babesia canis rossi infection. *Vet. Parasitol.* **152** (2008) 60–66.

225. J. Maiuolo, F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli i V. Mollace, Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int. J. Cardiol.* **213** (2016) 8–14.

226. E. C. Laiakis, D. R. Hyduke i A. J. Jr. Fornace, Comparison of mouse urinary metabolic profiles after exposure to the inflammatory stressors y Radiation and Lipopolysaccharide. *Radiat. Res.* **177** (2012) 187–199.

227. E. M. Slominska, M. Szolkiewicz, R. T. Smolenski, B. Rutkowski i J. Swierczynski, High plasma adenine concentration in chronic renal failure and its relation to erythrocyte ATP. *Nephron* **91** (2002) 286–291.

228. S. Barnes, J. L. Gollan i B. H. Billing, The role of tubular reabsorption in the renal excretion of bile acids. *Biochem. J.* **166** (1977) 65–73.

229. F. A. Wilson, G. Burckhardt, H. Murer, G. Rumrich i K. J. Ullrich, Sodium-coupled taurocholate transport in the proximal convolution of the rat kidney in vivo and in vitro. *J. Clin. Invest.* **67** (1981) 1141–1150.

230. J. Y. L. Chiang, Bile acid metabolism and signaling. *Compr. Physiol.* **3** (2013) 1191–1212.

231. J. H. Schlattjan, C. Winter i J. Greven, Regulation of renal tubular bile acid transport in the early phase of an obstructive cholestasis in the rat. *Nephron Physiol.* **95** (2003) 49–56.

232. J. H. Schlattjan, S. Benger, A. Herrler, U. von Rango i J. Greven, Regulation of taurocholate transport in freshly isolated proximal tubular cells of the Rat Kidney by Protein Kinases. *Nephron Physiol.* **99** (2005) 35–42.

233. W. R. Parrish, M. Gallowitsch Puerta, et al., Choline suppresses inflammatory responses. *Shock* **25** (2006) 45.

234. M. Rosas-Ballina i K. J. Tracey, Cholinergic control of inflammation. *J. Intern. Med.* **265** (2009) 663–679.

235. J. Ka´zmierczak-Bara´nska, K. Boguszewska, A. Adamus-Grabicka i B. T. Karwowski, Two faces of Vitamin C-antioxidative and pro-oxidative agent. *Nutrients* **12** (2020) 1501.

236. S. X. Racine, P. Le Toumelin, et al., 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** (2004) 53–57.

237. K. Prajna, J. Ashok Kumar, et al., Predictive value of serum sialic Acid in type-2 diabetes mellitus and its complication (nephropathy). *J. Clin. Diagn. Res.* **7** (2013) 2435–24.

238. J. Ritterhoff i R. Tian, Metabolism in cardiomyopathy: Every substrate matters. *Cardiovasc. Res.* **113** (2017) 411–421.

239. S. Dong, L. Qian, Z. Cheng, C. Chen, K. Wang, S. Hu, X. Zhang i T. Wu, Lactate and Myocadiac Energy Metabolism. *Front. Physiol.* **12** (2021) 715081.

240. J. Haas, K. S. Frese, et al., Energy Metabolites as Biomarkers in Ischemic and Dilated Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 1999.

241. O. Cerovic, V. Golubovic, A. Spec-Marn, B. Kremzar i G. Vidmar, Relationship between injury severity and lactate levels in severely injured patients. *Intensive Care Med.* **29** (2003) 1300–1305.

242. H. B. Nguyen, E. P. Rivers, et al., Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* **32** (2004) 1637–1642.

243. H. Khosravani, R. Shahpori, H. T. Stelfox, A. W. Kirkpatrick i K. B. Laupland, Occurrence and adverse effect on outcome of hyperlactatemia in the critically ill. *Crit. Care* **13** (2009) R90.

244. J. Bremer, Carnitine- metabolism and functions. *Physiol. Rev.* **63(4)** (1983) 1420-1480.

245. C. Hoppel, The Physiological role of carnitine. L-carnitine and its role in medicine: from function to therapy. (Eds. R. Ferrari, S. DiMauro i G. Sherwood) Academic press limited. London 1992, pp: 5-17.

246. D. J. Paulson i A. L. Shug, Tissue specific depletion of L-carnitine rat heart and skeletal muscle by L-carnitine. *Life Sci* **28** (1981) 2931-8.

247. C. J. Rebouche i A. G. Engel, Carnitine metabolism and deficiency syndromes. *Mayo Clin Proc.* **58** (1983) 533-40.

248. P. L. Magoulas i A. W. El-Hattab, Systemic primary carnitine deficiency: an overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J. Rare Dis.* **7** (2012) 68.

249. S. Wang, J. Rao, Y. Li, Z. Zhang i G. Zeng, Primary carnitine deficiency cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **174(1)** (2014) 171–173.

250. M. E. Pierpont, D. Judd, I. Goldenberg, W. S. Ring, M. T. Olivari i G. L. Pierpont, Myocardial carnitine in end-stage congestive heart failure. *Am J Cardiol* **64** (1989) 56–60.

251. W. El-Aroussy, A. Rizk, G. Mayhoub, S. A. Aleem, S. El-Tobgy i M. S. Mokhtar, Plasma carnitine levels as a marker of impaired left ventricular functions. *Mol. Cell. Biochemistry* **213** (2000) 37–41.

252. Regitz V, Shug AL, Fleck E: Defective myocardial carnitine metabolism in congestive heart failure secondary to dilated cardiomyopathy and to coronary, hypertensive, and valvular heart disease. Am J Cardiol **65** (1990) 755–760.

253. Regitz V, Bossaller C, Strasser R, Müller M, Shug AL, Fleck E: Metabolic alterations in end stage and less severe heart failure-myocardial carnitine decrease. J Clin Chem Clin Biochem **28** (1990) 611–617.

254. Wittles B, Spann JF Jr: Defective lipid metabolism in the failing heart. J Clin Invest **47** (1968) 1787–1794.

255. A. Kukharenko, A. Brito, et al., Relationship between the plasma acylcarnitine profile and cardiometabolic risk factors in adults diagnosed with cardiovascular diseases. *Clin. Chim. Acta*. **507** (2020) 250-256.

256. S. E. Reuter i A. M. Evans, Carnitine and acylcarnitines, *Clin. Pharmacokinet*. **51 (9)** (2012) 553–572.

257. E. Strand, E. R. Pedersen, et al., Serum acylcarnitines and risk of cardiovascular death and acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris, *J. Am. Heart Assoc.* **6 (2)** (2017) e003620.

258. E. H. Zobel, B. J. von Scholten, et al., Symmetric and asymmetric dimethylarginine as risk markers of cardiovascular disease, all-cause mortality and deterioration in kidney function in persons with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Cardiovasc Diabetol* **16** (2017) 88.

259. P. Vallance, A. Leone, A. Calver, J. Collier i S. Moncada, Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **339** (1992) 572-5.

260. V. P. Valkonen, H. Paiva, et al., Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* **358** (2001) 2127-8.

261. R. H. Boger, S. M. Bode-Boger, W. Thiele, W. Junker, K. Alexander i J. C. Frolich, Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* **95** (1997) 2068-74.

262. F. Mittermayer, K. Krzyzanowska, et al., Asymmetric dimethylarginine predicts major adverse cardiovascular events in patients with advanced peripheral artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** (2006) 2536-40.

263. M. Usui, H. Matsuoka, H. Miyazaki, S. Ueda, S. Okuda i T. Imaizumi, Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. *Life Sci* **62** (1998) 2425-30.

264. M. Gorenflo, C. Zheng, E. Werle, W. Fiehn i H. E. Ulmer, Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* **37** (2001) 489-92.

265. A. Pettersson, T. Hedner i I. Milsom, Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* **77** (1998) 808-13.

266. J. H. Yoo i S. C. Lee, Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* **158** (2001) 425-30.

267. P. P. Dimitrow, A. Undas, M. Bober, W. Tracz i J. S. Dubiel, Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep* **59** (2007) 715-20.

268. O. A. Ali, M. Chapman, T. H. Nguyen, Y. Y. Chirkov, T. Heresztyn, J. Mundisugih i J. D. Horowitz, Interactions between inflammatory activation and endothelial dysfunction selectively modulate valve disease progression in patients with bicuspid aortic valve. *Heart.* **100** (2014) 800-5.

269. M. Anderssohn, M. Rosenberg, E. Schwedhelm, C. Zugck, M. Lutz, N. Lüneburg, N. Frey i R. H. Böger, The L-Arginine-asymmetric dimethylarginine ratio is an independent predictor of mortality in dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* **18** (2012) 904-11.

270. O. Tutarel, A. Denecke A, et al., Asymmetrical dimethylarginine--more sensitive than NT-proBNP to diagnose heart failure in adults with congenital heart disease. *PLoS One.* **7** (2012) e33795.

271. J. Jacobi i P. S. Tsao, Asymmetrical dimethylarginine in renal disease: limits of variation or variation limits? A systematic review. *Am J Nephrol.* **28** (2008) 224-37.

272. M. Anderssohn, E. Schwedhelm, N. Lüneburg, R. S. Vasan i R. H. Böger RH, Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* **7** (2010) 105-18.

273. K. Y. Lin, A. Ito, T. Asagami, P. S. Tsao, S. Adimoolam, M. Kimoto, H. Tsuji, G. M. Reaven i J. P. Cooke, Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* **106** (2002) 987-92.

274. A. Cengel, A. Sahinarslan, G. Biberoğlu, A. Hasanoğlu, Y. Tavil, M. Tulmaç i M. Ozdemir, Asymmetrical dimethylarginine level in atrial fibrillation. *Acta Cardiol.* **63** (2008) 33-7.

275. T. F. Chao, T. M. Lu, Y. J. Lin, H. M. Tsao, S. L. Chang, L. W. Lo, Y. F. Hu, T. C. Tuan, M. H. Hsieh i S. A. Chen, Plasma asymmetric dimethylarginine and adverse events in patients with atrial fibrillation referred for coronary angiogram. *PLoS One*. **8** (2013) e71675.

276. S. J. Nicholls, Z. Wang Z, et al., Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation.* **116** (2007) 2315-24.

277. R. Schnabel, S. Blankenberg, et al., Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the Athero Gene Study. *Circ Res.* **97** (2005) e53-9.

278. R. H. Böger RH, L. M. Sullivan, et al., Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. *Circulation.* **119** (2009) 1592-600.

279. M. B. Nabity, G. E. Lees, M. M. Boggess, M. Yerramilli, E. Obare, M. Yerramilli, A. Rakitin, J. Aguiar i R. Relford, Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *J Vet Intern Med* **29** (2015) 1036-44.

280. M. Younes, C. Robert, E. Barrey i F. Cottin, Effects of age exercise duration, and test conditions on heart rate variability in young endurance horses. *Front Physiol* **7** (2016) 155.

281. J. A. Hall, M. Yerramilli, E. Obare, M. Yerramillie i D. E. Jewell, Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* **28** (2014) 1676-83.

282. T. Speer, L. Rohrer, et al., Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2. *Immunity.* **38 (4**) (2013) 754-68.

283. S. Schlesinger, S. R. Sonntag, W. Lieb i R. Maas, Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine as Risk Markers for Total Mortality and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS ONE* **11(11)** (2016) e0165811.

284. B. V. Djordjević, R. Pavlović, V. Ćosić, M. Deljanin-Ilić, T. Ristić, N. Krstić i T. Jevtović-Stoimenov. *Amino Acids* **43** (2012) 2293–2300.

285. A. Meinitzer, J. T. Kielstein, et al., Symmetrical and asymmetrical dimethylarginine as predictors for mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clin Chem.* **57(1)** (2011) 112–21.

286. D. Alexander, R. Lombardi, G. Rodriguez, M. M. Mitchell i A. J. Marian, Metabolomic distinction and insights into the pathogenesis of human primary dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Clin.* **41(5)** (2010) 527–538.

287. C. W. Cheng, M. H. Liu, H. Y. Tang, M. L. Cheng i C. H. Wang, Factors associated with elevated plasma phenylalanine in patients with heart failure. *Amino Acids* **53(2)** (2021) 149–157.

288. P. Wurtz, A. S. Havulinna, et al., Metabolite profiling and cardiovascular event risk: a prospective study of three population-based cohorts. *Circulation* **131** (2015) 774–785.

289. M. L. Cheng, C. H. Wang, et al., Metabolic disturbances identified in plasma are associated with outcomes in patients with heart failure: diagnostic and prognostic value of metabolomics. *J Am Coll Cardiol* **65** (2015) 1509–1520.

290. C. H. Wang, M. L. Cheng i M. H. Liu, Simplified plasma essential amino acid-based profiling provides metabolic information and prognostic value additive to traditional risk factors in heart failure. *Amino Acids* **50** (2018) 1739–1748.

291. R. Aquilani, M. T. La Rovere, et al., Preserved muscle protein metabolism in obese patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* **160(2)** (2012) 102–108.

292. W. G. Hunter, J. P. Kelly, et al., Metabolic dysfunction in heart failure: diagnostic, prognostic, and pathophysiologic insights from metabolomic profling. *Curr Heart Fail Rep* **13(3)** (2016) 119-131.

293. M. G. Schooneman, F. M. Vaz, et al., Acylcarnitines: refecting or inficting insulin resistance? *Diabetes* **62(1)** (2013) 1–8.

294. Y. Boirie, R. Albright, M. Bigelow i K. S. Nair, Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine defciency. *Kidney Int* **66(2)** (2004) 591–596.

295. D. E. Matthews, An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. *J Nutr* **137** (2007) 1549S-1555S.

296. D. L. Mann, Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res* **116(7)** (2015) 1254–1268.

297. B. Levine, J. Kalman, L. Mayer, H. M. Fillit i M. Packer, Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* **323(4)** (1990) 236–241.

298. T. Kubota, M. Miyagishima, et al., Expression of proinfammatory cytokines in the failing human heart: comparison of recent-onset and end-stage congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant Of Publ Int Soc Heart Transplant* **19(9)** (2000) 819–824.

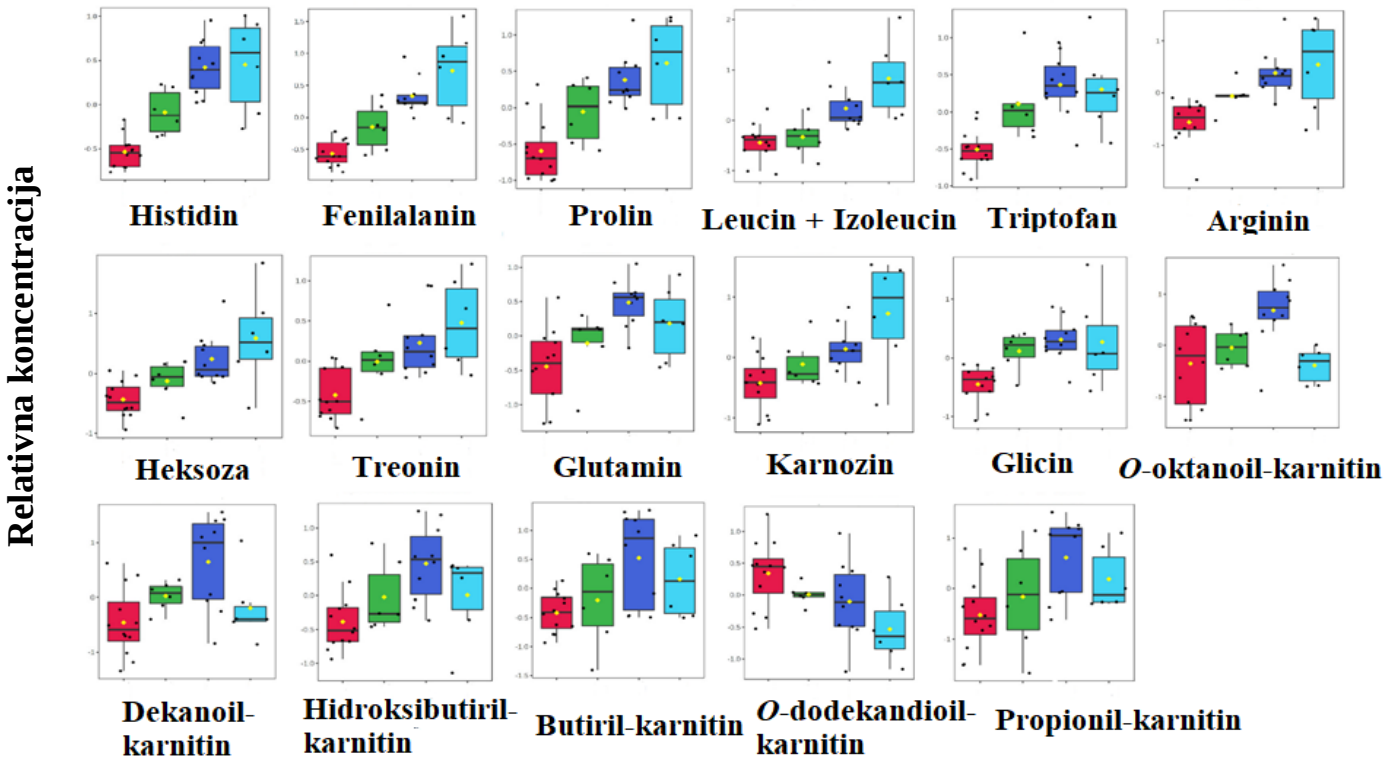
299. J. K. Bendall, G. Douglas, E. McNeill, K. M. Channon i M. J. Crabtree, Tetrahydrobiopterin in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* **20** (2014) 3040–3077.

300. Y. Nishijima, A. Sridhar, et al., Tetrahydrobiopterin depletion and NOS2 uncoupling contribute to heart failure-induced alterations in atrial electrophysiology. *Cardiovasc Res* **91** (2011) 71–79.

301. A. L. Moens, E. Takimoto, et al., Reversal of cardiac hypertrophy and fbrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efcacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation* **117(20)** (2008) 2626–2636.

302. W. S. Chen, C. H. Wang, et al., Elevated plasma phenylalanine predicts mortality in critical patients with heart failure. *ESC Heart Fail.* **7** (2020) 2884–2893.

§ 9. DODATAK



Slika I. Usporedba relativnih koncentracija značajno promijenjenih metabolita nakon logaritmiranja po bazi 10 identificiranih u urinu pasa invadiranih parazitom *B. canis* i zdravih pasa ciljanim LC-MS-metabolomskim pristupom. Skupina A (zeleni okviri) – neazotemični psi s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina (UPC <0,5), skupina B (tamnoplavi okviri) – neazotemični psi s babeziozom i UPC >0,5, skupina C (svjetloplavi okviri) – azotemični psi s babeziozom i UPC > 1 i kontrolna skupina (zdravi psi, crveni okviri). Prema ANOVA-i, svi prikazani metaboliti statistički se značajno razlikuju među skupinama. Kvadrati predstavljaju vrijednosti od nižeg prema višem kvartilu, srednja linija medijan, a vertikalna linija povezuje minimalnu i maksimalnu vrijednost.

Tablica I. Koncentracije metabolita ekstrakta seruma zdravih pasa (*n* = 12Z) identificiranih ciljanom metabolomskom analizom. Koncentracije – μmol dm^{-3}. NA – nije određeno

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
Ala	486	303	349	544	824	429	555	381	393	316	326	429
Arg	214	152	NA	244	316	234	237	210	NA	226	342	NA
Asn	50,7	44,7	63,3	64,1	66,6	65,3	23,9	58,1	74,2	49,4	66,7	95,5
Asp	8,15	NA	8,49	8,53	9,52	8,54	NA	8,46	8,22	15	29,8	11
Cit	52,3	45,9	53,9	39,7	85,8	52,7	36,2	54,2	60,4	51,1	78,1	112
Gln	803	821	1617	1296	1302	1001	1719	1337	1102	991	NA	NA
Glu	45,7	32,5	46,7	41,3	56,9	41,6	19,4	53,5	45,7	50,9	81,3	51,3
Gly	294	174	244	234	297	323	294	225	283	247	296	483
His	104	89,7	113	125	106	102	110	95,2	104	93,8	141	145
Lys	160	117	236	264	243	162	79,3	203	259	142	157	241
Met	154	61,9	75	79,6	84,5	105	NA	93,1	79,5	68,4	74,9	112
Orn	13,1	10,1	15,2	15,1	17,4	17	12,5	14,6	15,4	11,7	21,3	25,2
Phe	51,3	49,3	87,5	70,2	58,4	44,2	63,5	86,2	79,8	65,9	89,5	108
Pro	302	115	142	167	240	321	175	155	155	182	199	243

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
Ser	172	98,2	204	150	167	225	136	163	170	148	253	355
Trp	84,5	109	101	109	104	101	85,7	113	65,5	71,1	56,9	93,2
Tyr	25	25,8	24,6	24,8	24,8	24,9	25,3	28,8	25	25,1	NA	24
Val	259	174	244	225	209	276	189	277	250	210	269	304
xLeu	220	194	296	269	190	249	105	294	275	247	337	389
ADMA	1,6	1,63	2,15	2,2	2,57	1,47	1,34	2,02	2,39	2,21	4,37	5,91
Kreatinin	70	49,4	49,8	63,5	101	57,6	39,4	70,1	77,9	82,7	100	104
Kinurenin	4,76	4,91	9,85	4,02	5,47	5,42	2,41	5,44	4,71	5,67	6,32	7,08
Met-SO	14,1	5,78	6,14	6,87	6,13	25,1	4,33	7,02	4,48	5,78	3,2	6,06
Putrescin	0,46	NA	0,711	0,577	0,787	0,472	0,295	0,632	0,714	0,873	1,36	1,39
Sarkozin	13,6	3,64	2,6	5,4	7,23	16,4	2,71	5,07	5,2	9,16	7,57	5,13
SDMA	0,362	0,338	0,575	0,517	0,762	0,437	0,31	0,52	0,651	0,473	1,5	1,48
Serotonin	1,06	4,09	NA	2,48	2,11	1,33	NA	2,52	NA	3,38	4,55	NA

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
AC(0:0)	60,6	32,3	47,6	42,3	39	46,3	32,4	59	67,6	41,4	34,8	18,4
AC(2:0)	5,33	3,45	8,17	10	8,48	7,39	5,24	10	10,4	8,87	11,7	6,98
AC(5:0)	1,08	1,02	1,11	0,815	0,791	0,707	0,661	1,03	1,02	0,848	1,06	1,29
CE(16:0)	257	211	514	383	399	339	195	128	142	439	335	249
CE(16:1)	76,8	61,5	208	163	199	108	105	209	292	139	111	277
CE(18:1)	7,36	10,9	6,42	5,52	34,7	3,63	47,9	20,4	29,3	1,56	NA	24,1
CE(18:2)	9598	6576	22739	17693	17825	13502	10891	30527	30911	19382	19019	34721
CE(18:3)	198	163	647	453	421	350	187	904	800	453	534	1100
CE(20:4)	4702	2710	12292	10007	6682	5962	7695	22280	19832	10021	6024	19334
CE(20:5)	309	196	860	618	4862	572	234	1225	1021	660	551	586
CE(22:5)	76	57,6	157	93,7	106	100	88,7	169	162	106	85,2	187
CE(22:6)	391	262	902	688	1329	479	407	1522	1229	527	280	691
DG(34:1)	2,29	1,83	2,48	NA	3,11	4,68	1,64	3,25	1,76	2,38	6,34	2,04
DG(36:2)	2,47	2,06	3,93	2,85	3,69	4,57	2,45	4,74	3,94	4,66	7,66	4,38

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
DG(36:3)	4,45	3,73	6,71	5,58	5,51	8,29	5,66	10	8,8	8,59	5,29	6,85
DG(36:4)	NA	4,58	9	5,69	NA	8,72	6,58	10,9	10,2	9,46	4,52	11,8
DG(39:0)	6,05	5,42	12,5	7,31	67,3	8,65	2,29	14	11,7	8,39	6,16	6,3
DG(41:1)	11,1	9,09	21,6	14,3	30,1	10,8	7,61	29,9	24,8	11,5	5,09	13,1
DG-O(32:2)	0,283	0,319	0,406	0,262	0,335	0,618	0,28	0,42	0,395	0,422	0,455	0,423
DG-O(34:1)	3,88	1,75	3,96	2,82	4,11	6,63	2,05	5,13	4,51	4,79	6,19	4,63
DG-O(36:4)	1,02	0,816	1,46	1,23	1,33	1,3	0,836	1,48	1,58	1,48	1,59	1,88
TG(44:1)	0,926	1,18	1,59	0,727	1,49	0,982	1,23	1,97	1,72	1,33	1,56	1,65
TG(48:1)	9,56	3,6	9,17	NA	11,6	20,1	6,13	12,1	NA	8,5	22,3	10,9
TG(48:2)	2,84	1,21	5,27	2,2	5,3	12,1	3,93	6,4	4,28	6,15	19	5,75
TG(48:3)	2,73	NA	4,01	2,7	2,33	3,18	3,17	6	5,35	3,3	4,04	6,9
TG(50:1)	34,1	6,83	19,4	4,98	23,1	69,5	8,47	23,4	18,5	20,4	46,1	19,8
TG(50:2)	22,9	NA	42,8	11,4	39,1	98,9	24,2	56,2	35,8	42,4	72,4	39,8

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
TG(50:3)	14	7,5	34,3	14,4	25,7	59,2	24,1	43,5	33,4	33,2	50,5	35,1
TG(50:4)	NA	NA	1789	1159	1308	2243	1533	1711	1642	1730	1715	1518
TG(51:2)	3,55	3,51	6,72	4,48	13,2	13,9	3,57	9,64	7,09	7,61	13,8	9,75
TG(51:3)	3,37	2,59	5,23	3,92	7,57	9,49	3,81	11,1	7,56	6,62	9,03	9,04
TG(51:4)	2,52	NA	4,74	NA	7,83	5,46	2,6	5,87	5,91	4,64	4,48	5,79
TG(52:2)	103	31	135	61,4	166	283	77,1	207	171	167	174	149
TG(52:3)	149	57,3	249	124	213	396	212	375	326	320	189	256
TG(52:4)	83,3	40,7	151	89,9	99,3	234	103	228	198	198	95,6	162
TG(52:5)	26,8	NA	114	62,2	38,8	144	82,8	164	138	130	53,8	145
TG(52:6)	6,76	5,39	18,4	15,9	28,2	20	13	23,6	25,1	20,5	12	24,5
TG(52:7)	1,94	2,73	3,82	3,75	7,28	4,13	4,11	3,96	4,85	4,22	3,14	6,59
TG(53:3)	10,2	NA	15,7	16,7	28,5	25,4	9,61	36	30,9	26	20,3	35,8

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
TG(53:4)	5,68	10,2	8,32	11,9	13,2	13,1	6,5	15,1	11,7	11,5	7,42	14,7
TG(53:5)	3,15	1,83	4,33	3,35	6,04	4,99	NA	4,85	NA	4,56	3,05	4,94
TG(54:2)	0,294	0,131	0,457	0,23	0,61	1,41	0,178	0,503	0,601	0,606	0,979	0,509
TG(54:3)	60,5	24,9	85,9	56,8	83,8	238	41,2	113	116	114	103	91,7
TG(54:4)	90,7	39,1	119	96,3	94,5	335	72,3	192	197	171	99,8	143
TG(54:5)	82,5	43,6	129	112	97,4	284	87,9	217	218	174	81,7	177
TG(54:6)	65,9	38,1	121	114	171	189	89,9	190	205	169	64,9	160
TG(54:7)	21,8	13,5	43,8	49,1	96,1	58,4	30,1	63	66	62,4	18,2	51,3
TG(55:6)	9,08	NA	15,5	14,4	34	14,4	NA	21,6	24,4	19,2	12,2	27,2
TG(56:6)	19,7	13,1	24,3	29,4	36,4	44,2	15	34,3	43,6	34,6	17,2	35,8
TG(56:7)	27,6	14,4	42,8	54	97,3	71,7	25,9	62,3	84,4	59,5	17,3	59,3
TG(56:8)	36,4	20,9	53,3	79,9	136	100	30,8	74,5	101	81,3	19,3	76,6

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
TG(56:9)	3,83	3,78	6,01	10,6	9,18	7,51	2,66	9,11	10,3	7,86	1,54	8,77
LPC(16:0)	120	96,4	117	88,9	96,6	97,4	97,2	133	128	86,5	85,6	133
LPC(16:1)	2,7	3,01	3,57	3,32	2,48	3,16	3,18	3,93	3,74	2,08	3,08	3,33
LPC(17:0)	1,93	2,23	2,29	2,11	1,56	1,76	1,84	3,38	2,69	1,68	3,18	4,51
LPC(18:0)	109	94,8	144	111	102	92,9	118	182	165	109	101	148
LPC(18:1)	20,3	18,3	22,3	19,9	18,8	21	18,5	25,8	25,6	17,1	22	28,7
LPC(18:2)	19,6	13,7	15,8	13,4	12,9	23	11,3	15,7	15,4	15	16,7	17,6
LPC(20:3)	0,539	0,268	3,17	1,42	2,27	0,996	0,889	7,54	2,5	1,31	3,02	2,18
LPC(20:4)	12,9	10,2	17,9	14,7	11,1	15,2	17,4	23,4	22,4	14,5	15,4	25,9
LPC(22:5)	0,233	0,301	0,56	0,366	0,341	0,429	0,551	0,565	0,567	0,258	0,322	0,736
LPC(22:6)	1,21	0,949	2,24	1,31	2,51	1,36	1,21	2,27	1,85	1,24	1,19	1,64
LPC-O(18:0)	0,767	0,672	1,02	0,678	NA	NA	0,668	0,899	0,817	0,782	0,723	1,14
LPC-O(18:1)	1,36	1,39	2,44	1,01	0,932	1,31	1,64	1,81	2,58	1,37	1,14	2,52

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
PC(30:0)	0,84	0,737	2,02	1,38	2,8	1,36	1,76	1,5	1,82	1,51	3,04	3,66
PC(30:3)	19,4	13,6	1,42	11,7	1,25	19,2	1,14	NA	NA	2,14	2,51	NA
PC(32:0)	15,4	10,6	24,7	18,9	26,5	18,1	19,7	20,2	26,4	22,4	24,8	41,1
PC(32:1)	5,1	4,12	12,7	9,27	13,8	8,84	8,51	9,29	10,8	8,53	14,8	14,9
PC(32:2)	2,36	1,8	5,58	4,52	5,26	4,12	4,55	6,17	6,08	3,96	5,38	7,69
PC(32:3)	NA	NA	0,129	0,1	0,151	NA	NA	0,14	0,151	0,132	0,172	0,237
PC(32:5)	0,166	NA	0,242	0,219	0,287	0,149	0,211	0,31	0,374	0,223	0,269	0,425
PC(33:0)	0,385	0,385	0,502	0,507	3,31	0,41	0,354	0,72	0,604	0,628	0,931	1,28
PC(33:1)	0,927	0,811	1,65	1,39	2,89	1,42	1,24	2,2	2,04	1,39	3,35	4,89
PC(33:2)	0,988	0,77	1,5	1,25	1,63	1,81	0,884	1,92	1,73	1,37	1,74	3,14
PC(33:3)	NA	NA	0,27	0,237	0,256	NA	0,213	0,516	0,396	0,261	0,353	0,534
PC(33:4)	0,508	0,352	0,593	0,597	0,901	0,58	0,562	0,738	0,916	0,754	0,644	0,834
PC(34:3)	29,7	24,3	57,6	51,2	41,4	56,2	35,8	53,5	60,7	44,5	48,4	70

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
PC(34:4)	3,37	2,3	8,19	7,04	8,25	6,41	7,63	8,45	8,68	6,3	8,99	13
PC(34:5)	0,965	0,732	2,82	2,48	2,57	2,47	3,12	2,64	3,28	2,13	2,78	4,5
PC(35:0)	0,076	0,085	0,105	0,118	0,438	0,092	0,067	0,124	0,12	0,079	0,108	0,227
PC(35:1)	2,93	3,04	5,52	5,44	6,42	4,25	3,45	6,95	6,76	4,73	10,4	14,4
PC(35:2)	13,2	12,6	19,8	20,9	21,2	19,4	12,4	26	22,5	20,1	38,6	46
PC(35:3)	1,29	1,12	2,01	2,41	6,47	2,45	1,38	2,9	2,68	2,17	3,93	4,07
PC(35:4)	0,169	NA	NA	0,604	0,786	0,604	0,458	0,815	0,833	NA	0,847	1,46
PC(35:5)	0,544	0,412	1,2	0,88	0,97	0,884	0,847	1,18	1,3	0,994	1,06	1,9
PC(36:1)	0,319	0,256	0,725	0,644	0,808	0,422	0,472	0,829	0,872	0,648	0,805	1,04
PC(36:3)	257	206	384	373	269	382	253	429	426	360	413	547
PC(36:5)	28,8	16,5	47,2	40,7	61,8	43,3	35,7	56,3	61,7	52,9	45,9	NA
PC(36:6)	0,486	0,349	1,19	1,15	1,04	1,15	0,918	1,3	1,4	0,976	1,01	1,39
PC(37:1)	0,722	0,616	1	0,945	1,87	1,15	0,865	0,789	1,01	1,1	1,23	1,59

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
PC(37:2)	3,81	3,56	5,75	5,76	5,17	4,94	3,23	6,07	5,99	5,33	8,1	10,8
PC(37:3)	3,01	2,93	4,94	5,43	7,27	4,01	3,81	9,21	8,35	4,97	7,87	13,2
PC(37:4)	7,53	6,55	15,6	15,1	11,7	10,4	12,1	25,2	21,2	14,3	20,3	39,8
PC(37:5)	2,89	1,86	5,09	5,32	7,06	5,25	3,86	7,63	7,4	6,07	8,87	11,5
PC(37:6)	1,45	0,71	2,55	2,44	3,94	2,9	2,16	3,71	3,57	2,52	2,68	4,31
PC(37:7)	NA	NA	NA	0,752	0,945	0,621	1	1,47	0,8	0,704	0,727	1,93
PC(38:0)	12,2	10,8	14,9	18,3	17,6	13,2	NA	14,9	15,7	16,4	16,2	19,9
PC(38:1)	3,27	2,93	4,23	4,61	7,03	3,44	2,27	4,02	4,35	4,22	3,5	5,08
PC(38:3)	0,125	0,202	0,435	0,136	2,24	0,228	0,206	0,183	0,118	0,265	0,424	NA
PC(38:6)	78	56	169	136	175	118	107	202	186	127	127	201
PC(38:7)	117	70,6	257	216	144	174	229	370	361	251	191	424
PC(39:3)	0,973	0,651	1,8	1,67	1,21	1,14	1,14	2,88	2,77	1,29	1,65	4,44
PC(39:4)	2,6	2,3	4,76	5,22	3,89	3,12	3,45	7,16	6,12	3,5	4,46	11,4

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
PC(39:5)	1,17	0,988	2,75	2,5	3,89	1,62	1,82	3,93	3,42	2,17	2,52	4,51
PC(39:6)	5,9	3,65	13,9	14	15,9	10	11,8	25,2	21,8	14	13,9	25
PC(39:7)	1	0,686	2,57	2,46	2,2	1,68	2,57	4,95	4,25	2,31	2,39	6,26
PC(40:1)	NA	NA	0,688	0,72	1,46	0,775	NA	0,872	0,704	0,706	0,811	NA
PC(40:2)	NA	NA	1,17	0,838	1,35	0,846	0,805	1,02	1,13	1,23	0,691	1,45
PC(40:4)	12,4	9,04	26,3	20,6	NA	15,5	26,5	47,6	35,7	17,3	22,8	88
PC(40:5)	58,7	39,8	120	93,6	123	71,9	105	178	135	82,1	77	169
PC(40:6)	140	99	335	261	NA	170	214	NA	329	233	170	165
PC(40:8)	4,87	3,47	12,7	11,6	24,2	9,03	11	20,1	17,5	10,2	10,5	20,5
PC(40:9)	10,9	6,93	32,3	22,9	42,8	18,2	21,6	44,1	38,7	20,2	16,6	31,8
PC(41:3)	0,561	0,465	1,12	0,609	1,07	0,741	1,07	1,93	2,23	1,12	1,14	NA
PC(41:4)	0,792	0,675	4,28	2,26	NA	1,77	2,28	3,59	1,91	2,27	1,82	7,04
PC(41:5)	0,983	0,771	2,03	2,24	3,15	1,15	1,41	2,24	2,21	1,22	1,07	2,62

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
PC(41:8)	0,921	0,529	2,9	2,57	4,75	1,26	1,88	4,96	3,62	2	1,51	3,67
PC(42:2)	0,976	NA	0,511	0,467	0,844	NA	NA	0,875	NA	0,522	1,77	0,445
PC(42:3)	32,1	27,5	42,1	48,1	45,5	39	47,8	52	52,6	49,6	46,4	53,3
PC(42:4)	0,726	0,638	1,45	1,28	1,15	0,921	0,975	1,28	1,48	1,22	1,1	1,77
PC(42:5)	0,089	0,067	0,13	0,123	0,254	0,105	0,105	0,188	0,204	0,133	0,115	0,223
PC(42:7)	0,386	0,265	1,52	0,882	0,139	0,672	1,48	3,02	1,95	1,04	1,17	5,27
PC(42:10)	5,23	4,26	14,7	13,5	17,4	9,35	10,6	27,3	18,5	9,07	8,55	15,6
PC(44:5)	1,08	0,691	3,16	2,36	3,87	1,87	1,26	3,83	3,7	3,23	2,29	4,3
PC(44:7)	0,32	NA	0,901	0,672	0,467	0,254	NA	0,625	0,029	0,562	NA	1,07
PC(44:10)	0,582	0,33	0,811	0,8	0,939	0,648	0,877	1,82	1,26	0,86	0,653	1,52
PC(44:12)	0,401	0,356	0,936	0,709	0,816	0,603	0,743	1,39	0,983	0,701	0,8	1,31
PC-O(32:0)	4,47	3,21	7,8	3,85	4,67	5,03	4,34	4	6,44	6,28	6,33	10,1
PC-O(32:1)	1,31	0,342	2,48	1,33	2,01	0,857	0,71	0,9	0,916	1,78	1,1	1,66

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
PC-O(34:0)	0,442	0,431	0,955	0,447	0,563	0,487	0,674	0,791	1,22	0,989	0,935	0,977
PC-O(34:1)	14,7	11,5	30,6	20,2	23	18,4	18,7	21,3	34,8	25,1	22,4	41,9
PC-O(34:2)	16,6	13,1	31	21,6	21,1	18,8	18,4	22,5	28,6	25,8	22,3	39,7
PC-O(34:3)	11,5	9,63	25,1	16,8	15,8	12,4	15,2	18,9	22	21,5	16,9	37,6
PC-O(34:4)	1,77	1,29	5,07	2,95	4,84	2,1	2,57	2,72	4	3,46	3,21	5
PC-O(35:3)	0,888	0,928	2,53	1,77	1,69	NA	0,018	2,81	2,4	1,78	1,65	3,79
PC-O(36:1)	1,51	1,04	2,5	1,79	2,96	1,52	1,53	1,96	2,97	2,31	1,9	5,98
PC-O(36:2)	7,95	6,28	14,5	10,8	12,1	9,85	8,2	12,2	15,7	13,1	10,9	24,6
PC-O(36:3)	15,5	12,6	30,8	19,6	16,6	20,3	16,7	26,1	28,9	27,5	20,9	41,9
PC-O(36:4)	67,2	55,2	148	84	53	86,1	77,9	114	120	116	71,3	159
PC-O(36:5)	33	27,5	71,4	41,1	37,9	38,1	37,2	53,6	55,7	50,1	35,3	63,3
PC-O(36:6)	1,05	0,727	2,51	1,74	3,05	1,26	1,54	2,22	2,29	2,28	1,64	3,75
PC-O(37:6)	0,319	0,222	0,839	0,648	1,04	0,449	0,546	1,22	1,16	0,614	0,589	1,45

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
PC-O(38:4)	32,1	28,5	66,8	42,4	26	42,5	39,3	57	58	55,6	36,8	92,9
PC-O(38:5)	78,6	67,9	176	111	77,5	103	96,2	137	166	130	96,5	217
PC-O(38:6)	18,9	15,4	48,3	27,3	41,2	24,7	21,2	34,2	39,8	32,3	21,2	43,2
PC-O(40:4)	3,78	3,21	8,54	4,51	1,9	4,25	3,99	6,28	7,03	6,12	3,49	14,7
PC-O(40:5)	11,3	9,55	25,7	16,2	11,7	14,8	14,7	20,4	23	18,2	15,2	39,5
PC-O(40:6)	14,2	11	35,3	19,6	26,3	17,6	15	23,4	28	20,8	12,9	31,1
PC-O(40:7)	3,21	2,32	8,4	5,15	5,57	4,74	5,01	7,01	7,59	6,55	4,18	10,8
PC-O(40:8)	0,685	0,47	1,97	1,25	0,844	1,1	1,3	1,72	2,1	1,65	1,22	2,95
PC-O(42:5)	1,6	1,38	3,33	2,02	1,2	1,66	1,52	2,09	3,09	2,25	1,54	5,5
PC-O(42:6)	2,03	1,41	5,36	2,13	1,91	1,61	1,43	2,14	3,34	2,29	1,02	3,73
SM(32:1)	2,13	1,99	3,74	2,73	4,46	2,69	3,74	5,63	5,84	2,76	7,27	6,61
SM(33:1)	10,3	8,9	24	20,4	24,1	14,4	18,9	50	44,3	22,4	30,4	52,4
SM(33:2)	12,5	NA	19,2	27,2	23,9	86,7	44,7	13,4	32,5	NA	20,8	69,5

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
SM(34:1)	185	148	296	208	240	202	196	359	370	226	254	427
SM(34:2)	17,4	11,8	23,3	16,8	25,6	17,5	17,3	27,7	32,3	20,5	20,6	34,6
SM(35:1)	4,65	4,06	6	5,82	6,8	5,07	5,05	11,3	9,35	5,89	9,9	15,3
SM(36:1)	33,5	27,8	57,2	46,8	60,5	36,9	43,6	72,9	69,5	50,1	50,3	90,7
SM(36:2)	11,9	8,77	12	12	17,7	10,8	9,7	14,7	13,6	13,4	12	17,4
SM(37:1)	3,84	3,47	5,5	5,6	5,31	4,28	4,82	11,2	8,58	4,37	7,64	13,6
SM(38:1)	14	10,1	21,3	21,4	22,7	8,29	21,2	33,5	32,9	23,1	24,2	46,4
SM(38:2)	10,1	6,74	12,8	12,4	15,6	10,5	11,7	14	16,1	9,91	10,6	20,3
SM(39:1)	3,82	2,63	5,01	4,52	2,41	3,74	4,94	9,67	7,25	3,64	7,77	10,8
SM(39:2)	0,598	0,535	NA	1,05	0,517	0,933	1,12	0,653	1,47	1,36	NA	1,28
SM(40:1)	0,056	0,037	0,091	0,064	0,023	0,06	0,069	0,114	0,105	0,075	0,064	0,143
SM(40:2)	16,1	11,2	21,9	18	24,2	16,4	21	26,9	28,7	20,7	20,8	33,7
SM(40:4)	2,29	1,82	7,25	4,85	NA	NA	6,22	9,52	8,17	2,52	5,81	11,6

Tablica I. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
SM(41:1)	15,2	11,9	27,6	19,6	14,8	19,1	20,9	37,8	35,2	21,3	26,2	50,5
SM(41:2)	12,6	8,74	16,6	14,8	18,4	14,1	16,3	22,3	23,6	16,2	18,9	29,1
SM(42:1)	22,6	14,5	38,8	27,7	2,03	22,7	28,9	44,5	48,2	28	28,8	56,3
SM(42:2)	88,9	61,1	137	115	180	102	101	136	181	118	88,3	153
SM(42:3)	12,6	8,26	15,9	14,2	24,5	13,3	12,5	11,1	21,6	15	10,3	18,1
SM(43:1)	1,01	0,751	2,49	1,5	2,19	2,38	1,39	3,34	2,62	1,66	2,26	3,94
SM(43:2)	2,08	1,38	4,47	2,73	3,7	4,44	2,46	3,87	5,27	3,17	3,35	5,78
SM(44:1)	0,703	0,662	1,5	0,829	1,57	1,42	NA	1,46	1,21	1,33	1,6	1,98
SM(44:2)	NA	NA	1,46	1,23	2,66	1,43	0,84	1,53	1,69	1,73	1,65	2,72
H1	6031	5799	7387	6214	6707	6081	6782	7385	7346	7125	6569	9976

Tablica II. Koncentracije metabolita ekstrakta seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* (*n* = 12B) identificiranih ciljanom metabolomskom analizom. Koncentracije – μmol dm^{-3}. NA – nije određeno

Uzorci / **Metaboliti**	**1B**	**2B**	**3B**	**4B**	**5B**	**6B**	**7B**	**8B**	**9B**	**10B**	**11B**	**12B**
Ala	241	471	522	959	310	278	436	606	252	193	206	955
Arg	209	57,4	55,4	NA	369	194	239	283	NA	153	179	NA
Asn	90	64,8	68,2	137	85	52,8	51,8	57,5	105	59,5	44,2	102
Asp	33,3	19,5	48,8	30,3	16,6	14,4	11,6	13,9	26,6	10,9	8,19	28
Cit	39,1	41	19,6	46,2	15,8	28	28,7	27,9	52,8	20,7	36,7	35,2
Gln	1038	1246	574	1177	629	709	788	651	1453	1263	862	1458
Glu	94,1	99,3	NA	103	58,7	45,4	42,8	53,2	71,7	40,1	41,3	126
Gly	255	256	209	357	183	218	154	216	244	178	192	289
His	147	147	103	192	126	84	107	95	151	101	82,1	231
Lys	185	232	291	587	236	114	160	202	171	137	127	274
Met	57	65,1	54,7	95,9	65,1	43,4	NA	60	NA	34	33,4	79,9
Orn	75,8	262	271	17	16,8	16,5	15,2	13,2	13,1	12,2	24,4	31,3

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
Phe	140	241	173	169	153	107	160	161	205	79	91,9	298
Pro	137	106	106	249	115	123	76,2	127	130	117	85,8	173
Ser	179	155	134	260	116	74,9	112	158	192	158	113	198
Trp	130	333	127	157	126	40,8	93,8	47,2	154	63	49,8	194
Tyr	23,7	NA	23	23	NA	26	24,9	28,8	24,8	26	26,2	22,2
Val	349	310	308	402	339	203	308	205	406	241	160	514
xLeu	297	308	282	391	375	167	275	189	320	210	136	488
ADMA	2,45	2,26	2,68	3,34	2,82	1,75	1,7	1,88	3,2	2,31	2,04	3,3
Kreatinin	42,5	74	74,9	122	51,7	87	77,5	50,8	28,7	61,9	65,6	124
Kinurenin	17,8	17,4	30,1	22,7	11,2	18	18,3	10,9	30,2	9,19	8,17	42,8
Met-SO	3,08	1,64	1,49	4,35	3,25	2,87	1,15	1,56	1,92	3,59	1,45	5,16
Putrescin	NA	2,1	4,2	2,28	0,908	1,16	1,86	1,5	1,53	1,27	1,27	2,13
Sarkozin	5,84	3,64	1,88	17,9	7,17	4,1	1,85	12,6	3,3	3,24	3,75	3,43

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
SDMA	0,519	0,59	0,555	0,568	0,608	0,346	0,331	0,329	0,536	0,536	0,38	1,02
Serotonin	0,135	0,395	0,838	NA	NA	0,166	0,257	0,46	0,173	0,155	0,322	0,462
AC(0:0)	14,9	14,2	41,2	57,8	80,7	18,8	14,1	36,2	18	20	13,1	39,9
AC(2:0)	2,2	NA	8,1	7,2	12	3,62	1,58	10,6	7,93	7,39	1,25	7,66
AC(5:0)	0,831	0,645	0,948	0,941	0,667	0,593	0,563	0,828	1,06	0,62	0,663	0,95
CE(16:0)	429	594	54,4	452	212	367	71,7	227	335	229	354	493
CE(16:1)	150	222	147	223	160	166	116	64,9	421	59,2	95,7	229
CE(18:1)	38	0,934	84,9	59,8	72,1	33,5	NA	4,66	113	29,7	0,836	22,2
CE(18:2)	17012	27324	9442	18740	7018	14135	13369	9771	30541	9151	18818	21185
CE(18:3)	554	624	317	736	398	389	366	196	1222	178	326	545
CE(20:4)	11764	15827	12024	14894	6977	8349	5751	6316	20659	5431	9557	7490
CE(20:5)	742	325	217	415	177	425	285	145	823	163	197	1166
CE(22:5)	115	97,5	103	133	103	102	57,3	78,1	234	64,6	83	158

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
CE(22:6)	739	248	253	271	222	333	369	212	1209	337	221	901
DG(34:1)	6,33	4,53	4,48	3,95	3,94	4,21	NA	5,26	13,2	5,86	3,46	10,1
DG(36:2)	8,71	8,02	7,87	8,33	6,53	8,54	4,35	6,88	27,6	5,96	5,1	18,1
DG(36:3)	16	15,2	10,9	13,5	10,1	13,3	9,33	13,2	58,6	10,6	5,05	42,1
DG(36:4)	21,1	15,7	9,74	11,3	9,03	9,74	9,08	11,8	53,6	9,75	NA	41
DG(39:0)	11	3,6	2,45	5	2,01	7,37	3,58	2	12,8	1,77	1,7	14,8
DG(41:1)	16,8	2,88	5,1	4,11	3,28	9,34	7,79	4,82	32,3	6,84	2,8	18,7
DG-O(32:2)	0,48	0,556	0,331	0,43	0,404	0,487	0,387	0,406	2,3	0,28	0,255	1,5
DG-O(34:1)	5,68	7,05	4,17	5,96	4,11	5,76	4,5	4,35	19,6	3,27	4,03	11,8
DG-O(36:4)	1,12	2,27	0,838	1,27	0,68	1,08	1,32	1,13	2,39	0,996	1,31	2,03
TG(44:1)	1,18	1,7	NA	1,57	0,858	1,21	0,895	0,952	3,41	0,915	1,16	1,86
TG(48:1)	18	24,1	10,4	13,3	9,47	15,1	8,53	6,1	59,9	10,2	13	25,8
TG(48:2)	11,9	18,4	3,16	4,33	6,54	5,53	4,75	2,53	48,7	6,96	9,74	27,1

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
TG(48:3)	3,95	4,36	6,53	4,47	2,05	1,18	2,42	2,01	10,2	2,23	4,38	6,12
TG(50:1)	56,9	43,3	34,2	38,8	28,6	20,5	21,6	24,3	187	29,6	30,5	71,5
TG(50:2)	79,6	80,6	45,7	60,6	55,8	43,6	40,4	17,8	315	55,6	48,6	145
TG(50:3)	57,5	69,3	24,8	32,8	40,7	30,5	33,6	21,7	257	30,6	30,9	144
TG(50:4)	2289	2675	1170	1628	1847	1720	1652	1047	6456	1463	1640	4286
TG(51:2)	16,8	13,9	10,3	13,4	9,26	12,1	5,56	4,55	48,8	8,26	9,2	23,5
TG(51:3)	12	13,7	7,02	9,84	8	9,37	5,56	5,03	45,8	6,56	5,29	21,6
TG(51:4)	4,88	7,36	4,89	5,41	3,74	4,46	4,21	NA	26	3,8	3,5	12,1
TG(52:2)	375	316	225	398	293	191	169	204	NA	213	157	619
TG(52:3)	629	528	294	514	404	281	325	326	NA	330	209	1199
TG(52:4)	311	283	113	203	186	133	185	158	1195	166	111	738
TG(52:5)	169	163	57,5	89,5	97,4	70,6	64,5	43,6	748	59,4	44,1	405
TG(52:6)	18,4	22,4	7,09	10,2	11,1	10,3	10,6	5,64	59,4	9,4	12,3	48,8

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
TG(52:7)	4,75	3,79	1,81	3,2	2,73	3,01	3,71	1,52	9,58	3,16	3,63	8,25
TG(53:3)	37,9	39	21,7	34,5	22,8	34,9	12,2	12,4	111	18,2	16,8	68,6
TG(53:4)	17,7	17,5	8,75	14,6	10,3	15,8	7,4	7,09	47,5	8,45	7,74	34
TG(53:5)	4,28	5,24	3,64	3,86	2,89	4,48	1,9	2,3	13,9	2,6	2,86	8,08
TG(54:2)	0,888	0,998	0,576	0,857	0,962	0,793	0,479	0,57	2,8	0,59	0,64	2,27
TG(54:3)	169	174	87	171	192	145	86,8	103	550	106	98,1	472
TG(54:4)	244	234	115	236	236	192	126	139	884	147	111	730
TG(54:5)	236	231	135	214	192	149	106	110	896	141	98,8	573
TG(54:6)	195	172	111	130	114	91,1	72,6	62,8	655	105	75,1	350
TG(54:7)	47,9	35,5	17,3	25,7	20,4	23,1	15,7	11,6	145	23,4	17,9	121
TG(55:6)	16,4	19,6	9,88	16,9	9,54	15,4	6,84	NA	50,9	10,4	8,99	26,1
TG(56:6)	42,1	33,7	22,1	39	43,2	40,3	12,5	22,1	84,3	35,5	19,7	66,7
TG(56:7)	60	46,7	29,7	40,2	37,7	39,5	18,5	21,7	174	39,1	26,1	120

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
TG(56:8)	74	49,7	29,1	36,3	32,7	32,3	20,5	20,1	194	45,9	29,1	165
TG(56:9)	5,3	3,11	1,76	2,43	1,99	2,17	1,44	1,25	9,37	2,71	2,23	12
LPC(16:0)	204	126	39,9	162	84,9	54,4	41,2	80,8	112	113	59,9	146
LPC(16:1)	4,06	5,78	NA	4,38	2,97	1,89	1,57	1,82	2,5	1,9	1,57	6,36
LPC(17:0)	3,82	3,04	1,11	3,14	1,41	1,83	0,865	0,987	1,85	1,86	1,45	2,52
LPC(18:0)	196	146	43,1	143	83,9	66,6	52,4	119	148	103	68,6	148
LPC(18:1)	24,7	24,9	5,38	22,8	15,9	11,6	7,07	11,9	15,9	13,3	12,1	29
LPC(18:2)	6,7	17,2	0,869	8,99	4,06	3,88	3,55	7,83	3,23	5,12	8,27	11,7
LPC(20:3)	1,14	1,44	0,496	1,26	2,59	0,677	1,15	0,738	6,76	0,814	2,55	4,15
LPC(20:4)	14,2	21,8	3,03	16,7	10,2	6,16	4,52	9,34	11,2	8,35	8,73	10,1
LPC(22:5)	0,258	0,28	NA	0,274	NA	0,122	NA	0,15	0,222	NA	0,112	0,268
LPC(22:6)	0,868	0,976	0,172	0,766	0,487	0,434	0,328	0,626	0,847	0,603	0,353	1,22
LPC-O(18:0)	1,01	0,786	0,684	1,01	0,745	NA	NA	0,895	0,711	0,701	NA	0,799

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
LPC-O(18:1)	3,02	1,22	0,877	3,6	3,14	1,06	NA	1,05	1,85	1,38	NA	2,82
PC(30:0)	2,29	6,16	3,67	2,99	1,87	2,89	2,38	1,7	7,21	1,13	2,82	3,68
PC(30:3)	1,68	NA	2,22	NA	23	0,75	22,1	9,87	NA	24,8	1,81	7,65
PC(32:0)	33,9	33,5	44,5	49,8	26,6	26,1	24,5	22,2	95,6	24,2	26	58,4
PC(32:1)	9,41	26,7	19,4	17,2	10,8	14,2	14,1	8,42	34,4	6,57	11,2	21,5
PC(32:2)	4,24	15,3	4,04	5,21	2,29	5,25	4,68	2,54	8,06	2,31	5,19	7,74
PC(32:3)	0,113	0,373	0,217	0,177	NA	0,154	0,131	NA	0,399	NA	0,165	0,236
PC(32:5)	0,238	0,439	0,534	0,314	0,189	0,277	0,261	0,187	0,121	0,24	0,305	0,478
PC(33:0)	1,34	0,962	1,35	0,681	0,406	0,775	0,539	0,204	1,34	0,347	0,703	0,977
PC(33:1)	2,46	5,23	4,45	3,44	1,8	3,3	1,97	1,07	4,95	1,16	3,15	2,8
PC(33:2)	1,43	3,45	1,85	1,9	0,729	1,69	1,52	0,634	2,63	0,867	2,19	2,39
PC(33:3)	0,327	0,447	0,35	0,325	0,2	0,242	0,177	NA	0,69	NA	0,263	0,359
PC(33:4)	0,474	1,11	0,633	0,577	0,473	0,675	0,571	0,577	1,34	0,559	0,689	1,09

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
PC(34:3)	43,7	112	54,5	62,9	31,8	51,8	61	33,8	116	27,9	46,8	119
PC(34:4)	6,35	19,5	10,7	10,5	5,52	8,48	8,47	5,02	18,9	4,08	7,63	13,9
PC(34:5)	2,39	9,57	2,62	3,1	1,58	2,9	2,96	1,38	4,06	1,68	3,3	5,69
PC(35:0)	0,174	0,216	0,152	0,133	0,053	0,19	0,102	0,048	0,216	0,072	0,148	0,114
PC(35:1)	6,8	11,6	10,8	7,54	4,03	9,82	5,59	2,99	12,8	4,25	7,17	8,82
PC(35:2)	17,7	36,7	20,4	20,1	8,75	25,3	17,4	8,69	27,4	12	24,7	28,1
PC(35:3)	2,67	4,63	2,68	2,79	1,03	3,19	2,3	0,877	4,5	1,39	2,79	4,6
PC(35:4)	0,767	1,58	1,14	0,927	NA	0,801	0,551	0,287	1,39	0,601	0,852	0,98
PC(35:5)	0,95	1,94	0,946	1,1	0,538	1,03	0,922	0,543	1,5	0,653	1,32	1,42
PC(36:1)	0,646	1,14	0,668	0,761	0,465	0,673	0,741	0,58	NA	0,492	0,657	1,16
PC(36:3)	314	503	266	409	237	349	299	208	NA	217	345	586
PC(36:5)	43,1	NA	40,5	48,8	19,1	35,7	40,9	25	NA	35,1	48,7	NA
PC(36:6)	0,706	2,49	0,933	1,03	0,501	1,01	1,31	0,524	1,84	0,507	0,899	2,7

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
PC(37:1)	1,66	1,46	0,929	1,43	0,624	1,47	0,839	0,585	2,75	0,699	1,3	1,64
PC(37:2)	4,03	5,94	2,27	3,83	1,92	5,12	4,05	1,73	6,16	2,76	4,89	8,69
PC(37:3)	5,89	11	NA	7,02	3,14	6,52	4,99	2,22	11,6	3,46	5,67	7,14
PC(37:4)	15,9	29,8	24,3	19,9	9,68	17,5	13	8,09	32,5	9,66	18,6	17,1
PC(37:5)	4,48	10,6	4,77	5,51	2,42	5,76	5,07	2,51	8,75	3,64	7,11	9,47
PC(37:6)	2,5	5,05	2,25	2,79	0,979	2,22	1,94	1	4,68	1,63	2,89	3,83
PC(37:7)	0,71	1,5	0,975	0,995	NA	0,913	0,692	0,633	2,54	NA	0,918	1,31
PC(38:0)	14,9	17,9	11	15,3	13,5	13,4	14,1	14,8	14	14,9	14,4	20,7
PC(38:1)	4,74	4,3	2,78	4,12	3,09	4,54	3,84	3,57	6,39	3,43	3,33	6,27
PC(38:3)	0,39	0,558	0,207	0,559	2,32	0,348	0,444	0,794	0,764	0,361	0,251	0,662
PC(38:6)	129	146	80,3	103	54,8	99,4	98,7	59,1	286	76	103	223
PC(38:7)	238	374	248	304	141	167	163	135	NA	162	228	248
PC(39:3)	2,07	2,6	1,37	2,21	1,37	2,21	1,47	0,924	3,25	0,902	1,79	2,18

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
PC(39:4)	3,83	4,14	3,3	3,56	2,07	4,31	2,76	1,28	5,52	2,33	3,85	4,48
PC(39:5)	2,07	2,42	1,76	2	1,21	2,05	1,63	1,1	3,42	1,08	1,85	2,76
PC(39:6)	12,1	21,1	10,5	14	6,91	10,3	10,9	8,98	23,8	8,08	14,5	16,7
PC(39:7)	2,4	4,23	3,07	3,13	1,38	2,32	1,87	1,2	5,36	1,55	2,88	2,52
PC(40:1)	1,01	NA	0,724	NA	0,715	NA	NA	0,692	2,01	0,655	0,888	1,21
PC(40:2)	1,27	0,791	NA	0,805	0,783	0,725	0,751	NA	1,67	NA	0,904	1,38
PC(40:4)	22,8	38,5	40,2	63,3	28,5	40,5	17,8	29,1	64,3	16,2	26,9	3,2
PC(40:5)	93,9	79,7	86,5	88,4	41,3	97,1	57,6	87,8	200	46,2	56,6	116
PC(40:6)	246	26,2	70,8	37,1	47,9	147	193	118	NA	150	34,1	362
PC(40:8)	10,3	12,6	8,97	10,7	6,17	10,2	7,39	5,13	22,5	4,71	8,4	16,9
PC(40:9)	23,9	16	11,8	9,85	4,92	13,4	15,1	7,62	53,6	12,6	10,3	39,4
PC(41:3)	0,994	1,19	0,938	2,13	1,33	NA	0,867	0,725	2,22	0,694	0,777	1,24
PC(41:4)	2,62	6,74	1,48	1,72	1,88	2,32	0,828	0,963	6,6	1,47	2,75	3,75

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
PC(41:5)	1,87	1,49	1,22	1,31	1,12	1,27	1,19	0,848	1,85	0,938	1,43	1,54
PC(41:8)	2,17	1,05	1,2	0,992	0,608	1,61	1,19	0,534	3,34	0,596	0,968	2,01
PC(42:2)	1,88	0,591	NA	1,01	NA	0,815	0,662	NA	6,67	0,907	NA	6,96
PC(42:3)	41,9	54	44,1	45,7	38,8	41,8	43,2	37,6	41,9	45,6	48,1	48,9
PC(42:4)	1,07	1,06	0,986	1,13	0,943	0,923	0,745	0,537	2,82	0,816	0,713	1,57
PC(42:5)	0,111	0,099	0,091	0,149	0,08	0,122	NA	0,058	0,205	0,07	0,091	0,138
PC(42:7)	1,2	2,22	2,05	3,16	1,34	2,01	0,9	1,61	3,61	0,881	1,55	0,635
PC(42:10)	8,98	5,79	6,05	4,57	3,45	8,23	7,31	4,87	17,1	3,46	4,13	20,4
PC(44:5)	3,13	3,12	1,35	2,51	1,45	1,77	1,85	1,36	6,83	1,87	2,25	3,86
PC(44:7)	0,379	0,864	0,499	0,627	0,359	NA	0,472	0,189	0,816	NA	NA	0,317
PC(44:10)	0,537	1,42	1,06	NA	0,323	1,14	0,956	0,602	1,84	NA	0,306	2,69
PC(44:12)	0,457	0,551	NA	0,352	NA	0,514	0,482	0,567	1,27	0,356	0,704	0,764
PC-O(32:0)	4,3	6,49	6,36	7,63	7,46	3,5	4,28	3,91	10,7	4,37	6,47	8,91

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
PC-O(32:1)	0,783	1,04	0,681	0,793	1,05	0,639	0,564	0,505	0,998	0,433	0,647	2,5
PC-O(34:0)	0,8	0,503	1,12	1,13	0,917	0,601	0,781	0,57	2,4	0,607	0,876	1,7
PC-O(34:1)	22,5	28,8	30	36,1	31	19,1	20,4	15,2	60,9	15,3	20,9	42
PC-O(34:2)	15,6	30,1	14	17,2	13,8	13,6	17,2	9,31	37,1	9,68	19,7	32,1
PC-O(34:3)	11,1	30,2	9,61	11,7	10,7	11,9	15,3	9,49	26,9	7,49	18,6	27,9
PC-O(34:4)	2,68	3,72	2,55	2,62	1,73	1,86	2,6	1,27	4,99	1,52	2,79	5,99
PC-O(35:3)	1,51	NA	NA	2,39	0,862	2,11	1,58	0,393	4,75	NA	1,54	NA
PC-O(36:1)	1,5	2,36	3,19	1,69	1,86	1,31	1,56	1,79	3,5	1,08	1,96	1,99
PC-O(36:2)	7,39	14,2	10,8	9,13	8,36	6,92	8,83	5,85	14,2	5,29	10	12,4
PC-O(36:3)	18,2	27,7	19,5	19	16,5	12,2	15,7	9,45	37,7	9,67	18,9	25,8
PC-O(36:4)	91,4	120	105	113	78,3	46,5	54,7	40,5	172	58,4	72,6	99
PC-O(36:5)	42,9	56,8	40,7	32,3	26,2	24,6	27,2	15,7	78,6	20,3	33,9	44,6
PC-O(36:6)	1,17	3,08	1,01	0,759	0,707	1,13	1,43	0,762	2,57	0,521	1,76	3,14

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
PC-O(37:6)	0,854	0,975	1,03	0,732	0,355	0,627	0,296	0,237	1,43	0,346	0,61	0,663
PC-O(38:4)	38,4	59,2	79,2	57,7	44,9	23,5	25,4	29,4	65,5	28,4	37,8	35,7
PC-O(38:5)	97,3	125	134	135	126	59,8	64,1	39,4	148	63	78,2	103
PC-O(38:6)	24,6	24,4	20,4	17,1	13	12,3	16,5	7,26	36,4	11,6	16,9	35,9
PC-O(40:4)	3,63	7,89	11,2	7,29	4,33	2,54	3	4,41	5,84	2,69	6,37	2,99
PC-O(40:5)	13,5	20,1	26,8	18,8	14,5	9,89	10,6	10,2	19,3	8	16,7	17,3
PC-O(40:6)	16,1	12	19,9	11	8,15	8,17	9,52	6,03	20,7	7,47	11,1	24,4
PC-O(40:7)	4,59	5,87	7,93	5,47	3,77	2,34	2,98	2,41	7,15	3,14	4,15	5,68
PC-O(40:8)	1,07	1,53	1,6	1,48	1,31	0,651	0,776	0,39	1,71	0,764	0,966	1,33
PC-O(42:5)	1,33	1,17	2,58	1,79	0,811	0,591	1,15	1,25	2,17	0,728	1,63	1,46
PC-O(42:6)	1,04	0,999	1,49	1,14	0,599	0,732	0,779	0,823	NA	0,882	1,22	1,83
SM(32:1)	5,08	7,95	5,23	6,21	4,75	5,65	4,11	2,09	12,1	2,27	4,29	5,28
SM(33:1)	27,9	39,8	37,3	35,8	19,4	29	19,8	10,9	56,4	14,5	25,1	22,8

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
SM(33:2)	14,5	9,32	15,6	21,9	NA	6,16	9,91	NA	NA	NA	14,9	26,8
SM(34:1)	273	278	254	310	228	244	200	173	601	185	212	356
SM(34:2)	26,4	25,1	18,3	29,1	16,8	19,8	17,1	15,5	64,9	14,2	18,1	25,5
SM(35:1)	7,8	9,05	16	9,09	4,92	9,57	5,81	4,07	11,6	4,39	6,78	7,37
SM(36:1)	67,1	65,6	79,9	64,4	45,7	48,9	42,7	58,9	119	40,1	41,4	73,8
SM(36:2)	14,1	13	13,2	12,7	8,94	9,64	10,1	11,5	25,4	7,86	10,1	15,1
SM(37:1)	5,75	5,21	8,78	5,62	2,86	7,9	4,57	2,71	8,28	3,27	5,18	7,51
SM(38:1)	24,1	NA	21,6	20,2	17,8	24,8	15,1	22,7	51,9	NA	4,47	37,9
SM(38:2)	10,7	11,4	7,1	12,1	6,8	10,2	7,81	7,57	23,6	5,4	8,69	15,7
SM(39:1)	5,44	6,79	6,87	4,37	1,8	6,72	4,66	2,02	9,03	2,48	5,75	8,07
SM(39:2)	0,373	NA	0,77	NA	NA	0,483	0,352	0,699	1,79	1,02	NA	1,78
SM(40:1)	0,085	0,102	0,074	0,071	0,048	0,081	0,077	0,062	0,198	0,043	0,06	0,131
SM(40:2)	19	23	16,1	17,5	10,2	16,3	16,4	11,2	39	8,5	15,5	24,6

Tablica II. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B
SM(40:4)	6,35	1,5	2,77	5,28	3,78	5,75	2,26	4,78	8,2	2,11	3,91	9,32
SM(41:1)	29,4	33	36,5	23,9	12,3	28,6	20,7	18	58,6	16,2	25,8	35,6
SM(41:2)	16,4	18,6	22,5	13,8	5,75	15,3	10,7	6,8	28,4	7,44	15,7	18,8
SM(42:1)	45	41,8	39,8	32,9	21,4	33,5	26,9	27,9	82,2	25,1	32,1	56,3
SM(42:2)	133	99	113	107	71,2	82	71,8	72,9	183	67,1	77,9	174
SM(42:3)	12,7	NA	8,48	9,73	2,21	7,48	6,97	NA	16,3	6,35	8,22	16,9
SM(43:1)	3,91	3,35	2,25	2,35	1,42	3,24	1,67	1,94	9,55	2,82	2,71	4,01
SM(43:2)	4,88	4,06	2,98	3,91	2,42	3,7	2,7	2,37	6,99	2,35	3,16	4,49
SM(44:1)	2,29	2,28	1,46	1,21	0,983	1,41	0,92	1,44	8,89	1,18	1,57	4,36
SM(44:2)	2,92	2,33	1,09	1,72	1,14	1,75	1,37	3,15	8,13	1,49	1,44	3,94
H1	7997	9308	4863	8031	9141	5644	6116	7269	8387	5622	6412	11348

Tablica III. Relativni udio pojedinog metabolita u ekstraktu seruma zdravih pasa (n = 12Z) izraženog u postotku i identificiranog GC-MS-metabolomskom analizom. NA – nije određeno.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
Laktat	9,35	10,43	5,72	10,88	9,2	8,52	5,88	8,96	10,08	8,61	12,81	7,59
Alanin	1,04	1,11	0,46	0,75	1,6	0,93	0,47	0,6	0,69	0,41	0,67	0,54
Glicin	0,15	0,31	0,36	0,34	0,12	0,19	2,82	0,39	0,18	0,33	0,38	0,36
Piruvat	2,85	2,66	2,79	2,92	2,52	2,68	2,82	2,93	3,65	2,45	3,13	2,97
3-hidroksibutanoat	NA	2,66	2,79	2,92	NA	NA	NA	2,93	0,2	NA	0,48	2,97
Valin	1,25	0,39	0,27	0,44	1,23	0,48	1,33	0,45	0,43	0,24	0,54	0,47
Urea	16,39	15,73	18,41	12,08	13,22	23,02	16,24	15,64	14,42	21,45	20,01	18,84
Glicerol	1,42	1,75	1,75	1,71	1,51	1,26	1,48	1,54	2,14	2,01	2,45	2,01
Fosfat	0,84	0,63	0,6	0,76	0,87	0,92	0,71	0,64	0,71	0,62	0,84	0,83
Izoleucin	0,84	0,63	0,6	0,76	0,87	0,92	0,71	0,64	0,71	0,62	0,99	0,83
Prolin	6,82	6,75	6,09	7,74	6,73	5,94	7,34	7,34	7,6	5,89	6,74	7,04
Serin	0,93	0,89	0,89	1,13	1,03	0,7	1,07	0,91	0,55	0,9	0,65	1,05
Treonin	0,59	0,51	0,58	0,47	0,61	0,9	0,38	0,4	0,79	0,44	1,17	0,65

Tablica III. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z	6Z	7Z	10Z	13Z	22Z	28Z	30Z
Metionin	0,27	0,22	0,21	0,22	0,27	0,38	0,17	0,26	0,3	0,2	0,2	0,2
Prolin	0,93	0,84	0,83	0,84	1,17	0,94	0,95	1,01	0,89	0,86	1,08	0,82
Glutamat	1,05	NA	0,87	NA	NA	NA	0,4	NA	NA	NA	NA	0,26
Fenilalanin	0,11	0,17	0,26	0,26	0,18	0,08	0,18	0,22	0,19	0,1	0,27	0,16
Glutamin	NA	NA	NA	NA	NA	0,54	NA	NA	0,86	NA	1,69	NA
Citrat	0,81	0,66	0,83	0,88	0,84	0,66	1,12	0,81	1,24	0,45	1,42	1,02
Glukoza	43,69	44,26	46,96	41,74	47,33	43,5	46,22	45,41	45,16	45,68	33,49	39,76
Lizin	1,14	0,65	0,96	2,22	1,33	0,88	0,72	0,84	1,1	0,57	0,73	0,76
Tirozin	0,39	0,09	0,08	0,18	0,15	0,17	0,27	0,14	0,08	0,09	0,11	0,07
Galaktoza	1,8	1,97	1,86	1,87	1,38	0,78	2,32	2,24	0,78	1,66	0,65	3,61
Palmitat	6,28	5,17	4,34	7,64	6,62	4,56	5,45	4,54	5,61	4,87	5,18	5,03
Mio-inozitol	0,73	0,8	0,97	0,81	0,74	0,7	0,63	0,82	0,96	0,94	1,13	0,79
Stearat	0,33	0,7	0,51	0,44	0,48	0,35	0,31	0,33	0,67	0,6	3,19	1,34

Tablica IV. Relativni udio pojedinog metabolita u ekstraktu seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* (*n* = 12B) izraženog u postotku i identificiranog GC-MS-metabolomskom analizom. NA – nije određeno

Uzorci / **Metaboliti**	**1B**	**2B**	**3B**	**4B**	**5B**	**6B**	**7B**	**8B**	**9B**	**10B**	**11B**	**12B**
Laktat	9,45	5,93	22,02	12,59	12,51	10,52	15,28	6,37	20,16	7,49	10	18,22
Alanin	0,79	0,68	1,2	1,06	0,58	0,88	0,94	0,43	1,61	0,82	0,43	1,23
Glicin	0,37	0,45	0,35	0,18	2,2	0,71	0,61	0,33	0,3	0,43	0,49	0,33
Piruvat	3,33	2,86	3,01	2,38	2,2	7,05	2,75	2,65	3,81	3,09	3,36	2,14
3-hidroksibutanoat	NA	2,86	0,34	0,24	NA	0,93	0,25	0,27	0,19	0,41	3,36	0,18
Valin	0,22	0,37	0,86	0,31	0,4	0,39	0,49	0,62	0,46	0,52	0,23	0,88
Urea	25,55	21,69	17,96	24,92	20,3	34,8	14,87	27,49	7,37	14,09	12,28	18,1
Glicerol	1,42	2,43	3,21	1,26	1,18	1,85	1,31	1,3	2,08	1,93	1,92	1,68
Fosfat	0,68	1,33	1,69	1,22	1,22	1,09	1,56	1,64	0,73	2,05	0,71	0,9
Izoleucin	0,68	1,33	1,69	1,33	0,85	1,7	0,74	0,93	1,03	0,94	0,71	1,01
Prolin	4,58	1,03	7,89	3,79	3,56	8,22	6,12	6,63	6,6	7,84	6,53	3,28
Serin	1,76	2,97	0,4	0,44	0,33	0,34	0,34	0,43	0,4	0,46	2,58	0,33
Treonin	0,37	0,48	0,45	0,83	0,79	0,84	0,43	1,71	0,47	0,74	0,27	0,88

Tablica IV. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / **Metaboliti**	**1B**	**2B**	**3B**	**4B**	**5B**	**6B**	**7B**	**8B**	**9B**	**10B**	**11B**	**12B**
Metionin	0,16	0,06	0,17	0,21	0,14	0,18	0,23	0,17	0,27	0,14	0,11	0,18
Prolin	0,9	1,18	0,48	0,92	0,52	1,25	0,77	0,66	0,81	1,36	0,79	0,88
Glutamat	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,14	0,31	NA	0,23
Fenilalanin	0,41	0,38	0,39	0,33	0,3	0,53	0,62	0,51	0,62	0,35	0,34	0,47
Glutamin	NA	NA	0,38	0,23	0,24	0,53	0,41	0,69	0,62	0,99	NA	0,3
Citrat	0,63	0,53	0,85	0,73	0,46	1,2	0,53	0,79	0,8	0,92	0,49	0,43
Glukoza	36,82	40,12	24,6	37,2	44,42	9,65	39,2	35,19	39,87	41,33	41,9	41,63
Lizin	0,99	0,6	1,13	1,91	0,9	0,97	0,72	0,63	1,19	0,94	0,63	0,7
Tirozin	0,13	0,16	0,14	0,14	0,13	0,17	0,24	0,15	0,1	0,17	0,1	0,11
Galaktoza	1,71	3,99	0,39	0,61	0,71	0,81	0,65	0,59	0,79	0,61	4,31	0,72
Palmitat	5,48	7,08	8,51	4,18	3,29	8,88	6,26	5,36	5,45	6,9	6,53	3,04
Mio-inozitol	0,48	0,59	0,54	0,61	0,44	0,52	0,48	0,54	0,64	0,67	0,54	0,44
Stearat	3,09	0,9	1,35	2,38	2,29	6	4,18	3,95	3,53	4,5	1,4	1,72

Tablica V. Koncentracije metabolita ekstrakta urina zdravih pasa (*n* = 12Z) identificiranih ciljanom metabolomskom analizom. Koncentracije - μmol dm^{-3}. NA – nije određeno

Uzorci / **Metaboliti**	**23Z**	**24Z**	**25Z**	**26Z**	**27Z**	**28Z**	**29Z**	**30Z**	**31Z**	**32Z**	**33Z**	**34Z**
Arg	32,8	30,4	36,7	6,7	27,8	27,9	51,8	6,19	32,5	51,8	76,4	8,6
Asn	244	164	NA	190	191	295	NA	23,1	272	NA	NA	21,3
Cit	61,1	43,5	73,2	39,2	27,4	127	57,4	NA	32,5	93,9	56	2,89
Gln	154	200	334	114	509	351	616	37,9	208	378	1418	62
Glu	293	135	85,6	174	78,5	131	252	NA	123	130	180	20,8
Gly	339	170	158	110	130	234	218	NA	325	201	314	39,8
His	110	82,9	45,8	57,9	57,2	64,6	79,5	7,42	123	62	106	9,07
Met	57,5	28	18,9	32,8	27,1	16,3	21,6	5,11	61	23	22,2	NA
Phe	53,3	24,2	27,8	28,5	25,1	32,3	49,4	NA	50,8	23	34,6	NA
Pro	25,6	11,6	11	12	60,3	11,9	16,6	NA	23,4	11,2	17,9	NA
Thr	351	NA	82,6	102	214	127	279	18,5	NA	129	298	18,8

Tablica V. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	23Z	24Z	25Z	26Z	27Z	28Z	29Z	30Z	31Z	32Z	33Z	34Z
Trp	57,8	41	12,7	33,6	36,4	27,1	36	NA	77	30,5	41,4	NA
Tyr	28,8	26,8	28,8	28,7	27,3	28,8	28,8	NA	28,7	27,4	27,1	28,6
xLeu	103	48,4	93,4	50	46,1	59,6	82,6	NA	80,6	94	74,1	NA
Karnozin	4,1	3,24	5,82	3,66	4,79	8,3	10,8	1,79	8,54	7,08	18	NA
Sarkozin	113	115	3,62	86,1	55	8,24	14,4	NA	21,9	20	4,19	NA
AC(0:0)	NA	NA	155	707	587	448	145	58,7	NA	360	323	85,6
AC(2:0)	250	218	27	155	79,9	56	18,8	24,8	191	84,9	121	46,3
AC(3:0)	77,5	263	2,54	31	12,7	2,43	2,6	1,36	145	11,9	9,69	3,71
AC(4:0)	5,75	9,58	1,48	3,75	3,75	1,7	2,24	0,771	6,02	1,77	2,63	1,12
AC (4:0-OH)	0,832	1,16	1,1	0,496	0,728	0,423	0,774	0,422	0,604	0,491	0,773	0,185
AC(5:0)	5,68	20,6	1,52	2,9	3,13	2,08	2,38	1,52	5,33	1,5	2,86	1,15

Tablica V. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	23Z	24Z	25Z	26Z	27Z	28Z	29Z	30Z	31Z	32Z	33Z	34Z
AC(5:1)	0,532	0,798	0,199	0,492	0,468	0,244	0,297	0,104	0,434	0,261	0,48	0,085
CE(18:1)	1,78	2,35	14,9	3,18	2,1	1,19	2,25	3,02	NA	4,56	14,4	1,69
CE(18:2)	341	409	2835	442	390	227	484	580	163	739	2756	428
CE(20:4)	132	176	1466	122	159	89,2	266	256	73,7	310	1382	193
TG(52:2)	13,7	4,76	37,7	12,5	6,65	1,8	6,49	7,1	2,6	13,5	13,9	6,93
TG(52:3)	14,7	5,92	52,2	15,9	8,4	3,69	11,1	8,12	3,46	13,5	46,6	10,2
PC(30:3)	9,73	7,74	5,65	4,73	3,95	25,3	12,3	NA	2,93	16,7	4,52	12,2
PC(32:5)	0,944	0,802	0,68	0,706	0,457	1,49	1,71	0,123	1,11	0,645	0,86	NA
PC(34:1)	2,93	2,52	8,02	27,1	2,91	2,77	1,37	NA	NA	35,7	5,78	1,53
PC(34:2)	7,12	6,82	20,7	65,4	6,94	8,73	4,51	NA	NA	93,1	12,8	4,82
PC(36:2)	5,82	5,89	18,8	54,1	6,39	9,38	4,28	0,587	0,548	66	7,71	4,78
PC(38:4)	5,84	6,75	22,5	55,8	6,8	7,29	4,48	0,543	0,5	66,9	7,98	4,02

Tablica V. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	23Z	24Z	25Z	26Z	27Z	28Z	29Z	30Z	31Z	32Z	33Z	34Z
PC(38:5)	0,743	0,766	3,47	7,51	0,656	1,01	0,849	NA	NA	9,67	2,53	0,96
PC(42:3)	6,98	4,98	2,61	5,37	4,75	29,8	13,8	1,75	2,68	11,1	2,93	17,2
H1	2960	1611	1650	1427	1599	4067	1812	168	1044	1416	2573	513
AC(8:0)	NA	5,76	0,697	0,298	0,311	NA	11	NA	0,567	NA	0,297	1,57
AC (8:1-OH)	2,17	4,56	1,77	2,33	2,48	0,902	4,5	0,794	2,91	1,23	2,81	1,08
AC(10:1)	0,414	3,79	0,273	0,561	0,542	0,229	0,874	NA	1,29	0,141	0,526	0,483
AC (12:0-DC)	0,255	0,507	0,27	0,321	0,35	0,175	0,47	0,094	0,826	0,113	0,497	0,216
AC (14:1-DC)	0,368	0,923	0,507	0,583	0,505	0,341	0,749	0,149	0,881	0,264	0,829	0,241
Osmolalnost	2497	1776	971	1800	1311	1873	1947	212	1842	1530	1804	264

Tablica VI. Koncentracije metabolita ekstrakta urina pasa invadiranih parazitom *B. canis* i s različitim stupnjem promijenjene funkcije bubrega (*n* = 22B) identificiranih ciljanom metabolomskom analizom. Koncentracije – μmol dm^{-3}. NA – nije određeno

Uzorci / **Metaboliti**	**1B**	**2B**	**3B**	**4B**	**5B**	**6B**	**7B**	**8B**	**9B**	**10B**	**11B**	**12B**	**13B**	**14B**	**15B**	**16B**	**17B**	**18B**	**19B**	**20B**	**21B**	**22B**
Arg	49,2	22,1	26,7	32,7	34,4	NA	67,6	129	18	105	65	57,2	165	25	201	125	39	24,2	276	23,4	169	117
Asn	258	81,6	86,4	143	84,2	14,7	306	174	43,9	178	133	89,2	84,4	50,1	368	80,3	41,3	87,6	473	31,2	84,3	83,4
Cit	25,7	NA	10,5	16	29,7	NA	33,6	64,1	NA	39,7	15,2	104	44,7	8,32	73,7	34,7	12,4	12,8	362	NA	28,3	NA
Gln	NA	297	236	396	328	71,3	1573	1292	243	887	606	506	394	167	NA	1381	378	310	NA	141	655	170
Glu	149	47,8	121	515	74,6	27,1	310	291	58,7	163	115	134	264	39,3	583	175	70,2	107	247	32,4	164	212
Gly	129	197	163	243	190	55,6	591	332	189	422	219	219	199	101	672	107	94,6	148	890	104	253	83,1
His	60,4	78,6	60,8	79,1	41,3	11,4	284	146	38,2	351	73,1	94,5	99,4	33	400	109	60,6	86,8	NA	53,3	132	75,8
Met	5,62	18,7	9,73	17,9	5,88	NA	32,7	55,1	5,06	34,6	15	14,5	22,6	8,18	45,1	19,2	13,7	16	63,7	12,9	42	38,9
Phe	25,3	35,1	33,1	53,5	15,1	6,62	86,5	176	19,4	117	48,1	40,9	63,7	23,1	149	54,4	59,2	59,1	NA	32,3	121	154

Tablica VI. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	14B	15B	16B	17B	18B	19B	20B	21B	22B
Pro	13,6	14,1	24,7	32,8	15,6	NA	70,1	101	23,3	73,2	27,5	35,5	65,4	15,9	77,8	25,2	30,9	33,7	70,9	16,9	96,7	63,3
Thr	NA	374	105	NA	99,2	26	432	NA	44,7	236	424	NA	182	88,2	NA	NA	82	187	NA	117	182	252
Trp	35	41	26,7	35,4	21	NA	82	87,8	25,5	95,2	49,7	83,6	27,2	8,99	191	112	23,9	36,2	132	28,4	32,3	29,2
Tyr	28,8	27,5	27,6	26,7	28,1	28,7	NA	28,8	28,1	24,2	26,4	26,4	25,9	NA	28,8	28,8	27,4	27	NA	27,4	25,1	24,1
xLeu	33,7	52,5	55,3	NA	14,2	NA	141	280	21,2	134	45	63,4	145	48,1	133	54,3	93,2	107	NA	58,9	249	548
Karnozin	5,18	6,09	5,78	3,99	3,65	NA	19,8	44,3	1,95	18,2	7,23	7,66	7,97	4,51	14,7	4,1	37,1	3,92	45,4	8,39	31,9	NA
Sarkozin	2,13	11,5	2,33	13,1	17,3	107	8,2	13,1	NA	8,19	8,27	10,7	2,79	3,92	NA	3,46	3,41	2,13	12	1,84	9,1	2,6
AC(0:0)	50,2	NA	528	107	34,4	253	435	713	112	161	241	261	97,4	NA	695	347	370	355	31,6	NA	143	854
AC(2:0)	0,517	NA	125	20	2,76	34,2	54,5	86,9	32,7	13,2	18,9	27,2	36,2	369	150	41,7	187	101	5,61	224	57,2	219
AC(3:0)	4,54	314	78,2	0,673	10,9	6,35	26,6	571	7,78	45,7	208	394	3,06	101	659	307	122	25,1	10,3	117	8,3	10,7
AC(4:0)	0,47	12	5,68	1,79	0,952	1,08	3,79	46,3	1,18	3,38	19,2	23,6	0,738	5,76	63,7	36,8	8,68	2,92	1,14	8,04	1,36	5,55
AC (4:0-OH)	0,533	1,75	0,34	0,419	0,342	NA	1,52	2,9	NA	0,91	1,47	2,01	NA	0,462	3,8	0,587	0,655	0,249	NA	0,374	NA	0,57
AC(5:0)	1,14	20,3	4,84	1,2	0,828	0,773	2,33	67,8	0,914	1,34	11,8	25,3	1,67	11,1	36,7	28,5	8,08	3,29	0,83	13,6	1,4	2,39

Tablica VI. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	14B	15B	16B	17B	18B	19B	20B	21B	22B
AC(5:1)	0,102	0,542	0,148	0,063	NA	NA	0,406	1,49	NA	0,166	0,3	0,443	0,118	0,209	1,05	1,2	0,314	0,257	NA	0,179	0,076	NA
CE(18:1)	0,897	3,01	8,19	2,45	NA	NA	1,76	7,25	1,53	1,21	9,41	3,41	10,6	NA	11,4	2,82	NA	4,3	2,02	1,26	2,04	2,45
CE(18:2)	200	469	1392	418	91,6	89	450	1384	272	232	1841	626	1940	44	2990	474	55,8	760	411	242	395	375
CE(20:4)	91	189	653	172	44,6	NA	179	705	145	101	932	268	1068	NA	1415	236	NA	396	164	131	186	218
TG(52:2)	4,46	28,1	12,7	5,2	2,97	NA	4,77	40,9	1,8	3,83	32,5	7,4	38,3	NA	30,2	6,03	NA	21	3,53	NA	2,37	7,63
TG(52:3)	6,64	33,8	27,1	8,19	4,51	NA	7,11	75,5	2,7	5,14	34,5	10	48,2	2,12	56,1	13	NA	33,2	1,87	2	3,86	6,36
PC(30:3)	11,8	1,05	3,18	4,52	18,9	0,799	13,8	6,1	9,05	11,8	2,47	5,69	1,19	1,68	3,05	6,88	3,48	2,2	2,11	5,08	2,79	11,5
PC(32:5)	0,408	0,833	0,431	0,509	0,588	NA	1,95	1,29	0,203	1,37	0,512	0,569	0,297	0,352	2,83	0,804	0,277	0,845	0,336	0,531	0,223	0,174
PC(34:1)	1,6	0,726	1,18	0,653	1,4	NA	12,2	14,6	1,03	1,65	1,53	0,957	2,9	0,517	6,18	10,7	0,583	9,4	0,69	0,97	NA	8,46
PC(34:2)	2,65	3,11	3,7	1,93	3,63	NA	33,6	38,3	2,2	3,46	6,01	2,48	6,44	NA	13	12,6	NA	18,1	1,3	2,03	NA	8,23
PC(36:2)	2,43	2,8	3,44	2,12	3,23	0,701	31,4	28	2,27	2,71	5,02	2,18	5,59	0,57	13,6	7,24	0,654	13,4	1,16	1,67	0,779	7,02
PC(38:4)	2,22	1,86	2,97	1,94	3,57	0,706	28,9	27	2,94	2,6	3,93	2,02	6,37	0,366	19	6,82	0,581	18,8	0,862	1,92	0,701	9,86
PC(38:5)	0,269	0,297	0,426	0,245	0,408	NA	4,66	3,65	0,289	0,258	0,761	0,254	0,884	NA	2,11	0,425	NA	1,45	0,176	0,244	NA	6,33

Tablica VI. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B	12B	13B	14B	15B	16B	17B	18B	19B	20B	21B	22B
PC(42:3)	6,41	NA	3,53	5,43	8,03	9,64	19	5,95	13,3	5,9	2,44	7,42	1,23	5,76	2,64	7,91	5,21	1,13	4,35	19	3,74	38,2
H1	2032	755	1145	1817	1103	462	3676	5119	1337	3398	1664	2282	3854	932	3957	1462	1157	1366	15054	2408	4161	1846
AC(8:0)	3,51	1	0,625	2,37	1,04	NA	0,891	52	NA	6,33	9,97	8,96	NA	NA	20,2	18,4	0,449	NA	0,324	0,4	NA	0,58
AC (8:1-OH)	2,34	2,99	1,63	2,29	0,733	0,51	3,31	8,14	0,606	2,14	2,92	3,32	0,584	1,2	6,59	5,9	2,48	1,28	0,949	1,53	0,852	1,01
AC(10:1)	1,53	1,86	0,606	0,579	0,388	NA	0,442	25,4	0,297	2,02	7,57	7,67	NA	0,251	14,8	11,9	0,222	0,326	0,283	0,37	0,462	NA
AC (12:0-DC)	0,243	0,148	0,082	0,114	0,119	0,019	0,058	0,4	0,058	0,143	0,212	0,327	0,027	0,045	0,152	0,126	0,053	0,105	0,034	0,023	0,114	0,017
AC (14:1-DC)	0,345	0,189	0,159	0,201	0,152	NA	0,117	2,36	0,097	0,526	0,66	1,3	0,068	0,161	0,765	0,591	0,143	0,155	0,163	0,068	0,128	NA
Osmolalnost	1145	1018	577	724	766	174	1939	1485	317	1789	859	599	371	381	1973	886	433	1475	609	730	523	368

Tablica VII. Koncentracije metabolita ekstrakta plazme zdravih pasa i pasa s iDCM-om (n = 20) identificiranih ciljanom metabolomskom analizom. Koncentracije – μmol dm^{-3}. NA – nije određeno

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Ala	319	335	782	327	213	361	671	509	810	397	408	783	484	295	320	591	677	373	429	NA
Arg	120	103	128	144	101	156	133	167	123	92,2	141	80,3	153	138	52,6	182	167	138	94,6	81,5
Asn	36,7	48,7	41,1	54,3	42,2	49	51,4	66	50,3	32,2	41,2	36,9	61,5	55,2	25	136	98,2	63,7	52	38,8
Asp	NA	7,76	7,34	NA	8,93	12,1	NA	12,7	14,2	10,9	19,6	7,97	7,83	11,7	NA	NA	9,21	13,5	NA	7,45
Cit	50,2	26,6	52,1	48	71,8	48,4	117	56,6	89,5	33,4	45,4	30,7	165	87,1	27,5	54,9	52,1	55,1	58,5	32,7
Gln	1103	1293	1629	1209	1212	895	1356	1538	1263	758	1199	1173	NA	810	721	1284	885	1098	2001	611
Glu	29,8	33,6	35,8	30,8	32,3	42,4	23,6	45,6	48,7	31,7	58,7	34,8	54,2	86,4	30,2	34,4	44,1	65,4	60,4	55,8
Gly	268	221	256	272	318	479	293	292	264	200	209	202	413	295	123	329	258	302	334	174
His	71,2	89,6	90,4	82,6	77,1	90	95,4	98	96,5	72,3	76,5	76,6	130	89	68,3	196	132	181	108	71,5
Lys	117	229	142	159	58,2	130	155	300	162	84,2	80,5	139	164	260	93,1	403	557	182	164	123
Met	75,8	64,1	62,6	63	86,1	97,2	68,5	61,9	63,9	53,8	50,1	45,1	68,4	57,2	38,7	105	72,2	70	NA	56,5
Orn	13,4	12,6	9,39	12,1	13,2	18,9	13,9	25,2	11,4	7,82	12,8	11,6	28,5	13,9	8,12	17,8	36,7	10,3	13,7	NA

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
Phe	70	75,4	60,8	57,5	56,1	79,9	61,1	69,1	62,2	43,4	47,7	37,2	75,6	53,5	59,3	214	58,2	114	64,7	76,8
Pro	129	117	190	123	213	209	173	153	246	144	146	166	149	143	67,7	221	233	141	145	131
Ser	142	129	110	130	179	172	120	173	128	109	123	109	278	129	77,3	264	137	337	110	81,9
Trp	110	63,2	109	51,2	99,7	149	63,1	115	81,7	49,5	90,4	59,7	33,4	76,3	74,7	63,2	89	64,5	54,7	49,8
Tyr	24,2	25,1	25,3	27,6	25,8	24,1	25,8	24,5	25	26,1	25,5	26	26	25,7	28,8	21,9	24,9	23,9	28,8	25,6
Val	201	286	193	208	154	220	186	309	235	162	132	209	146	210	145	479	436	252	200	127
xLeu	195	281	210	244	129	205	220	347	259	164	165	188	149	212	151	600	562	277	216	168
ADMA	1,08	1,99	2,01	2,06	1,44	2,03	2,16	2,46	2,24	1,37	1,78	1,51	2,73	5,53	2,12	3,09	1,87	3,52	3,31	4,61
Kreatinin	59,5	76,6	69,7	56,9	70,2	71,6	85,4	102	77,9	57,3	54,2	46,5	90,3	NA	148	89,5	69,9	235	107	NA
Kinurenin	2,4	3,22	5,13	2,93	7,88	12,7	5,25	5,7	5,38	3,52	5,07	2,75	6,94	6,74	5,79	25,3	7,8	5,5	5,29	3,04
Met-SO	2,91	2,5	3,25	2,68	5,79	3,39	2,68	3,59	4,35	3,77	2,12	3,37	3,69	3,67	1,62	10,4	1,93	3,36	3,22	2,65
Putrescin	0,445	0,662	0,422	0,52	0,766	0,637	0,609	0,943	0,701	0,617	0,895	0,54	1,48	0,626	1,7	2,52	0,637	2,65	1,84	0,841
Sarkozin	3,38	4,52	4,92	5,48	10	8,97	5,54	4,13	7,14	6,41	3,77	4,44	6,54	11,9	2,72	4,94	9,47	11	9	2,84

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
SDMA	0,355	0,603	0,429	0,513	0,33	0,464	0,762	0,755	0,506	0,339	0,423	0,371	0,622	1,37	0,616	0,632	0,486	1,08	0,885	1,12
t4-OH-Pro	52	37,7	38	47,4	NA	NA	33,1	42,5	57,2	45,1	25,7	31,9	25,1	50,9	9,65	17	NA	12,4	40,7	12,9
Taurin	57,4	122	94,3	156	NA	NA	107	82,4	133	148	82,6	65,5	3,66	NA	55,5	NA	129	47,2	155	NA
AC(0:0)	8,39	33,3	23,9	20,1	24,5	62,1	57,6	58,8	143	35,5	22,5	22	25,9	66,3	54,5	154	52,9	145	39,1	77,8
AC(2:0)	1,35	5,32	4,24	4,56	7,38	12,6	9,28	16,9	7,93	5,6	4,47	5,41	7,41	12,5	9,15	8,73	6,26	38,5	7,35	14,9
AC(3:0)	0,674	0,885	1	NA	NA	1,66	NA	5,92	0,786	0,799	0,621	NA	NA	1,25	0,701	0,816	0,739	0,889	NA	1,18
AC(5:0)	0,899	1,34	0,888	0,893	0,784	1,86	0,84	5,63	0,977	1,57	0,646	0,873	0,748	1,35	0,797	1,02	1,05	2	0,895	1,11
CE(16:0)	437	241	239	197	190	235	147	220	190	203	236	239	210	275	143	167	153	187	237	282
CE(16:1)	215	167	83,1	76,5	75,7	115	67,1	131	77,4	160	83,9	76	72	121	66,1	69,3	29,1	85,9	66,7	98,5
CE(18:1)	39,4	30,4	11,3	10,8	7,55	2,59	27,7	43,3	4,7	21,1	7,67	12,6	6,13	4,34	26,5	8,47	28,4	55,1	26,7	25,8
CE(18:2)	19480	17976	10055	8546	11562	17099	7370	6548	10622	17016	9998	8354	10494	16975	6499	9767	3777	8686	9331	11968
CE(18:3)	658	425	183	172	282	336	148	309	193	416	180	165	241	303	128	169	114	260	162	374
CE(20:4)	12601	9117	4494	4001	4799	7603	4107	2676	5945	8573	4487	3791	4239	7465	3610	5488	3429	3400	5314	8142

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
CE(20:5)	2879	836	340	485	808	456	223	195	233	759	338	460	701	404	182	216	75,2	109	388	468
CE(22:5)	87,7	110	95,5	83,5	63,1	104	54,2	53,4	75,4	100	89,9	83,6	65,1	103	52,8	70,3	62,4	69,9	78,8	108
CE(22:6)	882	571	294	324	468	364	224	133	286	545	298	330	437	360	202	257	181	157	378	597
DG(34:1)	2,63	2,31	1,98	NA	1,84	3,06	2	6,89	8,32	NA	1,73	NA	2,15	2,6	1,81	9,59	7,82	3,7	3,23	2,89
DG(36:2)	3,46	2,13	1,99	1,92	2,75	4,33	2,42	4,21	14,4	2,13	2,07	1,86	2,4	4,3	2,09	13,5	4,59	5,87	3,73	3,63
DG(36:3)	4,73	4,21	3,19	3,65	3,14	8,55	3,81	6,2	28,2	4,06	3,09	3,79	4,22	8,67	3,38	27,6	5,63	7,35	6,1	6,76
DG(39:0)	45,7	27,3	6,63	10,7	10,8	7,29	3,21	2,82	3,19	25,3	6,4	10,9	11,9	7,5	3,33	3,24	1,56	1,9	5,95	7,37
DG(41:1)	25,1	28,7	6,79	9,48	10,9	8,12	5,52	2,53	7,8	27,2	6,6	9,89	11,8	8,77	5,81	7,66	4,93	NA	9,5	17,1
DG-O(32:2)	0,262	0,682	0,264	NA	NA	0,616	NA	0,366	0,587	0,765	0,304	0,27	NA	0,686	0,237	0,636	0,438	0,33	0,238	0,26
DG-O(34:1)	3,09	5,69	3,69	2,96	3,18	6,24	2,85	2,49	5,87	5,29	3,67	2,94	3,2	7,33	3,19	6,23	7,15	6,95	3,26	2,19
DG-O(36:4)	1,17	1,11	1,14	0,889	1,03	1,47	0,746	0,516	1,05	0,905	1,21	0,959	1,07	1,54	0,769	1,11	0,591	1,21	0,829	0,819
TG(44:1)	1,5	1,45	1,29	0,902	0,757	1,89	0,712	0,877	1,42	1,55	1,15	0,829	0,933	1,57	NA	1,04	1,3	1,11	0,803	1,3
TG(48:1)	8,78	8,67	9,23	2,58	6,34	14,5	5,45	11,2	8,63	9,65	8,16	NA	6,77	14,6	4,72	7,1	14,2	7,53	6,74	10,6

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
TG(48:2)	4,33	3,69	3,97	2,51	2,9	8,44	1,98	6,16	4,61	4,74	3,73	2,62	3,75	7,56	2,03	3,83	9,95	3,31	3,35	4,88
TG(48:3)	2,61	2,55	2,69	0,901	1,52	3,24	1,85	2,24	2,17	2,71	2,96	2,12	1,47	3,19	1,57	1,85	1,98	1,78	2,03	1,74
TG(50:1)	16,4	25,8	14,8	5,89	16,1	41	13,5	28,4	24,6	20,2	15,8	6,85	13,7	40,1	11,2	21,2	50,2	33	17,9	12,5
TG(50:3)	17,4	25,6	17,3	9,59	14,2	42,1	14,8	23,4	36,4	23,4	18,3	9,7	14,2	41,6	12,4	35,1	31,6	18	18,7	18,4
TG(51:2)	9,15	NA	4,79	1,98	4,03	10,3	4,44	4,17	5,48	9,51	5,68	3,24	3,77	8,14	4,34	5,49	7,25	5,89	4,97	4,83
TG(51:3)	5,89	6,04	4,93	3,11	3,69	7,16	3,97	3,87	6,06	5,63	4,27	3,52	3,82	6,93	3,73	5,24	4,27	4,87	4,59	4,64
TG(51:4)	4,33	NA	NA	2,24	NA	5,64	2,79	1,87	2,93	5,39	3,56	2,78	3,51	6,18	2,6	2,23	2,56	2,85	2,29	2,37
TG(52:2)	82,5	127	86,7	46	83,1	204	82,5	112	185	126	84,7	41,6	74,1	200	72,8	180	260	219	130	79,6
TG(52:3)	123	235	137	86,1	127	374	132	162	340	243	135	82,6	118	348	117	340	244	233	206	140
TG(52:4)	68,9	150	77,2	58,5	72,1	219	72,6	91	172	160	76,2	58,1	61,6	201	60,1	165	112	78,7	92,8	80,7
TG(52:6)	14,8	12,5	6,45	6,2	6,33	10,5	5,57	3,32	6,95	14,1	6,17	5,72	5,85	11,1	4,52	5,74	NA	NA	7,12	6,82
TG(52:7)	3,71	3,2	2,82	2,14	2,38	NA	2,07	NA	3,07	2,71	1,86	1,89	2,82	2,14	2,95	NA	2,5	1,84	2,39	2,38
TG(53:3)	26,2	NA	13,5	NA	9,73	20,2	11,6	3,19	11,5	NA	13,3	NA	8,96	22,2	10,3	9,33	10,8	10,8	10,1	7,99

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
TG(53:4)	8,12	22,3	5,85	6,52	4,66	14,3	5,29	2,61	7,51	16,3	7,35	5,6	5,59	11,8	5,63	6,4	6,01	5,65	5,74	4,57
TG(53:5)	4,13	3,33	2,45	NA	2,46	3,2	2,29	1,28	2,27	3,42	3,11	3,79	2,01	3,19	2,19	2,33	2,59	2,35	2,22	1,69
TG(54:2)	0,307	0,621	0,329	0,211	0,317	0,753	0,252	0,253	0,402	0,545	0,312	0,153	0,306	0,755	0,219	0,35	0,882	0,504	0,385	0,168
TG(54:3)	39,6	86,2	49,6	50,1	57,9	132	45	43,3	98,2	84,8	51,1	32	50,9	135	41,6	94,4	129	88,9	68	32,1
TG(54:4)	47,3	122	64,7	53,1	69,9	203	66,8	59	144	124	64,4	50,1	64,7	203	59,2	141	145	93,7	90,4	52,8
TG(54:5)	65,4	126	60,9	53,5	54,1	177	63,8	52,7	105	131	59,5	51,8	50,8	172	56,9	98,2	111	70,7	75,8	63,3
TG(54:6)	87,8	123	50,6	50,7	44,3	118	47,5	29,3	66,2	136	50,6	49,2	40	112	42,5	57,8	51	35,4	54,2	53
TG(54:7)	47,1	34,3	14,2	17,8	15,4	24,4	12,2	5,01	8,44	40,3	13,5	16,2	11,7	22,8	10,4	8,07	NA	NA	14,1	12,7
TG(55:6)	20,7	17,2	9,46	7,94	7,64	11,9	6,48	NA	9,23	17,3	8,27	7,84	8,49	10,3	7,15	7,71	5,66	NA	7,12	6,78
TG(55:7)	2,54	1,92	NA	1,25	1,08	0,79	NA	NA	NA	1,8	1,36	0,986	1,16	2,04	1,03	NA	1,03	NA	1,09	NA
TG(56:6)	20,9	40,7	15,1	17,1	16,6	28	20,1	7,28	20,6	44,8	15,4	16,4	14,2	26,3	18,5	17,4	21,2	19,4	20,7	16,1
TG(56:7)	35,4	50,1	16,3	21,1	21,1	31,8	19,2	3,06	17	51,2	15,6	20,6	18,7	30,1	16,7	14,8	14,1	13,6	22	16,6
TG(56:8)	52	63,5	12,3	27,5	21,4	27,2	17,4	4,55	11	69,2	14,5	27,3	18,3	27,3	13,3	10,3	8,41	8,06	17	16,1

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
TG(56:9)	4,08	4,74	1,02	2,86	1,9	NA	2,74	1,58	NA	5,07	1,57	2,7	1,84	2,92	1,18	NA	NA	NA	2,5	1,28
LPC(16:0)	81,6	73,8	79,3	73,9	60,1	87,7	59,1	91,3	104	74,1	78,2	74,8	57,8	87,5	60,1	106	71,9	69,7	141	84,5
LPC(16:1)	2,03	1,85	2,18	2,37	1,41	2,28	1,49	1,78	2,8	1,86	2,01	2,29	1,46	2,25	1,64	2,81	2,8	1,59	3,74	1,71
LPC(17:0)	3,07	2,14	1,92	1,49	1,55	1,85	1,34	1,82	2,06	2,12	1,92	1,48	1,51	1,76	1,37	1,89	1,06	0,986	2,43	1,19
LPC(18:0)	116	82,9	92,6	80,5	73,7	110	72,9	75,4	168	81,4	91,7	80,2	74	109	70,1	166	66,7	71,1	155	85,9
LPC(18:1)	16,2	14,9	16,9	15,8	12,9	17,7	11,2	13,7	20,3	14,1	16,2	15,3	12	17	10,9	19,9	15,8	12	22,1	13
LPC(18:2)	7,15	10,2	12,5	11,4	9,51	16,1	6,55	8,33	10,4	9,84	12,2	11,7	9,07	15,3	6,22	10,1	10	7,05	9,14	6,16
LPC(20:1)	0,269	0,293	0,192	0,205	0,197	0,22	0,167	NA	0,259	0,322	0,174	0,217	0,152	0,171	NA	0,279	0,187	0,169	0,277	0,293
LPC(20:3)	4,27	0,772	1,34	2,29	3,79	3,21	0,81	2,81	6,41	1,49	3,44	1,46	1,68	1,03	2,17	2,84	1,31	0,989	5,68	2,33
LPC(20:4)	11,8	9,11	11,2	9,74	7,61	11,6	6,79	7,85	13	8,9	10,9	9,66	7,24	11,3	6,48	12,4	11,9	5,38	13,8	8,16
LPC(22:5)	0,191	0,277	0,297	0,322	0,121	0,184	0,251	0,185	0,268	0,244	0,249	0,252	0,12	0,206	0,21	0,3	0,236	NA	0,245	0,16
LPC(22:6)	1,48	1,2	0,853	0,972	1,1	0,937	0,497	0,617	0,938	1,21	0,791	1	1,11	0,922	0,485	0,9	0,711	0,401	1,16	0,765
PC(30:0)	2,84	1,54	1,41	1,16	1,61	1,69	1,26	1,55	1,09	1,39	1,49	1,17	1,57	1,59	1,17	1,08	1,14	1,43	1,34	2,94

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
PC(30:3)	1,22	NA	27,7	14,3	8,2	NA	0,952	16,5	NA	NA	21,7	26,9	17,4	NA	15,9	20,7	16,4	17,6	18,6	28,5
PC(32:0)	20,2	14,4	16,4	14,1	15,5	21,6	11,5	10,7	12,2	14,4	15,9	14,1	15,9	22	12,7	11,9	12,6	19,6	15,9	22,9
PC(32:1)	11,2	6,39	7,7	6,3	7,6	7,66	6,94	9,11	5,9	6,91	6,93	6,23	6,92	8,23	7,35	5,35	7,82	9,85	6,36	9,02
PC(32:2)	4,47	2,99	3,19	2,53	2,48	3,45	2,09	1,76	2,67	2,94	3,03	2,55	2,5	3,33	2,18	2,73	2,99	1,15	2,56	3,46
PC(33:0)	1,68	0,907	0,404	0,315	0,605	0,479	0,347	1,05	0,286	0,825	0,432	0,282	0,531	0,417	0,364	0,326	0,249	0,33	0,281	0,878
PC(33:1)	4,23	2,21	1,65	1,08	1,3	1,45	1,43	3,32	1,09	2,19	1,75	1,12	1,42	1,67	1,66	1,01	1,08	1,65	1,13	1,68
PC(33:2)	1,77	1,09	1,1	0,913	1,11	1,27	0,822	1,33	0,901	1,02	1,08	0,92	1,14	1,29	0,8	0,935	0,621	0,615	0,701	1,05
PC(33:3)	0,965	0,428	0,71	0,535	0,566	0,564	0,42	0,344	0,428	0,354	0,69	0,555	0,483	0,545	0,447	0,432	0,255	0,424	0,652	0,822
PC(33:4)	0,623	0,312	0,46	0,457	0,442	0,576	0,358	0,423	0,636	0,409	0,412	0,337	0,396	0,571	0,319	0,455	NA	0,485	0,422	0,557
PC(34:1)	377	256	273	214	218	339	217	237	203	257	268	217	219	337	224	200	225	366	248	284
PC(34:3)	36,6	22,6	30	28,1	25,7	36,1	19,2	15,3	25,4	22,5	28,2	28,4	26	35,9	20,6	25	27,4	21,2	22,3	28,3
PC(34:4)	7,59	3,21	4,5	3,41	4	4,2	3,49	3,56	3,83	3,23	4,19	3,62	3,91	4,42	3,82	3,51	5,61	3,7	3,66	4,98
PC(34:5)	2,34	0,828	1,4	1,32	0,99	1,38	0,887	0,755	1,15	0,955	1,53	1,32	1,08	1,32	0,988	1,56	1,54	0,623	1,38	1,52

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
PC(35:0)	0,218	0,125	0,06	0,044	0,084	0,076	NA	0,1	0,048	0,109	0,086	0,044	0,048	0,089	0,08	0,055	0,06	0,086	0,079	0,103
PC(35:1)	10,2	5,79	4,47	3,05	3,76	4,82	3,72	5,73	2,93	5,46	4,3	3,1	3,88	4,59	3,86	2,75	2,74	3,68	3,43	2,87
PC(35:2)	27,6	17,6	18,2	11,8	16,1	20,9	10,6	12,1	12,2	17,4	17,8	12	16,5	19,1	11	11,9	6,87	12,4	9,8	8,33
PC(35:3)	3,8	1,63	1,76	1,33	2,05	1,87	1,09	1,22	1,21	1,58	1,72	1,29	2,05	1,86	1,26	1,21	0,714	1,33	1,31	1,44
PC(35:4)	1,27	0,499	0,435	0,334	0,408	0,501	0,379	0,587	0,317	0,464	0,447	0,28	0,404	0,404	0,37	0,323	0,299	0,31	0,443	0,456
PC(35:5)	1,08	0,493	0,591	0,467	0,514	0,584	0,369	0,35	0,443	0,44	0,536	0,48	0,5	0,604	0,432	0,486	0,4	0,281	0,544	0,482
PC(36:1)	0,796	0,507	0,609	0,422	0,487	0,669	0,395	0,373	0,532	0,483	0,588	0,422	0,527	0,022	0,4	0,498	0,354	0,54	0,436	0,346
PC(36:3)	320	221	263	218	237	323	170	161	223	222	256	218	236	308	171	218	170	267	207	183
PC(36:4)	NA	382	427	333	305	NA	300	264	330	380	415	336	307	NA	317	332	344	352	374	420
PC(36:5)	44,4	21,3	28,5	21,5	27,1	33,1	15,1	13,6	20,9	20,4	27,1	22,2	26,9	32,2	16	21,5	13,1	22,5	22,9	21,8
PC(36:6)	0,874	0,357	0,501	0,504	0,497	0,508	0,314	0,223	0,434	0,327	0,479	0,491	0,497	0,493	0,314	0,433	0,418	0,271	0,422	0,437
PC(37:1)	1,58	0,832	0,636	0,598	0,687	0,82	0,499	0,556	0,606	0,776	0,686	0,741	0,797	0,892	0,648	0,628	0,424	0,455	0,775	0,658
PC(37:2)	4,91	3,54	3,9	3,35	3,63	4,14	2,62	1,77	3,32	3,49	3,77	3,4	3,82	3,84	2,48	3,26	1,54	2,73	2,44	3,08

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
PC(37:3)	8,11	4,48	3,82	2,19	3,78	4,02	2,72	2,01	2,63	3,64	3,59	2,56	4,04	4,51	3,07	2,79	2,01	4,06	2,21	2,27
PC(37:4)	22,8	11,1	11,1	7,17	8,06	11,2	8,25	8,87	7,72	10,9	10,9	7,31	8,62	10,7	8,57	7,67	5,86	6,47	7,5	6,92
PC(37:5)	7,34	2,86	3,57	2,41	3,72	3,92	2,04	2,05	2,48	2,73	3,56	2,47	3,6	3,76	2,11	2,42	1,41	2,5	2,34	1,98
PC(37:6)	2,77	0,982	1,24	0,987	1,47	1,56	0,704	0,689	0,808	1,01	1,18	0,896	1,43	1,31	0,802	0,927	0,531	0,614	1,14	0,913
PC(38:1)	5,72	3,3	3,42	2,78	3,01	2,64	2,41	2,03	2,49	3,54	3,16	2,99	3,19	2,7	2,81	3,1	3,16	3,08	3,64	2,54
PC(38:3)	0,496	0,18	0,262	0,132	33,5	0,774	0,594	22,6	0,323	0,635	NA	0,22	1,01	0,318	0,619	0,513	NA	50	0,899	0,228
PC(38:5)	NA	110	143	110	136	160	90,9	59	116	108	135	111	134	156	94,2	123	71,8	108	117	104
PC(38:6)	133	75,6	72,4	69,1	85,6	79,4	47,9	36,8	62,4	75	67,4	69,3	88,4	77,5	48,5	64,8	42,3	46,2	77,7	79,6
PC(38:7)	222	96,1	129	93,7	97,3	136	84	109	101	91,8	122	93,6	97,5	130	87,4	105	91,1	83,1	122	126
PC(39:3)	1,84	0,832	1,06	0,673	0,985	1,11	0,749	0,784	0,763	0,798	1,05	0,799	0,89	1,06	0,756	0,643	0,606	0,836	0,931	1,83
PC(39:4)	4,74	2,76	2,29	2,55	1,91	2,32	2,46	1,36	1,9	2,96	2,19	2,49	1,64	1,91	1,98	1,8	2,02	0,93	1,34	3,66
PC(39:5)	2,92	1,21	1,33	1,09	1,21	1,28	0,981	0,551	1,08	1,17	1,24	1,11	1,29	1,19	0,999	1,12	0,776	0,595	1,1	1,37
PC(39:6)	15,5	5,5	6,8	4,88	7,59	7,68	5,28	2,64	5,91	5,49	7,08	4,93	7,36	7,43	5,18	6,12	3,07	4,67	6,05	5,43

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
PC(39:7)	3,28	1,05	1,37	0,873	1,12	1,29	0,956	0,704	1,02	1	1,28	0,825	1,07	1,26	0,962	0,992	0,707	0,531	1,06	1,06
PC(40:1)	1,54	0,779	0,915	NA	0,663	0,792	0,667	1,03	NA	0,703	0,968	0,632	1,06	1,15	0,63	0,827	1,2	0,676	0,862	0,875
PC(40:2)	1,58	1,1	1,1	NA	0,909	1,44	NA	0,819	0,863	1,15	1,02	NA	0,975	1,18	NA	0,705	NA	0,778	0,738	0,758
PC(40:4)	17,4	13,5	22	16	10,1	17,2	18,3	10,1	18,9	13,2	18,9	17,7	8,59	17,2	18	18,8	31,3	14,3	13,5	21,2
PC(40:5)	111	66,1	84,4	68,1	65	62,7	63,9	24,4	70,7	65,5	81	67,3	64,5	63,4	62,6	69,5	46,5	29,6	58	80,7
PC(40:6)	323	157	130	128	190	142	106	41,8	131	156	123	126	192	142	110	133	81,4	77,1	175	148
PC(40:7)	NA	3,47	4,93	3,4	3,66	5,32	3,5	1,71	4,63	3,3	4,73	3,4	3,65	5,19	3,66	4,88	3,68	2,87	5,07	4,44
PC(40:8)	17	5,14	6,54	5,72	6,38	5,72	4,27	2,72	5,23	4,82	6,15	5,75	6,23	5,48	4,41	5,37	3,65	2,45	5,98	6,18
PC(40:9)	26,1	11,1	10,1	10,1	14,2	10,1	6,95	3,96	8,43	10,6	9,59	9,89	14,1	9,32	6,96	8,92	5,31	3,59	13,4	14,4
PC(41:3)	0,861	0,583	0,581	0,522	0,66	0,5	0,525	1,07	0,525	0,509	0,634	0,396	0,703	0,669	0,706	0,525	0,372	0,544	0,746	0,583
PC(41:4)	1,73	1,85	2,09	2,15	3,14	2,08	1,63	1,6	1,86	1,88	1,63	2,06	2,26	2,03	1,29	1,76	1,09	1,24	2,5	2,93
PC(41:5)	1,62	0,871	1,28	1,13	0,93	0,973	0,836	0,558	0,941	0,942	1,24	1,15	0,884	0,855	1	0,979	0,861	0,631	1,24	1,47
PC(41:8)	3,02	0,798	0,705	0,72	1,07	0,586	0,607	0,199	0,635	0,75	0,691	0,817	0,956	0,538	0,679	0,64	0,365	0,22	0,821	1,09

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
PC(42:3)	45	27,3	35,5	32,7	37,6	32,2	30,9	32,1	33,3	25,3	35,3	33,1	40,2	31,5	35,7	36,4	29,6	28,9	41,2	35
PC(42:4)	1,62	1,46	1,09	0,917	0,992	1,48	0,738	0,75	1,03	1,34	1,02	1,1	0,909	1,48	0,663	1,24	1,09	0,798	1,04	1,07
PC(42:5)	0,297	0,112	0,105	0,103	0,141	0,104	0,071	0,06	0,067	0,115	0,114	0,118	0,157	0,084	0,056	0,065	0,076	0,083	0,102	0,096
PC(42:7)	0,395	0,487	1,03	0,3	0,716	0,687	0,808	0,411	0,747	0,471	0,865	0,259	0,306	0,719	0,813	0,795	1,09	0,483	0,586	1,06
PC(42:10)	14,3	5,75	4,58	6,15	8,16	4,42	3,95	1,93	4,39	5,51	4,38	5,96	7,82	3,82	3,84	4,64	2,59	1,37	5,67	5,27
PC(44:5)	3,98	0,635	2,66	2,35	1,71	1,1	1,84	1,18	2,9	0,487	0,543	1,28	2,26	1,17	1,71	3,26	1,52	1,43	2,15	2,83
PC(44:6)	5,05	1,91	2,34	2,45	1,95	3,12	NA	NA	3,31	3,05	1,65	1,92	2,33	2,68	1,77	1,69	1,44	NA	1,33	2,6
PC(44:10)	0,664	0,467	0,359	0,568	0,51	0,531	0,398	NA	0,591	0,428	0,284	0,505	0,514	NA	0,444	0,278	0,301	NA	NA	0,565
PC(44:12)	0,72	0,38	0,398	0,39	0,375	0,362	0,357	0,297	0,521	0,423	0,411	0,325	0,443	0,309	0,335	0,349	0,283	NA	0,319	0,344
PC-O(32:0)	NA	3,51	4,76	3,96	1,74	5,18	1,98	2,41	2,76	3,22	5,04	4,08	2,38	5,26	2,09	2,76	2,65	3,66	6,08	2,48
PC-O(32:1)	0,722	0,721	0,636	0,394	0,603	0,738	0,396	0,417	0,516	0,721	0,655	0,815	0,537	0,561	0,402	0,454	0,366	0,605	0,885	0,55
PC-O(34:0)	0,38	0,423	0,689	0,471	0,398	0,618	0,324	0,196	0,416	0,395	0,389	0,347	0,427	0,524	0,441	0,267	0,247	0,65	0,49	0,438
PC-O(34:1)	11,6	13,7	16,9	13,9	12,3	19,4	9,96	7,42	10,3	13,8	16,9	13,5	12,9	19,8	9,46	10,5	9,43	13,7	17,5	11,7

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
PC-O(34:2)	15	14,3	17,5	14,4	11,9	19,6	9,18	10,3	11,4	14,7	16,8	14,8	12,6	19,4	9,31	10,8	9,31	10	15,6	15,2
PC-O(34:3)	13,7	10,9	14,1	10,2	10,8	13,7	7,12	8,94	8,46	11,4	14	10	10,9	13,2	7,6	8,68	6,95	6,49	10	13,3
PC-O(34:4)	3,13	1,71	1,93	1,61	1,74	2,01	1,18	0,995	1,29	1,67	1,98	1,45	1,63	2,19	0,994	1,33	0,978	1,26	1,98	1,59
PC-O(35:3)	2,34	1,53	1,2	NA	1,1	1,46	0,735	0,954	0,934	1,37	1,24	1,07	1,05	1,48	0,761	1,22	0,446	0,931	1,02	1,2
PC-O(36:1)	1,59	1,35	1,85	1,19	1,14	1,92	0,835	0,626	0,939	1,4	1,78	1,07	1,03	1,78	0,901	0,819	0,781	1,17	1,42	0,927
PC-O(36:2)	8,05	7,01	9,36	7,09	6,08	9,97	4,42	5,02	5,66	7,43	9,03	7,34	6,24	9,9	4,51	5,52	3,68	5,46	7,88	5,49
PC-O(36:3)	14,2	13,9	15,6	13,9	11,4	18	8	9,16	10,7	14,5	15,2	13,2	12,1	17,9	8,09	10,4	8,72	9,92	15,7	12,4
PC-O(36:4)	60	62,9	60,9	56,5	36	68,8	32	31,7	40,7	63,9	60,5	57,3	38,3	69,3	33,8	40,7	47,7	33,8	67,1	50,7
PC-O(36:5)	46,6	33,2	29,8	27,3	21,8	31,1	14,8	18,9	20	33,3	29,1	27,4	21,8	31	15,9	20,2	21,8	12,9	26,7	26,2
PC-O(36:6)	2,35	1,07	1,24	0,982	1,35	1,17	0,529	0,675	0,668	1,08	1,22	0,977	1,24	1,05	0,594	0,723	0,435	0,406	0,801	1,19
PC-O(37:6)	1,49	0,697	0,36	0,258	0,38	0,496	0,249	0,28	0,295	0,701	0,348	0,35	0,498	0,398	NA	0,3	0,323	0,292	0,293	0,437
PC-O(38:4)	32,7	32	38,6	27,9	16,4	35,6	16,1	17	20	31,9	37,7	27,3	16,7	35,7	16,4	20	21,5	20,9	29,3	22,1
PC-O(38:5)	71,6	73,4	74,9	69	47,4	89	39,8	37,8	49,5	74,3	73,5	68,8	48,3	89,2	41,3	49,1	54,1	52,5	84,1	55,5

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
PC-O(38:6)	24,8	19,5	16,2	17,3	15,6	17,3	7,79	8,08	10,6	19,5	15,6	17,1	17,1	17,2	8,39	10,5	10,5	6,64	18,5	14,6
PC-O(40:4)	2,91	3,34	4,46	2,63	1,4	3,58	1,9	1,91	2,09	3,61	4,27	2,68	1,34	3,76	1,85	1,95	2,77	1,94	2,15	2,07
PC-O(40:5)	10,2	10,3	14,4	9,97	5,82	12,5	6,16	5,52	7,86	10,3	13,9	9,8	6,15	12,5	6,14	7,52	7,36	6,1	9,1	7,86
PC-O(40:6)	14,9	13,2	12	12	9,37	12,4	5,6	4,28	7,36	12,7	11,3	12,1	9,58	11,9	5,78	7,42	5,63	3,8	11,8	9,56
PC-O(40:7)	3,98	2,75	3,37	2,62	2,33	3,17	1,34	1,27	1,87	2,75	3,18	2,71	2,44	3,03	1,45	1,93	1,64	1,5	3,41	2,17
PC-O(40:8)	0,833	0,534	0,666	0,556	0,482	0,73	0,328	0,31	0,432	0,523	0,64	0,568	0,481	0,734	0,36	0,463	0,42	0,414	0,847	0,512
PC-O(42:5)	1,39	1,06	1,45	1,32	0,758	0,853	0,637	0,895	0,938	1,17	1,56	1,23	0,886	0,933	0,622	0,901	NA	0,691	0,784	0,779
PC-O(42:6)	1,25	1,16	1,16	1,51	NA	1,39	NA	0,594	0,534	1,18	1,12	1,4	0,962	1	NA	1,47	NA	NA	1,05	1,05
SM(32:1)	5,12	2,48	3,44	2,46	2,4	2,43	1,54	4,85	1,42	3,18	3,26	2,55	2,8	3,68	2,35	1,98	2,13	3,24	2,41	4,36
SM(33:1)	101	55,5	47,2	34,2	46,4	48,7	26,2	28,2	34,7	52,1	47,3	36,2	46,4	51,8	30,1	32,1	19,6	33	46,2	54,2
SM(34:1)	221	179	189	167	145	217	129	118	140	179	192	165	146	220	129	137	115	198	166	235
SM(34:2)	19,8	16,7	15,6	13,9	12,6	19,9	13,3	14,1	12,6	16,8	15,7	13,6	12,5	20,6	13,4	12	12,9	22,5	17,5	28,5
SM(35:1)	11,9	8,12	5,83	4,26	4,28	6,11	4,7	5,37	3,61	7,98	5,99	4,31	4,33	6,2	4,82	3,48	3,56	5,12	3,68	5,33

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
SM(36:1)	55,4	41,7	41,9	32,6	30,8	50	32,6	28,3	27,9	42,1	39,7	32,6	31,8	50,8	33,6	27,3	27,7	50,6	40,4	38,3
SM(36:2)	12,7	11,2	10,1	7,96	7,45	11,5	9,3	9,27	6,45	13,5	10,7	8,15	7,44	10,7	9,37	5,75	10	14,2	9,53	10,3
SM(37:1)	6,85	5,26	4,33	3,4	3,18	3,29	3,23	2,86	2,01	5,8	4,44	3,65	3,12	3,74	3,8	2,58	2,51	3,47	2,06	6,56
SM(38:1)	16,2	15,8	15	16,8	12,5	12,4	11,4	16,6	12,2	15,3	14	16,7	10,5	5,91	12,1	7,41	10,8	15,6	14,9	25,1
SM(38:2)	6,98	8,13	8,84	8,84	6,7	9,68	7,24	8,53	5,3	8,05	8,72	8,78	6,72	9,4	6,6	5,41	7,33	8,93	8,58	13,9
SM(39:1)	5,7	4,39	4,23	4	2,56	3,97	2,8	4,39	2,35	4,15	4,28	3,3	2,24	4,18	3,23	2,56	2,75	1,77	1,95	6,7
SM(40:1)	0,06	0,057	0,064	0,054	0,042	0,073	0,044	0,068	0,034	0,059	0,062	0,052	0,032	0,068	0,042	0,027	0,035	0,034	0,048	0,079
SM(40:2)	18,6	16,3	15,5	14,8	10,5	16,9	11,6	19,2	9,39	16,9	16,1	14,3	10,5	17,1	11,6	9,1	10,4	13,1	13,5	22,6
SM(40:4)	1,4	NA	1,47	2,85	1,96	1,78	2,34	2,38	2,33	NA	2,68	3,05	1,74	1,07	2,2	1,41	1,99	2,72	3,28	4,24
SM(41:1)	22,8	18,8	17,5	14,2	14,1	19,2	12,7	14,4	15	19,1	17	13,9	13,8	18,7	12,8	14,6	12	11,9	14,3	23,1
SM(41:2)	17,6	13,6	11,5	10,2	8,81	12,8	9,44	10,9	8,86	13,6	11,5	10	8,48	12,5	8,75	8,61	9,75	8,54	9,83	18,3
SM(42:1)	24,9	23,2	21,4	17,6	21	25,1	15,9	21,1	17,7	24,7	20,2	17,7	19,6	25,2	15,4	16,8	15	19,1	23,7	28,9
SM(42:2)	81,9	80,7	70,1	69,5	64,8	83,1	52,5	54,9	57	81,5	68,3	68,8	65	86,1	51,6	56,2	46,8	90,3	95,9	102

Tablica VII. Nastavak s prethodne stranice.

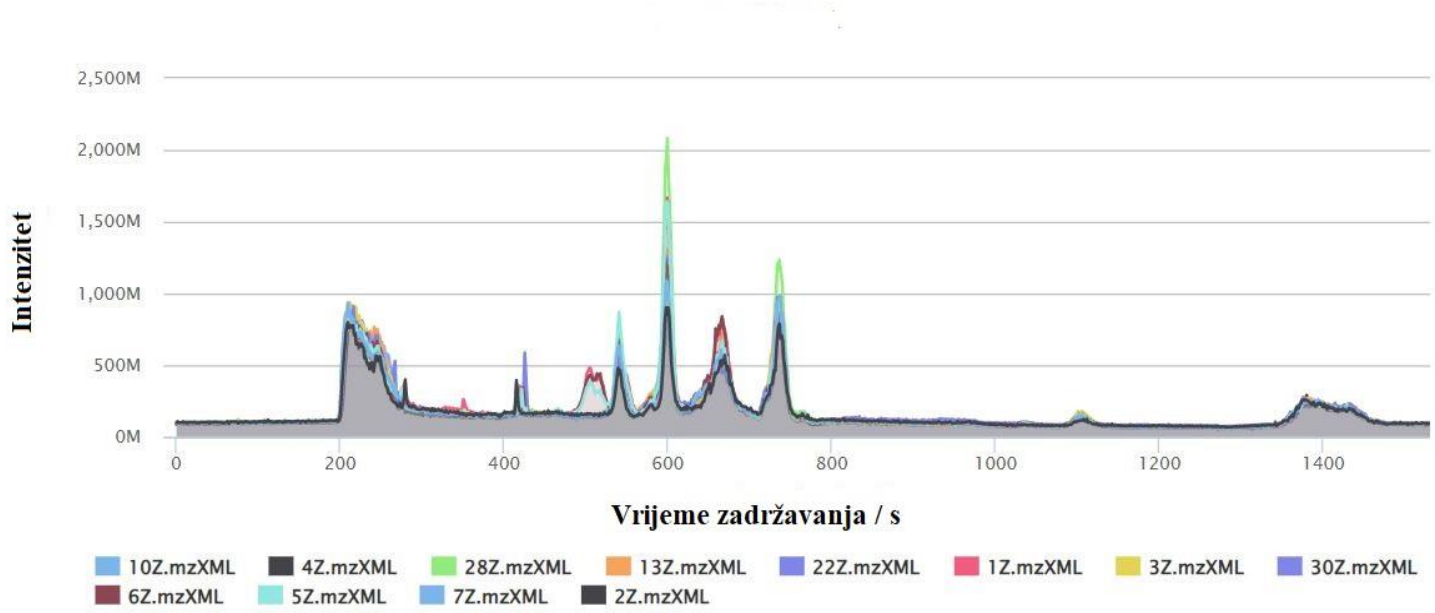
Uzorci / Metaboliti	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
SM(42:3)	6,32	9,86	8,44	8,87	7,19	10	6,66	7,04	6,05	10,1	8,26	8,99	7,09	9,79	6,52	5,43	6,89	8,64	10,7	12,5
SM(43:1)	1,43	1,37	1,26	0,834	1,32	1,05	0,926	1,43	1,23	1,28	1,25	0,783	1,38	1,52	0,861	1,36	1,42	0,891	1,5	1,89
SM(43:2)	3,2	2,56	2,62	1,52	1,79	2,71	1,69	2,99	1,82	2,55	2,47	1,64	1,93	1,84	1,68	2,19	5,61	1,43	2,88	3,09
SM(44:1)	1,31	1,59	0,86	0,746	0,884	1,48	0,547	0,586	0,823	1,62	0,955	0,681	0,802	1,25	0,525	0,845	0,904	0,815	0,9	0,813
H1	6791	5804	5635	6212	7403	5409	7049	12535	8639	5779	5650	6218	7519	5407	7165	8799	5764	6265	9148	5351

Tablica VIII. Relativni udio pojedinog metabolita u ekstraktu plazme pasa s iDCM-om (n = 20) izraženog u postotku i identificiranog GC-MS-metabolomskom analizom. NA – nije određeno

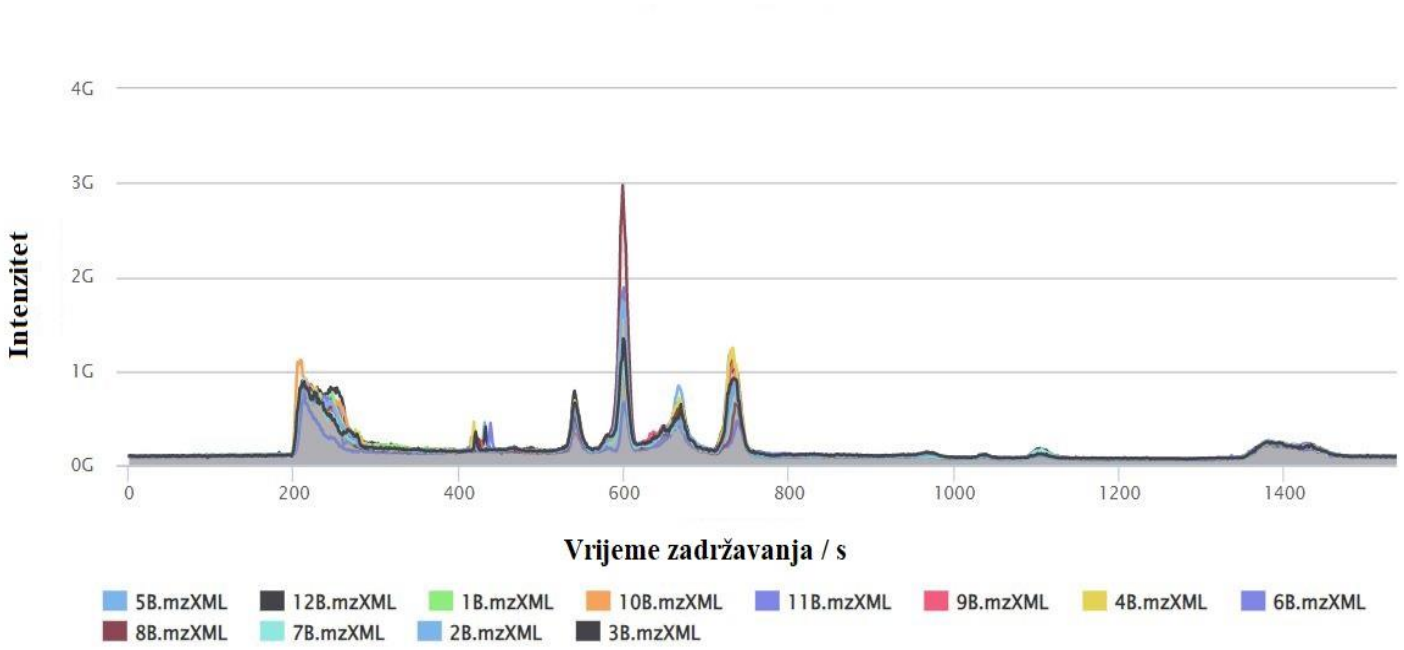
Uzorci / Metaboliti	K1D	K2D	K4	K5	K6	K7	K8	K10	12Z	21Z	22Z	23Z	13 iDCM	14 iDCM	15 iDCM	16 iDCM	17 iDCM	18 iDCM	19 iDCM	20 iDCM
Laktat	1,05	1,04	1,93	1,37	0,62	1,71	1,11	2,00	3,47	2,69	4,39	7,85	3,00	3,36	4,27	2,32	4,72	3,76	3,89	1,45
Alanin	0,99	0,82	0,97	0,92	0,78	0,95	1,01	0,78	1,39	0,99	1,36	1,76	1,39	0,62	4,27	1,45	1,29	1,21	0,96	1,34
Piruvat	16,03	15,49	1,56	1,27	1,48	1,74	1,53	1,55	1,78	1,38	1,49	1,38	1,33	1,43	4,27	1,85	1,35	1,75	1,06	1,28
3-hidroksibutanoat	0,93	0,97	1,87	1,90	1,58	10,07	2,18	1,83	1,08	1,06	0,42	1,87	1,05	0,82	4,27	1,12	1,25	2,54	0,29	1,01
Valin	1,42	0,3	0,34	0,37	0,33	0,32	0,39	0,38	0,52	0,41	0,55	0,38	0,23	0,50	4,27	0,74	0,35	0,34	0,39	0,46
Urea	15,93	15,49	1,66	1,93	1,48	1,74	1,53	1,54	1,91	1,37	1,49	1,38	1,33	1,42	4,27	1,84	1,35	1,75	1,05	1,15
Glicerol	4,95	4,87	4,25	5,75	4,51	3,35	4,54	5,10	2,68	3,98	6,68	1,94	3,65	5,04	4,27	4,40	3,61	3,57	6,10	2,76
Fosfat	0,83	0,35	0,38	0,70	0,33	0,28	0,35	0,73	0,41	0,35	0,50	0,23	0,12	0,41	4,27	0,78	0,26	0,24	0,35	0,49
Izoleucin	1,48	1,46	1,45	1,27	1,39	0,69	0,63	1,79	1,12	0,43	0,85	0,81	0,76	0,53	4,27	1,16	0,81	0,46	0,60	6,90
Prolin	6,36	6,26	6,16	4,04	6,37	6,10	7,57	7,24	7,43	5,07	7,08	5,39	3,76	5,86	4,27	6,48	4,89	6,48	5,03	4,07
Serin	0,74	0,48	0,73	0,92	0,85	0,49	0,92	0,95	0,89	0,46	0,45	0,65	1,31	0,46	4,27	0,54	0,85	0,55	0,32	0,33
Treonin	0,59	1,16	0,67	1,04	1,11	0,57	0,43	0,77	0,35	0,48	0,38	0,25	0,71	0,46	4,27	0,32	0,48	0,30	0,27	0,20
5-oxoprolin	0,99	1,08	0,98	1,17	1,04	0,89	1,04	0,87	0,54	0,67	0,66	0,58	1,24	0,67	4,27	0,32	0,85	0,90	0,76	1,19
Glutamat	0,59	3,59	0,58	0,54	0,46	0,54	1,03	1,14	0,52	0,18	0,64	0,57	0,37	0,36	4,27	0,28	0,44	0,37	0,21	0,36
Fenilalanin	0,52	2,01	0,51	0,56	0,55	0,55	0,56	1,00	0,46	0,38	0,57	0,42	0,37	0,46	4,27	0,31	0,41	0,27	0,43	0,35

Tablica VIII. Nastavak s prethodne stranice.

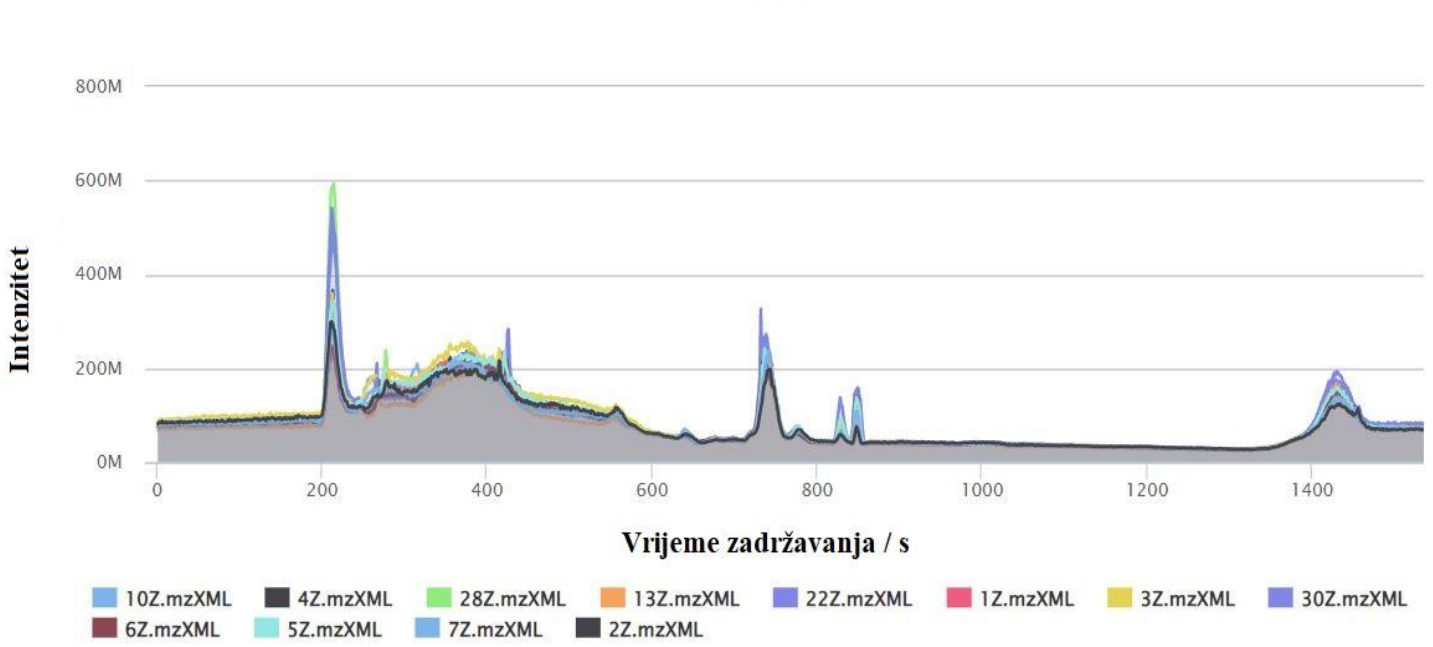
Uzorci / Metaboliti	K1D	K2D	K4	K5	K6	K7	K8	K10	12Z	21Z	22Z	23Z	13 iDCM	14 iDCM	15 iDCM	16 iDCM	17 iDCM	18 iDCM	19 iDCM	20 iDCM
Glutamin	0,31	0,41	0,48	0,57	0,39	0,23	0,79	0,53	0,52	0,52	0,65	0,31	0,80	0,52	4,27	0,74	0,55	0,50	0,58	0,77
Citrat	1,4	0,93	0,89	1,38	0,89	0,70	0,78	0,71	1,63	1,06	2,02	1,34	1,07	1,19	4,27	1,16	1,20	0,87	1,21	1,03
Glukoza	24,35	27,87	2,97	2,88	3,39	2,72	2,92	2,97	2,11	3,99	2,57	3,27	4,05	3,46	3,53	2,48	3,62	2,98	4,51	3,88
Lizin	0,15	0,03	0,15	0,20	0,17	0,07	0,23	0,12	0,15	0,09	0,07	0,14	0,10	0,08	0,09	0,19	0,11	0,12	0,04	0,12
Tirozin	0,73	0,75	0,72	0,88	0,72	0,24	0,53	0,78	0,67	0,22	0,46	0,40	0,46	0,32	0,37	0,44	0,30	0,18	0,33	0,36
Galaktoza	0,43	0,35	0,47	0,59	0,64	0,36	0,35	0,86	1,00	0,68	0,46	0,47	0,68	0,60	0,58	0,57	0,59	0,32	0,33	0,42
Palmitat	10,08	7,06	7,20	5,50	6,75	1,00	8,30	5,72	8,40	6,68	8,28	7,17	5,70	7,75	6,89	7,84	6,95	6,66	5,88	6,44
Mio-inozitol	0,38	0,7	0,58	0,70	0,67	0,48	0,51	0,44	1,27	0,60	0,63	0,93	0,86	0,62	0,87	0,56	1,05	0,59	0,45	1,35
Oleat	1,88	1,27	1,06	1,58	1,30	1,32	1,10	1,39	1,36	1,23	1,21	1,13	0,92	1,23	1,12	1,02	1,11	0,36	0,86	1,02
Stearat	6,84	5,17	5,50	7,11	4,94	6,95	5,66	4,10	6,02	4,22	6,09	4,83	4,09	4,96	4,67	5,39	4,70	4,46	4,33	4,34



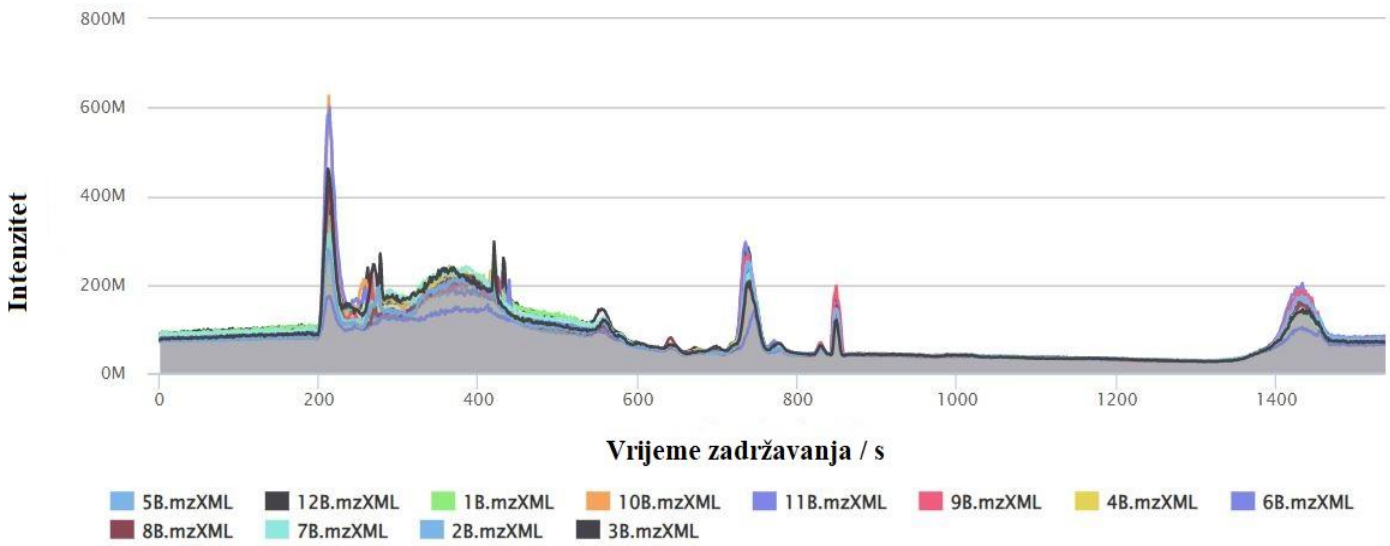
Slika II. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta seruma zdravih pasa uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



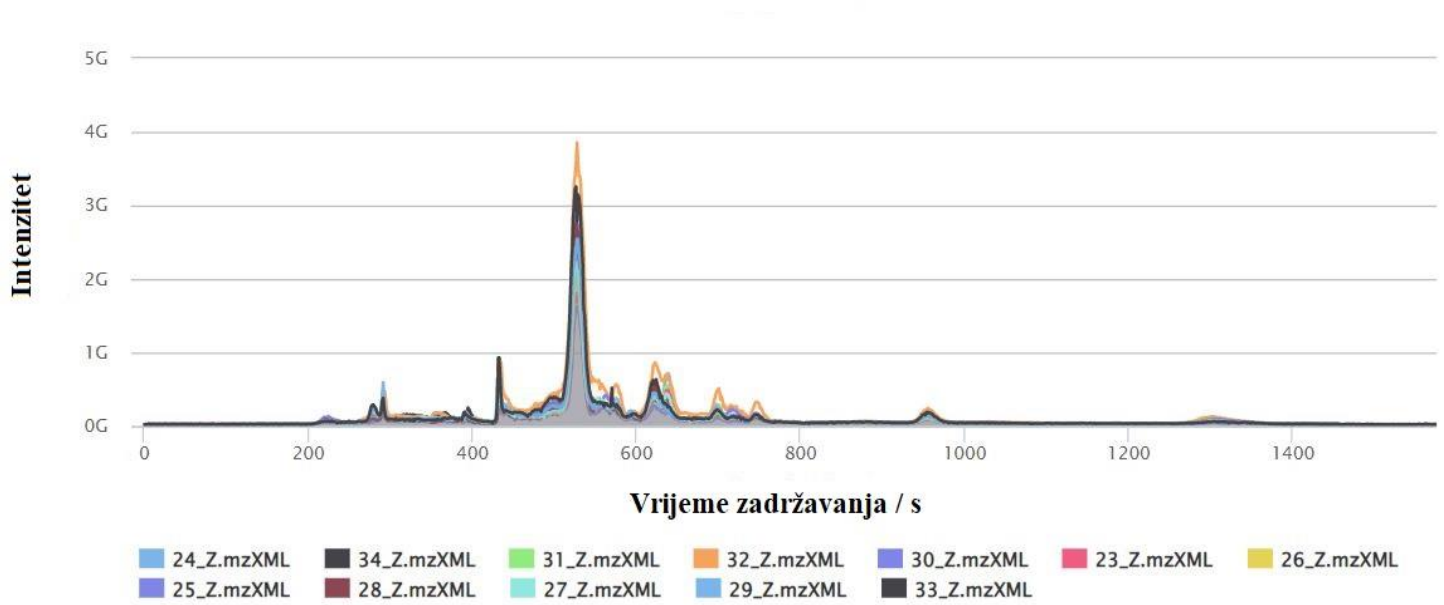
Slika III. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



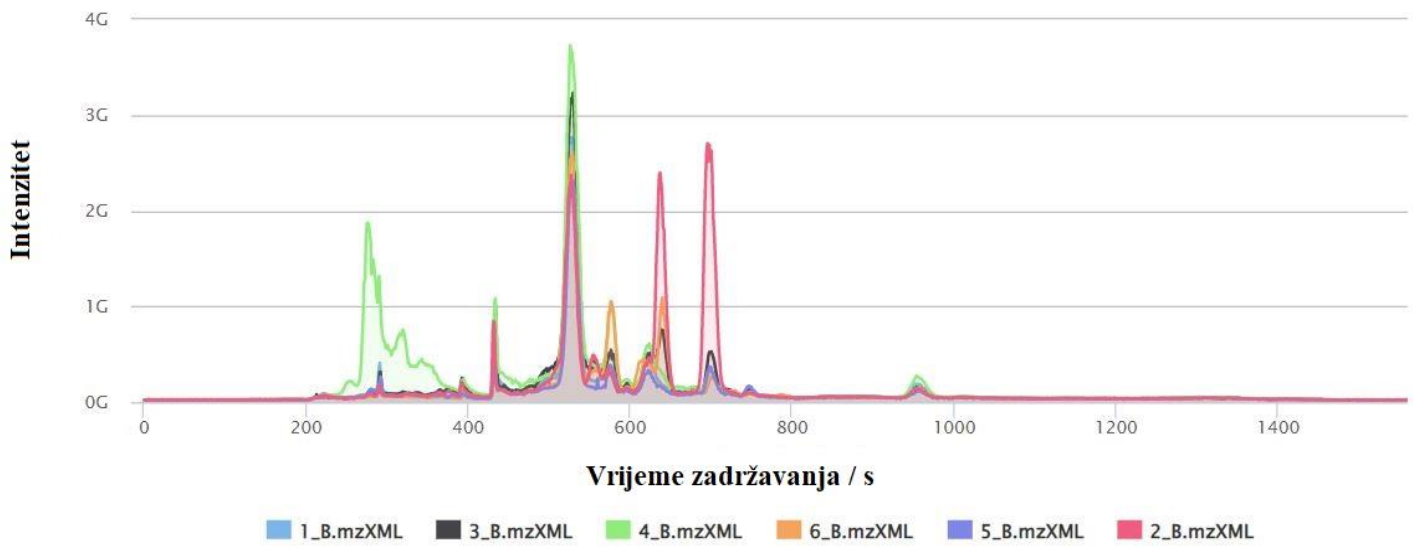
Slika IV. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta seruma zdravih pasa uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



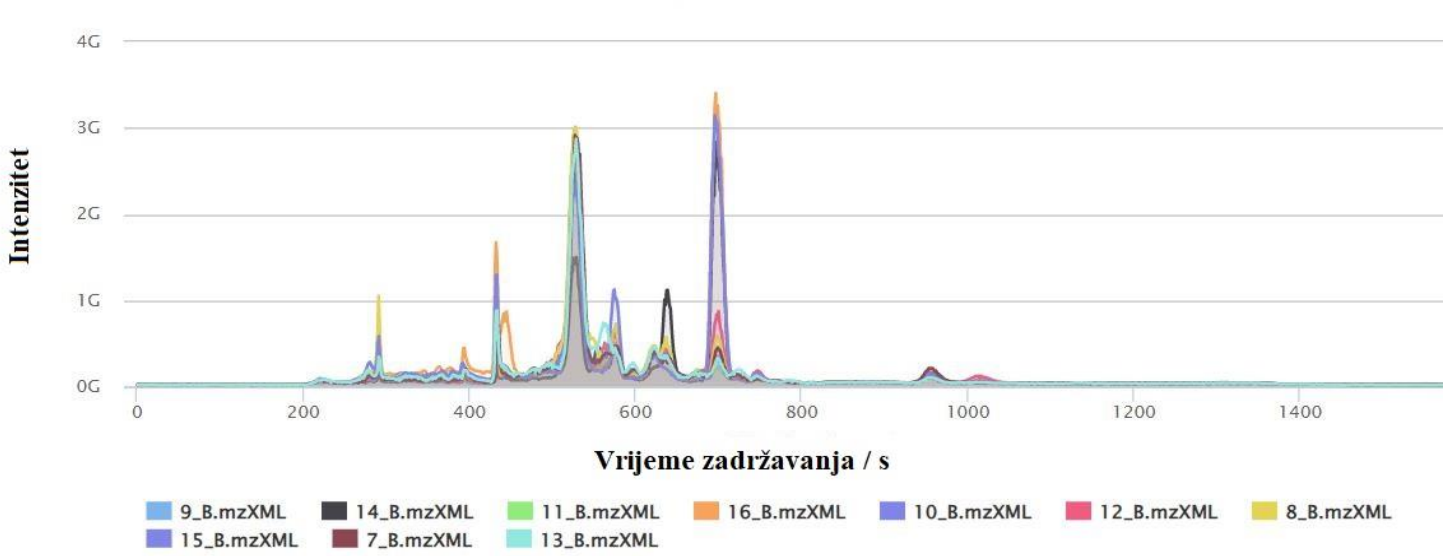
Slika V. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta seruma pasa invadiranih parazitom *B. canis* uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



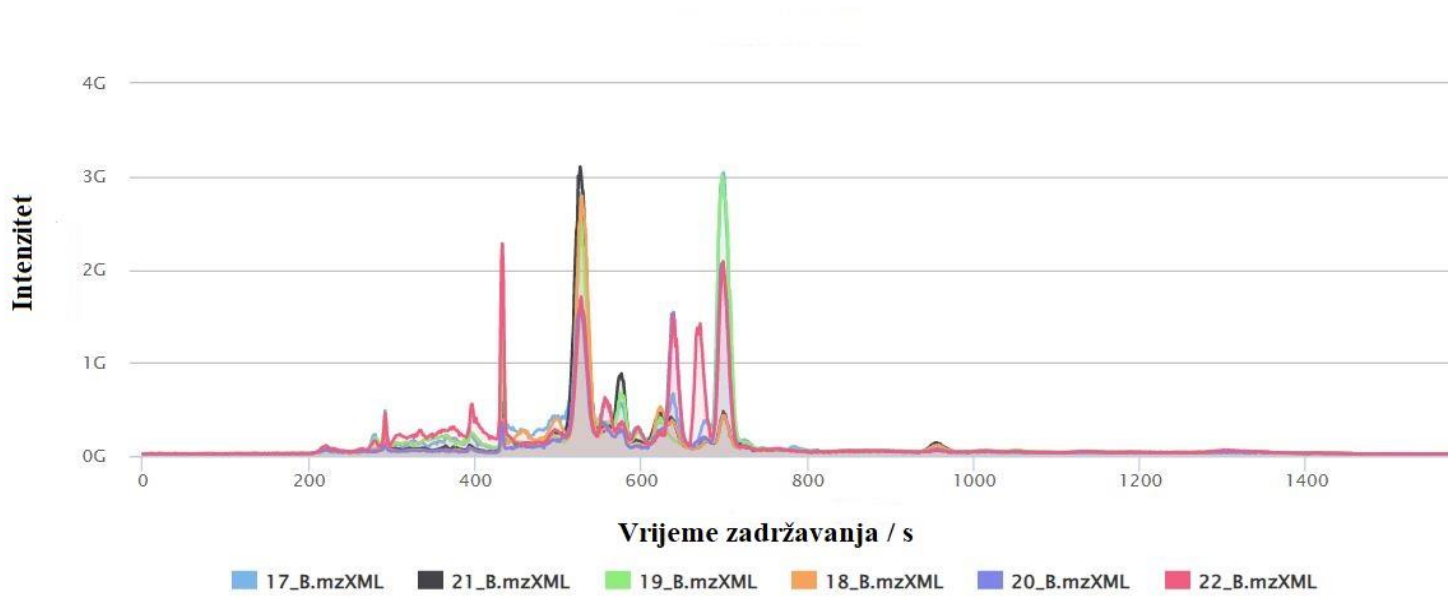
Slika VI. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina zdravih pasa uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



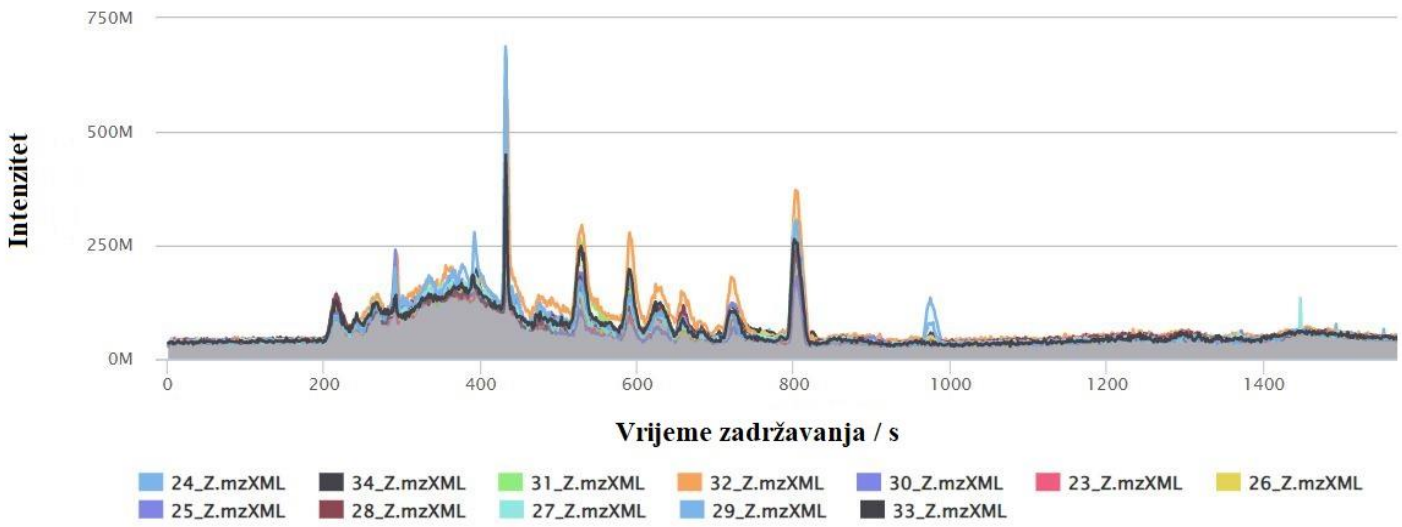
Slika VII. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina neazotemičnih pasa s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5, skupina A) uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



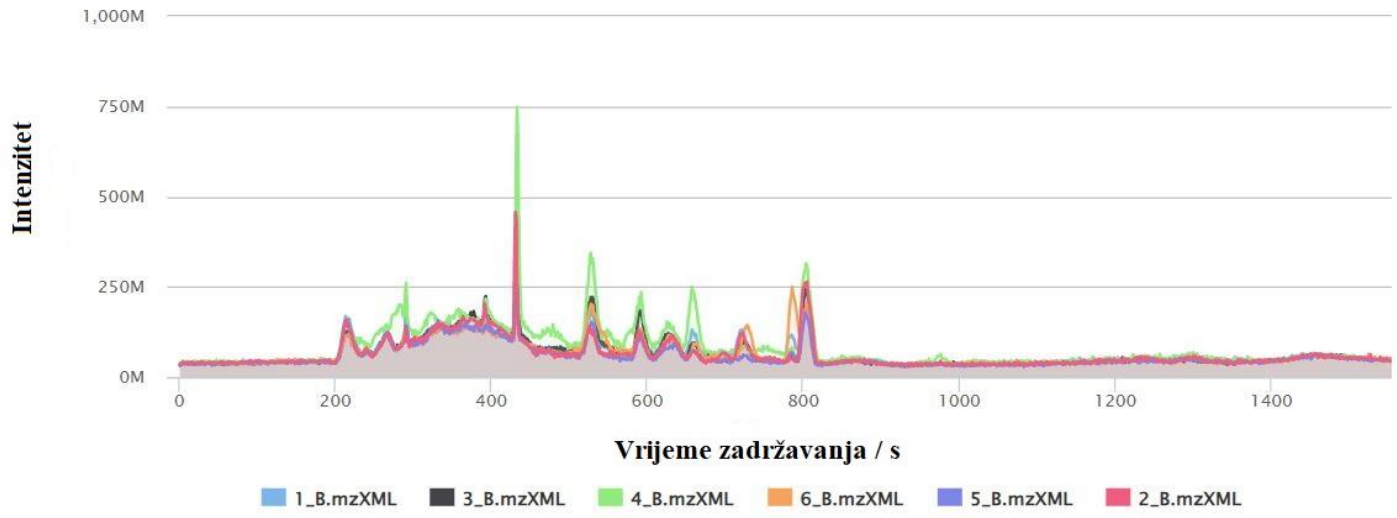
Slika VIII. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina neazotemičnih pasa s babeziozom i vrijednošću UPC >0,5 (Skupina B) uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



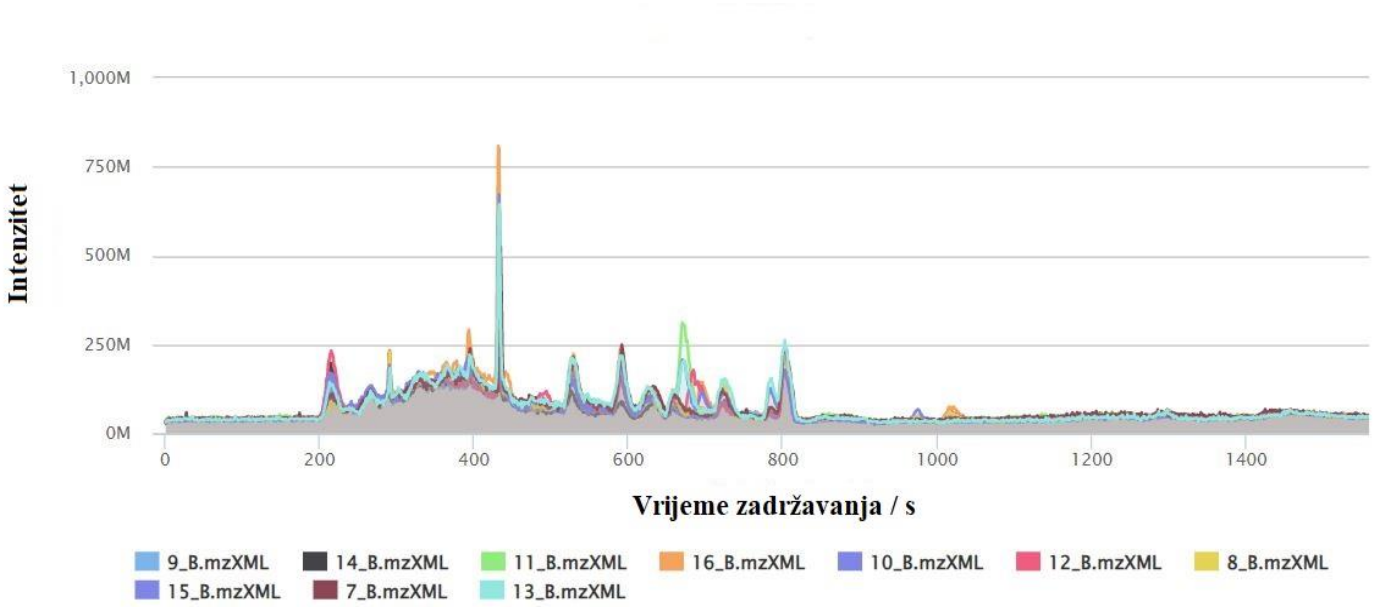
Slika IX. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina azotemičnih pasa s babeziozom i vrijednošću UPC >1 (Skupina C) uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



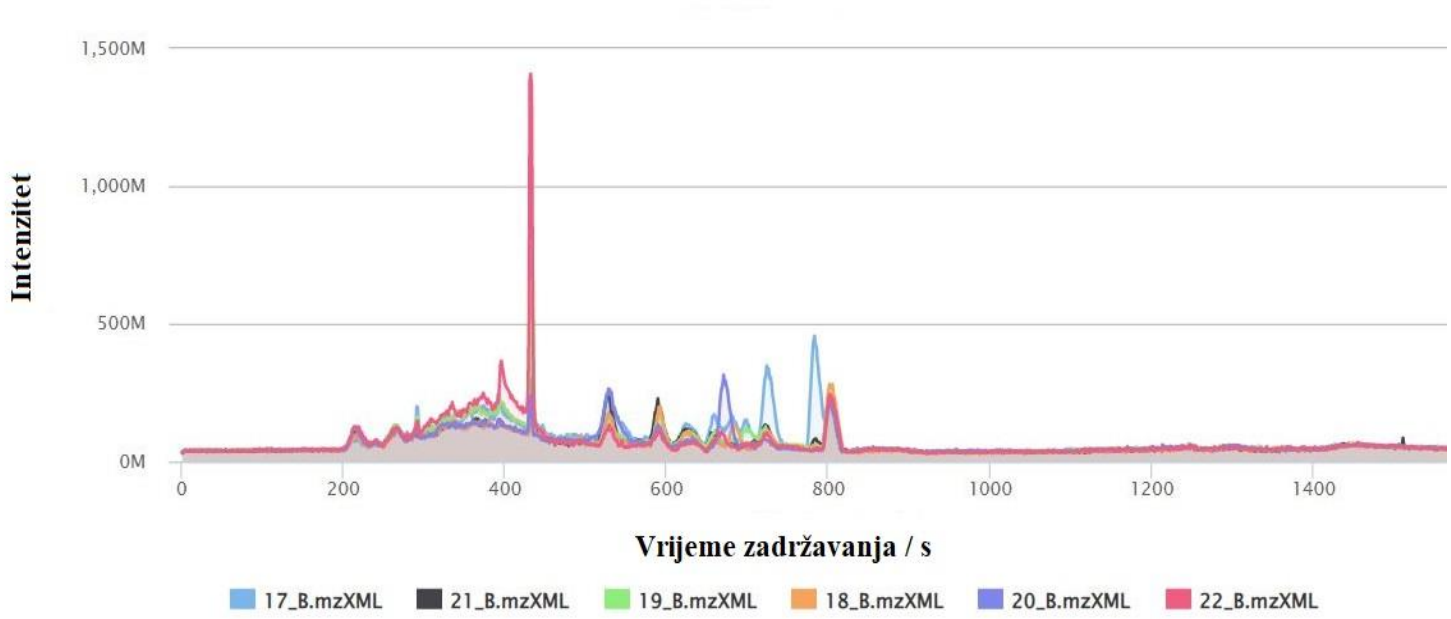
Slika X. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina zdravih pasa uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



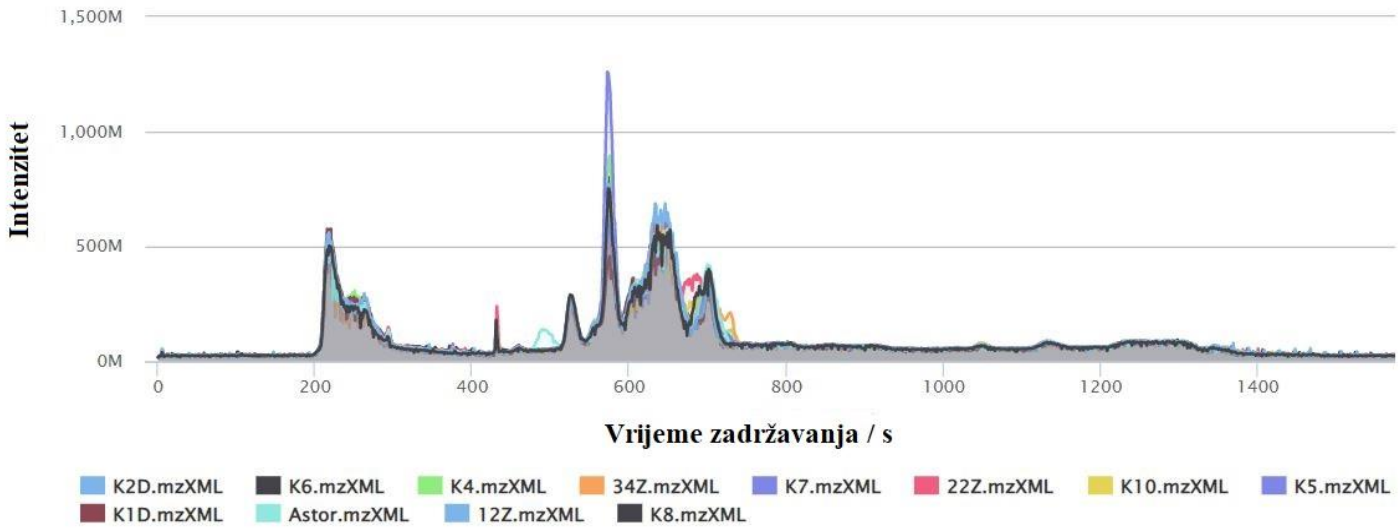
Slika XI. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina neazotemičnih pasa s babeziozom i urednim omjerom proteina i kreatinina u urinu (UPC <0,5, skupina A) uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



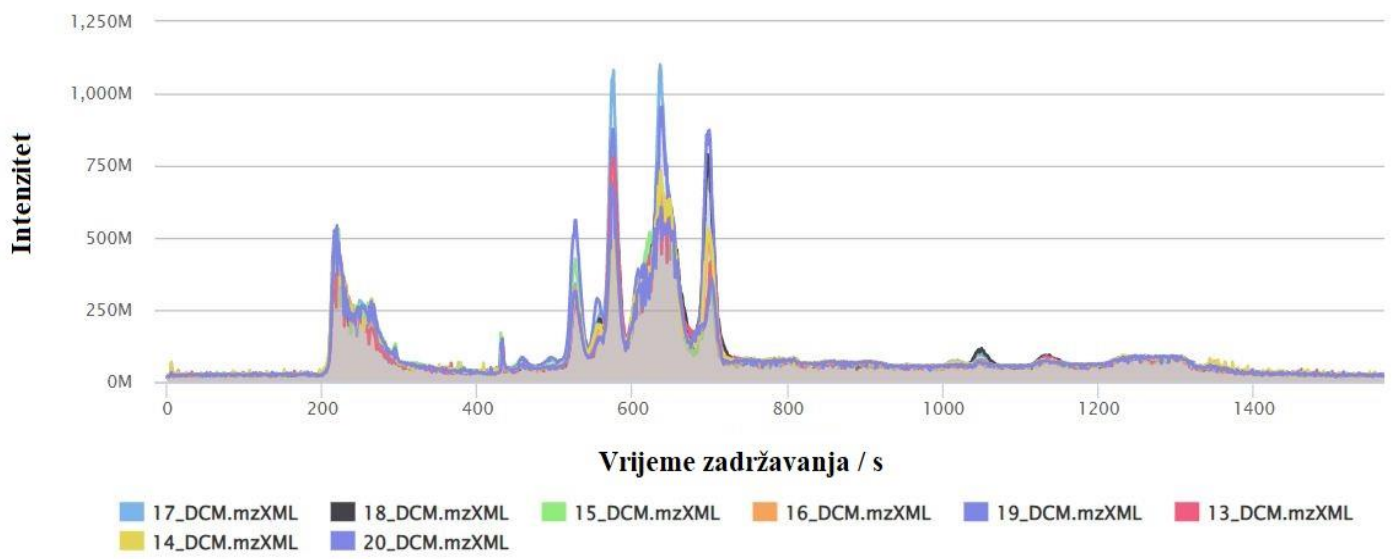
Slika XII. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina neazotemičnih pasa s babeziozom i vrijednošću UPC >0,5 (Skupina B) uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



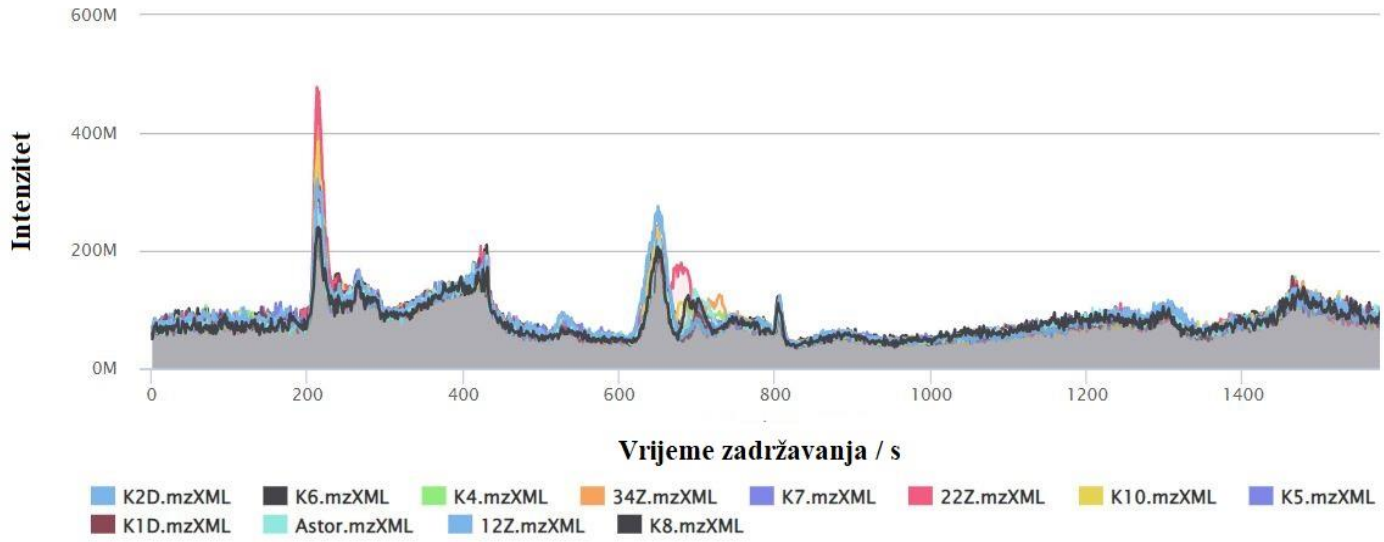
Slika XIII. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta urina azotemičnih pasa s babeziozom i vrijednošću UPC >1 (Skupina C) uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



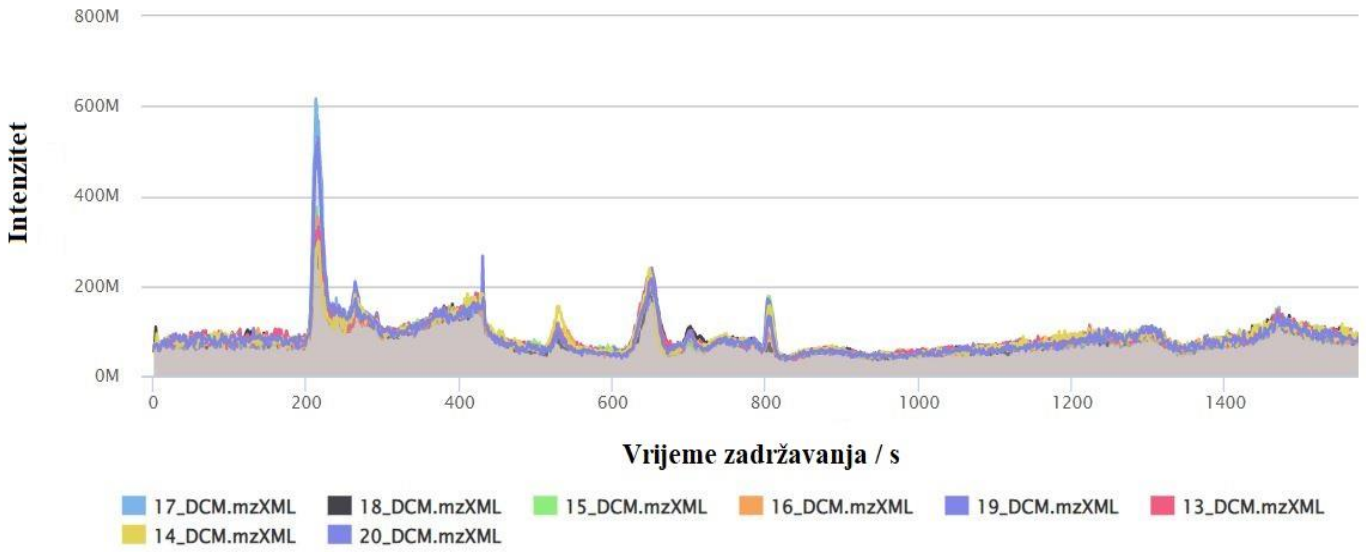
Slika XIV. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta plazme zdravih pasa uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



Slika XV. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta plazme pasa s iDCM-om uz pozitivnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



Slika XVI. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta plazme zdravih pasa uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.



Slika XVII. Kromatogram ukupne struje iona u detektoru MS-a ekstrakta plazme pasa s iDCM-om uz negativnu ionizaciju elektroraspršenjem. Prikazan je odnos relativnog intenziteta (y-os) i vremena zadržavanja (x-os) ekstrakta.

§ 10. ŽIVOTOPIS

Ivana Rubić rođena je 9. ožujka 1994. godine u Vinkovcima gdje je od 2000. do 2008. godine pohađala Osnovnu školu „Antun Gustav Matoš“. Od 2008. do 2012. pohađala je Gimnaziju „Matija Antun Reljković“ također u Vinkovcima. Godine 2012. upisala je sveučilišni preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Završetkom sveučilišnog preddiplomskog studija kemije 2015. preselila se u Zagreb gdje je upisala istraživački smjer na diplomskom sveučilišnom studiju Kemije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Krajem 2017. godine volontirala je nekoliko mjeseci na spregnutom sustavu LC-SPE-NMR u Laboratoriju za spektroskopiju NMR kod prof. dr. sc. Predraga Novaka, uz vodstvo stručnog suradnika Ive Habinovec, magistre kemije. Dana 18. lipnja 2018. godine obranila je diplomski rad pod nazivom: „*Važnost aminokiselina Arg295 i Met367 za stabilnost enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kupusa Brassica rapa ssp. pekinensis*“ izrađenog u Laboratoriju za kemijsku biologiju na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi. Nakon obrane diplomskog rada, 2018. godine upisala je poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Iste godine zaposlila se i na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu kao znanstveni novak u svrhu izrade doktorskog rada pod nazivom: „*Metabolomski pristupi u otkrivanju novih biomarkera i dubinska fenotipizacija u bubrežnim i srčanim bolestima u pasa*“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Vladimira Mrljaka. Usavršavala se nepuna tri mjeseca u Glasgow Polyomics Laboratoriju u Škotskoj u području proteomike i metabolomike. Pohađala je EuBIC zimsku školu bioinformatike u Poljskoj, ljetnu školu „omike“ u Lodiju, Italija, te radionicu iz područja metabolomike u Birminghamu u Ujedinjenom Kraljevstvu. Cjelokupan rad za sada je izložen na 11 posterskih priopćenja na inozemnim/domaćim kongresima i konferencijama te je sudjelovala kao autorica/koautorica u izradi 10 publikacija u području metabolomike i proteomike. Govori engleski jezik i posjeduje vozačku dozvolu B kategorije.

Znanstvene publikacije:

Znanstveni i pregledni radovi

*Rubić, Ivana; Burchmore, Richard; Weidt, Stefan; Regnault, Clement; Kuleš, Josipa; Barić Rafaj, Renata; Mašek, Tomislav; Horvatić, Anita; Crnogaj, Martina; Eckersall, Peter David et al. Multi Platforms Strategies and Metabolomics Approaches for the Investigation of Comprehensive Metabolite Profile in Dogs with *Babesia canis* Infection. // International journal of molecular sciences, 23 (2022), 3; 1-26 , doi:10.3390/ijms23031575 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Horvatić, Anita; Gelemanović, Andrea; Pirkić, Boris; Smolec, Ozren; Beer Ljubić, Blanka; Rubić, Ivana; Eckersall, Peter David; Mrljak, Vladimir; McLaughlin, Mark; Samardžija, Marko; Lipar, Marija Multi-Omics Approach to Elucidate Cerebrospinal Fluid Changes in Dogs with Intervertebral Disc Herniation. // International journal of molecular sciences, 22 (2021), 21; 11678, 23, doi:10.3390/ijms222111678 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Kuleš, Josipa; Rubić, Ivana; Beer Ljubić, Blanka; Bilić, Petra; Barić Rafaj, Renata; Brkljačić, Mirna; Burchmore, Richard; Eckersall, David; Mrljak, Vladimir. Combined Untargeted and Targeted Metabolomics Approaches Reveal Urinary Changes of Amino Acids and Energy Metabolism in Canine Babesiosis With Different Levels of Kidney Function. // Frontiers in microbiology, 12 (2021), 2596, 21, doi:10.3389/fmicb.2021.715701 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Muñoz-Prieto, Alberto; Rubić, Ivana; Horvatic, Anita; Rafaj, Renata Baric; Cerón, José Joaquín; Tvarijonaviciute, Asta; Mrljak, Vladimir. Metabolic profiling of serum from dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. // Research in Veterinary Science, 138 (2021), 161-166, doi:10.1016/j.rvsc.2021.06.011 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Muñoz-Prieto, Alberto; Rubić, Ivana; Horvatić, Anita; Rafaj, Renata Barić; Cerón, José Joaquín; Tvarijonaviciute, Asta; Mrljak, Vladimir Evaluation of Changes in Metabolites of Saliva in Canine Obesity Using a Targeted Metabolomic Approach. // Animals, 11 (2021), 9; 2501, 10, doi:10.3390/ani11092501 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Muñoz-Prieto, Alberto; Escribano, Damián; Horvatić, Anita; Contreras-Aguilar, María Dolores; Bernal, Luis; Rubić, Ivana; Cerón, José Joaquín; Dąbrowski, Roman; Mrljak, Vladimir. Changes in salivary proteins can reflect beneficial physiological effects of ejaculation in the dog. // Theriogenology,

164 (2021), 51-57, doi:10.1016/j.theriogenology.2021.01.017 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Muñoz-Prieto, Alberto; González-Arostegui, Luis Guillermo; Rubić, Ivana; Cerón, José Joaquín; Tvarijonaviciute, Asta; Horvatić, Anita; Mrljak, Vladimir. Untargeted metabolomic profiling of serum in dogs with hypothyroidism. // Research in Veterinary Science, 136 (2021), 6-10, doi:10.1016/j.rvsc.2021.01.023 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Maity, Sudipa; Rubić, Ivana; Kuleš, Josipa; Horvatić, Anita; Đuričić, Dražen; Samardžija, Marko; Beer Ljubić, Blanka; Turk, Romana; Gračner, Damjan; Maćešić, Nino et al. Integrated Metabolomics and Proteomics Dynamics of Serum Samples Reveals Dietary Zeolite Clinoptilolite Supplementation Restores Energy Balance in High Yielding Dairy Cows. // Metabolites, 11 (2021), 12; 842, 19, doi:10.3390/metabo11120842 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

*Kuleš, Josipa; Bilić, Petra; Horvatić, Anita; Kovačević, Alan; Guillemin, Nicolas; Ljubić, Blanka Beer; Galan, Asier; Jović, Ines; Torti, Marin; Rubić, Ivana et al. Serum proteome profiling in canine chronic valve disease using a TMT-based quantitative proteomics approach. // Journal of Proteomics, 223 (2020), 103825, 9, doi:10.1016/j.jprot.2020.103825 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Drugi radovi u časopisima

*Kuleš, Josipa; Lovrić, Lea; Gelemanović, Andrea; Beer Ljubić, Blanka; Rubić, Ivana; Bujanić, Miljenko; Konjević, Dean. Complementary liver and serum protein profile in wild boars infected by the giant liver fluke Fascioloides magna using tandem mass tags quantitative approach. // Journal of Proteomics, 247 (2021), 104332, 10 (međunarodna recenzija, članak, ostalo)

Sažeci sa skupova

Sažeci u zbornicima i časopisima

* Kuleš, Josipa; Rešetar Maslov, Dina; Beletić, Anđelo; Farkaš, Vladimir; Rubić, Ivana; Gelemanović, Andrea; Bačić, Goran; Maćešić, Nino; Barić Rafaj, Renata; Benić, Miroslav; Mrljak, Vladimir. High-throughput TMT-based proteomics for cow's milk proteome characterization and detection of early protein biomarkers in mastitis. // Abstract booklet, Leipzig, Njemačka, 2022. str. 158-159 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

*Muñoz Prieto, Alberto; González Aróstegui, Luis Guillermo; Rubic, Ivana; Cerón Madrigal, José Joaquín; Tvarijonaviciute, Asta; Horvatić, Anita; Mrljak, Vladimir. Serum metabolomic changes in canine hypothyroidism. // Southern European Veterinary Conference-SEVC 2021 ONLINE virtualno, 2021. str. Endocrinology-/ (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

*Kuleš, Josipa; Rubić, Ivana; Gelemanović, Andrea; Leisewitz, Andrew; Mrljak, Vladimir. Serum proteome profiling in canine babesiosis using a label-based quantitativeproteomics approach. // Proceedings of the "Advances in Biomedical Research IV" / Štagljar, Igor ; Radman, Miroslav ; Merćep, Mladen (ur.). Split: MedILS - Mediterranean institute for life sciences, 2021. str. 40-40 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

*Rubić, Ivana; Beer Ljubić, Blanka; Novak, Predrag; Mikulandra, Ivana; Mrljak, Vladimir. STUDY OF SERUM METABOLOME IN DOGS WITH BABESIA CANIS INFECTION BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. // Adriatic NMR Conference 2019 : Book of abstracts / Namjesnik, Danijel ; Novak, Predrag ; Parlov Vuković, Jelena (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 2019. str. 60-60 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

*Habinovec, Iva; Novak, Predrag; Pičuljan, Katarina; Jednačak, Tomislav; Rubić, Ivana; Mikulandra, Ivana; Grgičević, Ivan; Bukvić Krajačić, Mirjana; Gubensäk, Nina; Zangger, Klaus. Impurity profiling of azithromycin conjugates by LC-SPE/CRYO NMR methodology. // Adriatic NMR Conference 2018 : Book of abstracts / Bregović, Nikola ; Namjesnik, Danijel ; Novak, Predrag ; Pičuljan, Katarina (ur.). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 2018. str. 58-58 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Druga sudjelovanja na skupovima

*Rešetar Maslov, Dina; Kuleš, Josipa; Rubić, Ivana; Beletić Anđelo; Beer LJubić, Blanka; Mrljak, Vladimir; Torti, Marin. Analysis of proteomic changes during myxomatrous degenerative changes of mitral valve in dogs. // PROTEOMIC FORUM | EuPA 2022, XIV Annual Congress of the European Proteomic Association, Leipzig, Germany, 2022. str. 160-160 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

* Rubić, Ivana; Kuleš, Josipa; Barić Rafaj, Renata; Mrljak, Vladimir. Targeted metabolomics approach for investigation of the metabolome in dogs infected with Babesia canis. // Advances in Biomedical Research IV MedILS - Mediterranean institute for life sciences, Split, Hrvatska, 2021. str. 38-38 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

*Rubić, Ivana; Horvatić, Anita; Kovačević, Alan; Barić Rafaj, Renata; Bilić, Petra; Jović, Ines; Kuleš, Josipa; Mrljak, Vladimir. Untargeted metabolomic profiling of plasma from dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. // 45TH WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS Varšava, Poljska (online se održao kongres), 2021. str. 90-90 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

*Renata Barić Rafaj, Nada Kučer, Andrea Gelemanović, Ivana Rubić, Josipa Kuleš. Proteomic Profiling In Multicentric Canine Lymphoma. // International Conferences on Science and Technology, Life Science and Technology ICONST LST 2021 Crna Gora, 2021. (poster, međunarodna recenzija, neobjavljeni rad, ostalo)

*Rubić, Ivana; Horvatić, Anita; Gotić, Jelena; Barić Rafaj, Renata; Mrljak, Vladimir. METABOLOMIC ANALYSIS OF SERUM SAMPLES IN CANINE BABESIOSIS BY UHPLC-MS. // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 2020. str. 126-126 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

*Rubić, Ivana; Horvatić, Anita; Burchmore, Richard; Regnault, Clement; McGill, Suzanne; Monteiro, Ana; Gotić, Jelena; Barić Rafaj, Renata; Mrljak Vladimir. Study of serum metabolom in canine babesiosis by mass spectrometry. // 13th Central and Eastern European Conference, Ustroń, Poljska, 2019. str. 63-63 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Ocjenski radovi

Diplomski radovi (uključujući i diplomske radove starog programa)

*Rubić, Ivana, Važnost aminokiselina Arg295 i Met367 za stabilnost enzima auksin-amidohidrolaze BrILL2 iz kupusa Brassica rapa ssp. pekinensis., 2018., diplomski rad, diplomski, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska. (https://www.bib.irb.hr/943485)

*Rubić, Ivana, Djelovanje anestetika na transmembranske ionske kanale., 2015., diplomski rad, preddiplomski, Odjel za kemiju, Osijek