

# Proteomska analiza likvora u pasa s hernijacijom intervertebralnog diska

---

Starčević, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:896578>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Andrea Starčević

Proteomska analiza likvora u pasa s hernijacijom intervertebralnog diska

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Klinika za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: prof. dr. sc. Dražen Vnuk

Mentori: izv. prof. dr. sc. Ozren Smolec

doc. dr. sc. Anita Horvatić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Josipa Kuleš
2. doc. dr. sc. Anita Horvatić
3. izv. prof. dr. sc. Ozren Smolec
4. doc. dr. sc. Marko Pećin (zamjena)

## ZAHVALA

Veliko hvala mojim mentorima izv. prof. dr. sc. Ozrenu Smolecu i doc. dr. sc. Aniti Horvatić na vođenom mentorstvu, dostupnosti, trudu te iznimnoj angažiranosti kroz cijeli proces izrade ovog diplomskog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji! Roditeljima, Darku i Ivi te najdražoj sestri Tamari koji su mi tijekom cijelog mog studiranja bili enormna podrška i oslonac te bez kojih ovo ne bi bilo moguće. Bili ste uz mene uvijek, slavili sa mnom pobjede i bodrili me kada bih prolazila i kroz padove.

Neizmjereno Vam hvala na svemu! Također, hvala i mom dečku Dariu te svim mojim prijateljima koji su svatko na svoj način doprinijeli završetku mog studija.

## POPIS KRATICA

AF - (lat. *annulus fibrosus*), vezivnotkivni prsten

ANNPE – (engl. *acute non-compressive nucleus pulposus extrusion*), akutna nekompresivna ekstruzija *nucleus pulposus*

CNS – (engl. *central nervous system*), središnji živčani sustav

COMP – (engl. *cartilage oligomeric matrix protein*), hrskavični oligomerni matriksni protein

CSF – (engl. *cerebrospinal fluid*), cerebrospinalna tekućina

CT - (engl. *computed tomography*), kompjuterizirana tomografija, dijagnostička metoda

DEEH – (engl. *disc extrusion with extensive hemorrhage*), ekstruzija diska s ekstenzivnim epiduralnim krvarenjem

EP – (engl. *endplate*), hrskavična završna ploča

FDR – (engl. *false discovery rate*), postotak krivih očitavanja

GLUT1 – prijenosnik glukoze 1

H – hondrodistrofične pasmine

HNPE – (engl. *hydrated nucleus pulposus extrusion*), ekstruzija hidriranog *nucleus pulposus*

Ig - imunoglobulini

IIVDE – (engl. *intradural/intramedullary intervertebral disc extrusion*), intraduralna/intramedularna ekstruzija intervertebralnog diska

IVD – (engl. *intervertebral disc*), intervertebralni disk

IVDD – (engl. *intervertebral disc disease*), bolest intervertebralnog diska

IVDE – (engl. *intervertebral disc extrusion*), ekstruzija intervertebralnog diska

IVDH – (engl. *intervertebral disc herniation*), hernijacija intervertebralnog diska

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

MMP-9 – matriks metaloproteinaza-9

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

NCE – normalizirana energija sudara

NH – nehondrodistrofične pasmine

NP – (lat. *nucleus pulposus*), želatinozna jezgra

PON1 – paraoksonaza 1

TL – torakolumbalno

TMT – (engl. *tandem mass tag*)

TZ – (engl. *transitional zone*), tranzicijska zona

μL – mikrolitri

## POPIS PRILOGA

### Popis tablica:

Tablica 1. Tablični prikaz različito eksprimiranih proteina

Tablica 2. Rezultati aktivnosti PON1

### Popis slika:

Slika 1. Vezani sustav Dionex UltiMate 3000 RSLCnano i spektrometar masa Q Exactive Plus na kojem je provedena proteomska analiza (Autorska slika).

Slika 2. Desno orijentirana akutna ekstruzija intervertebralnog diska T13-L1 (Autorska slika).

Slika 3. Grafički prikaz (engl. *Volcano plot*) različito eksprimiranih proteina u likvoru pasa s IVDH u odnosu na zdrave pse. Plavo su označeni proteini manje, a crveno više eksprimirani u likvoru pasa s IVDH. Sivo su označeni proteini koji nisu statistički značajni.

Slika 4. Rezultati genske ontologije (Biološki proces – BP) različito eksprimiranih proteina u likvoru pasa s IVDH u odnosu na zdrave pse dobiveni koristeći alat PANTHERdb uz pripadajuću legendu.

Slika 5. Molekulski procesi na koje utječe IVDH. Izdvojeni su različito eksprimiranim proteinima koji sudjeluju u pripadajućim procesima (crveno više eksprimirani u skupini pasa s IVDH, a plavo u kontrolnoj skupini)

Slika 6. Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) u likvoru zdravih pasa (kontrola) i pasa s IVDH

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. ANATOMIJA ŽIVČANOG SUSTAVA.....	3
2.1. Meninge .....	3
2.1.1. Dura mater .....	4
2.1.2. Arachnoidea mater .....	4
2.1.3. Pia mater .....	5
3. GRAĐA INTERVERTEBRALNOG DISKA .....	6
4. DEGENERACIJA INTERVERTEBRALNOG DISKA .....	8
5. HERNIJACIJA INTERVERTEBRALNOG DISKA .....	9
6. CEREBROSPINALNI LIKVOR.....	11
6.1. Stvaranje likvora .....	11
6.2. Cirkulacija i apsorpcija .....	12
6.3. Sastav likvora.....	13
6.3.1. Ukupan broj eritrocita i bijelih krvnih stanica .....	13
6.3.2. Diferencijalni broj stanica.....	13
6.3.3. Biokemijski sastav .....	14
6.4. Prikupljanje likvora.....	15
6.5. Analiza likvora.....	16
6.6. Karakteristike likvora kod bolesti .....	16
6.6.1. Fizikalne karakteristike .....	16
6.6.2. Citologija.....	17
6.6.3. Proteini.....	17
6.6.4. Enzimi .....	18
6.6.5. Neurotransmitori .....	18
6.6.6. Laktična kiselina .....	18
7. PROTEOMIKA U VETERINARSKOJ MEDICINI.....	19
7.1. Dosadašnja proteomska istraživanja IVDH .....	19
8. MATERIJALI I METODE.....	21
8.1. Proteomska analiza .....	22
9. REZULTATI.....	25
10. RASPRAVA .....	31
11. ZAKLJUČCI.....	34
12. LITERATURA .....	35
13. SAŽETAK .....	44
14. SUMMARY .....	45
15. ŽIVOTOPIS.....	46

## 1. UVOD

Hernijacija intervertebralnog diska važna je i česta patologija kako u ljudi, tako i u pasa. Uz degeneraciju intervertebralnog diska smatra se jednim od glavnih uzroka akutne i kronične boli donjeg dijela leđa. Razni su etiološki uzroci, koji uključuju traume, infekcije, degeneracije diska te anatomske odnosno razvojne anomalije (BUREŠ i sur., 2022). Dosadašnji modeli su uglavnom uključivali umjetno prouzrokovane patologije diska kojima nedostaje sličnosti s ljudskom patologijom. Psi sa spontanom pojavom patologija diska predstavljaju najadekvatniji translacijski model za biomehanička istraživanja i kirurške zahvate kralježnice (MONCHAUX i sur., 2017). U pasa su bolesti povezane s hernijacijom intervertebralnog diska najčešći razlog ozljeda kralježnične moždine i senzornih deficita (BERGKNUT i sur., 2012).

Eksperimentalni životinjski modeli ključni su za razumijevanje degenerativnih bolesti kralježnice, a upravo su se psi pokazali kao najoptimalniji translacijski model za biomehanička istraživanja i kirurške procedure ove problematike (THOMPSON i sur., 2018).

Pseći intervertebralni disk (IVD) je elastična struktura koja se opire kompresiji kralježnice, jednakomjerno raspoređuje teret na kralješke i omogućuje joj ograničene pokrete (ADAMS i ROUGHLEY, 2006.). Zdravi disk građen je od vezivotkivnog prstena (*annulus fibrosus*) koji je bogat kolagenom tipa I i proteoglikanima bogate želatinozne jezgre (*nucleus pulposus*). Budući je intervertebralni disk avaskularan, za prehranu je odgovorna hrskavična završna ploča (THOMPSON i sur., 2018).

Starenje, kao i različiti okolišni čimbenici čine IVD osjetljivim na mehaničku i kemijsku degeneraciju (LIU i sur., 2019). Hernijacija IVD-a u pasa često uzrokuje ozljedu kralježnične moždine, a intenzitet neuroloških znakova ovisi o anatomskej lokaciji te o trajanju kompresije i količini kompresijskog materijala (FORTERRE i sur., 2010.). Patofiziološki procesi koji su povezani s hernijacijom IVD-a su i dalje nedovoljno istraženi, posebice na molekularnoj razini.

Proteomika je grana biomedicinske znanosti, a uključuje primjenu tehnologija koje identificiraju i kvantificiraju ukupne proteine koji su prisutni u stanici, tkivu ili organizmu (BILAL i sur., 2017). Proteomska analiza je napredna metoda kojom se proteini dokazuju u raznim biološkim materijalima kao što su cerebrospinalna tekućina, serum, urin te slina u bolesnih i zdravih životinja (BAKA i sur., 2021).



„Shotgun“ kvantitativna proteomika koja se zasniva na primjeni TMT (engl. *Tandem Mass Tag*) omogućuje multipleksiranje, odnosno analizu do šesnaest uzoraka istovremeno (HORVATIĆ i sur., 2019). Za razliku od proteomike, metabolomika se koristi za otkrivanje metabolomičkih panela budući da su metaboliti uobičajeni intermedijeri i krajnji proizvodi složenih biokemijskih kaskada koje povezuju genom, transkriptom i proteom s fenotipom. Primjena raznih bioinformatičkih alata zajedno s proteomikom temeljenoj na masenoj spektrometriji visoke razlučivosti i metabolomikom važan su alat u proučavanju patofizioloških procesa u središnjem živčanom sustavu, a za analizu se koriste biološke tekućine kao što je cerebrospinalna tekućina (HORVATIĆ i sur., 2021). Sastav likvora i njegov tlak održavaju se relativno konstantnima različitim mehanizmima. Obzirom da je cerebrospinalni likvor pokazatelj trenutnog stanja središnjeg živčanog sustava njegova analiza omogućuje direktnu procjenu upalnih procesa kod neurodegenerativnih bolesti (HRISHI i SETHURAMAN, 2019).

Iako se sve veći broj istraživanja oslanja na uporabu više vrsta „omika“ (engl. *multi omics*) još uvijek prevladava uporaba samo jedne takve metode. Korištenje nekolicine „omika“ omogućuje detaljniji uvid u zbivanja na molekularnoj razini prilikom patofizioloških procesa (VITRINEL i sur., 2019). U ovom istraživanju, upotrijebljene su integrativna proteomska analiza bazirana na masenoj spektrometriji visoke rezolucije i neciljana metabolomska analiza kako bi se dobio jasniji uvid u promjene koji se javljaju tijekom hernijacije intervertebralnog diska u pasa, uz praćenje patofizioloških procesa na razini proteina i metabolita.

Kako ne postoji „zlatni standard“ za integraciju proteomskih i metabolomskih podataka, dizajniran je klasifikacijski model za identificiranje većine važnih značajki i uz korištenje alata za rudarenje podataka, otkrivanje važnih putova zahvaćenih ovom degenerativnom bolešću. Poseban fokus stavljen je na utvrđivanje najdosljednijih značajke za otkrivanje potencijalnih biomarkera kod kompresije leđne moždine, kao i utjecaj promjena u likvoru na SŽS i vitalne funkcije. Razumijevanje pacijentova jedinstvenog profila na molekularnoj razini i zahvaćenih putovi mogli bi pomoći u poboljšanju dijagnosticirati ovu bolest i odabrati specifične tretmane za postizanje najboljeg ishoda.

U poboljšanju dijagnosticiranja ove bolesti i specifičnog liječenja, važno je razumijevanje pacijentovog molekularnog profila (HORVATIĆ i sur., 2021).

## 2. ANATOMIJA ŽIVČANOG SUSTAVA

Živčani sustav građen je od živčanih stanica ili neurona, čija citoplazma ima različit broj izdanaka. Dendriti su obično višestruki izdanci i prenose impulse prema staničnom tijelu, a akson (neurit) je uvijek jedan na svojem početku, a prenosi impulse od staničnog tijela. (KÖNIG i LIEBICH, 2004). Neurone u položaju drže glija stanice koje pomažu i u ishrani neurona, održavaju elektrokemijsku stabilnost i sudjeluju u nespecifičnoj obrani mozga. Živčana vlakna koja provode impulse od periferije prema središnjem živčanom sustavu su aferentna vlakna, a eferentna vlakna provode impulse od središnjeg živčanog sustava prema periferiji. Živčani sustav se dijeli na središnji i periferni živčani sustav. Središnji živčani sustav čine mozak i kralježnična moždina. Mozak je smješten u lubanjskoj šupljini, a kralježnična moždina leži u kralježničnom kanalu. Središnji živčani sustav je kostima zaštićen od mehaničkog djelovanja, dok ga cerebrospinalna tekućina štiti od pritiska i udara. Mozak i kralježnična moždina građeni su od bijele moždane tvari (*substantia alba*) koju čine glija stanice i mijelinizirani aksoni te sive tvari (*substantia grisea*) koju čine neuroni.

Prema anatomskom izgledu mozak se dijeli na veliki mozak (*cerebrum*), mali mozak (*cerebellum*) te moždano deblo (*truncus encephali*) kojeg čine produžena moždina (*medulla oblongata*), most (*pons*) i srednji mozak (*mesencephalon*). Kralježnična moždina se može podijeliti na segmente na temelju spinalnih živaca od kojih je svaki par zadužen za inervaciju jednog dijela tijela. Periferni živci se dijele na cerebrospinalne živce i ganglije te autonomne živce i ganglije. Cerebrospinalni živci i gangliji povezuju središnji živčani sustav s osjetnim organima i skeletnim mišićjem dok autonomni živci i gangliji povezuju središnji živčani sustav s utrobom i cirkulacijskim sustavom. (KÖNIG i LIEBICH, 2004).

### 2.1. Meninge

Mozak i leđnu moždinu okružuju vezivnotkivne ovojnice koje se nazivaju meninge. To su tvrda ovojnica ili dura mater (*pachymeninx*) te meka ovojnica (*leptomeninges*) koju čine paučnica (*arachnoidea*) i nježna ovojnica (*pia mater*). Ovojnice štite mozak, a njihove arterije uz mozak hrane i kralježničnu moždinu, moždane živce te njihove korijene (KOŽIĆ, 2021).

### 2.1.1. Dura mater

Kranijalna dura mater (*dura mater encephali*) je ovojnica koja je smještena najviše površinski i sastoji se od 2 sloja: vanjskog periostealnog sloja koji priliježe najbliže svodu lubanjske šupljine i unutarnjeg meningealnog sloja koji leži najbliže moždanom tkivu. Te karakteristike čine duru debelom, tvrdom i fibroznom membranom koja je prilično neelastična. Periostealni sloj sastoji se od fibroblasta i osteoblasta s velikom količinom ekstracelularnog kolagena u intracelularnom prostoru dure dajući joj čvrstoću (GHANNAM i KHARAZI, 2023). Dura tvori snažne nabore koji se projiciraju prema lubanjskoj šupljini, a to su *falx cerebri*, *tentorium cerebelli membranaceum* (šator malog mozga), *falx cerebelli* i *diaphragma sellae*. Srpoliki nabor, *falx cerebri* najveći je i razdvaja moždane polutke, a *tentorium cerebelli membranaceum* odvaja mali mozak od velikog mozga. *Diaphragma sellae* je nabor u visini turskog sedla koji u sredini ima mali otvor za hipofizni držak (*infundibulum*). *Falx cerebelli* je mali nabor koji se proteže između dvije cerebelarne hemisfere (ADEEB i sur., 2012). U području velikog otvora (lat. *foramen magnum*) meningealni sloj kranijalne dure nastavlja se kao jednoslojna spinalna dura. Ona obavija kralježničnu moždinu, a od vertebralnog periosteuma odvojena je epiduralnim prostorom koji je ispunjen masnim tkivom i sadrži venske pleksuse (WALSH i sur., 2020).

### 2.1.2. Arachnoidea mater

*Arachnoidea* (paučnica) je tanka avaskularna membrana koja naliježe na nutarnju površinu dure mater. Sastavljena je od slojeva stanica koje su povezane čvrstim međustaničnim spojevima (engl. *tight junctions*) stvarajući tako krvno-moždanu barijeru dok stanice pie mater nisu povezane na takav način te su stoga propusne za otopljene tvari (VERKHRATSKY i PIVORIŪNAS, 2023). Između arachnoideje i pije nalazi se subarahnoidalni prostor kroz koji se pružaju brojna tanka vlakna vezivnog tkiva koja povezuju te moždane ovojnice, a zovu se arahnoidne trabekule. Subarahnoidalni prostor mjestimično je proširen, a proširenja se nazivaju subarahnoidalne cisterne (lat. *cisternae subarachnoidales*). Posebno je važna cerebelomedularna cisterna (lat. *cisternae cerebellomedullaris*) zato što se koristi za uzimanje cerebrospinalne tekućine, a lumbalna cisterna je mjesto za izvođenje lumbalne punkcije.

Mjesta apsorpcije cerebrospinalnog likvora su gljivaste resice koje se iz arachnoideje pružaju u venski sinus dure. Ova apsorpcijska mjesta nazivaju se Pacchionijeve granulacije ili arahnoidne granulacije kada su velike (do 1 cm u promjeru) i arahnoidne resice ako su

mikroskopske veličine. Ove strukture djeluju kao jednosmjerni ventili zbog čega CSF može prijeći u vensku krv, ali venska krv ne može ući u CSF (RANSOM, 2017).

### 2.1.3. Pia mater

Najdublja meninga, *pia mater* je nježna, vrlo prokrvljena ovojnica koja je bogato inervirana. Ona leži na bazalnoj membrani glije limitans, od koje je odvojena samo subprijalnim prostorom. Ovaj prostor sadrži snopove kolagena, stanice slične fibroblastima i krvne žile (RANSOM, 2017). Čvrsto naliježe na površinu mozga i kralježnične moždine i potpuno prati njihove obrise. Cerebralna *pia mater* formira ovojnice oko krvnih žila koje ulaze i izlaze iz mozga okomito na meninge, a te ovojnice tvore intersticijski prostor ispunjen tekućinom smješten između stijenki krvnih žila i pije, poznat kao perivaskularni ili Virchow-Robinov prostor (GHANNAM i KHARAZI, 2023).

### 3. GRAĐA INTERVERTEBRALNOG DISKA

Kralježnica je sa svojom složenom građom sposobna za različite funkcije. Za prijenos potiska udova na tijelo tijekom kretanja zaslužna su dva susjedna kralješka s umetnutim hrskavičnim diskom, njihovim spojevima i spojnim ligamentima (KÖNIG i LIEBICH, 2004). Broj kralježaka može varirati ovisno o pasmini i veličini psa, ali većinom iznosi 44 kralješka koji su raspoređeni:

- a) Vratni kralješci (*vertebrae cervicales*) 7
- b) Prsni kralješci (*vertebrae thoracicae*) 12-14
- c) Slabinski (*vertebrae lumbales*) (6) 7
- d) Križni (*vertebrae sacrales*) 3
- e) Repni (*vertebrae caudales*) 20-23

Kralješci su povezani spojevima kralježničnih tijela i sinovijalnim spojevima između zglobnih površina. Međukralježnični diskovi (*disci intervertebrales*) povezuju kranijalne i kaudalne krajeve susjednih kralježaka. Oni su umetnuti između tijela svakog kralješka osim prvog i drugog vratnog kralješka (C1-C2) i sakralnih kralježaka. Gledano kraniokaudalno, cervikalni diskovi su gotovo kružnog oblika, torakalni diskovi su više ovalni, a lumbalni diskovi su graholikog oblika. Torakalni diskovi su uži od cervikalnih i lumbalnih diskova. Kaudalni cervikalni diskovi (C4-C5 i C5-C6) su zajedno s diskovima L2 do L3 najširi, dok su od C2 do C3 i L4 do L5 najuži (BRISSON, 2010). Kranijalnu i kaudalnu površinu intervertebralnog diska čini hrskavična završna ploča. Njena glavna uloga je prijenos i opskrba diska hranjivim tvarima (MAMIĆ i sur., 2020).

Vanjski dio intervertebralnog diska čini vezivnotkivni prsten (*annulus fibrosus*) (AF), tkivo bogato kolagenom, dok je središnje područje IVD-a građeno od želatinozne jezgre (*nucleus pulposus*) (NP) koja je bogata proteoglikanima. AF se sastoji od vanjskog sloja gusto zbijenih kolagenih vlakana u vlaknastom matriksu s uskim unutarnjim slojem vlaknaste hrskavice koji se nalazi uz NP. NP je embrionalni ostatak notokorda koji tvori središnje područje IVD-a (BRISSON, 2010).

Mladi, zdravi diskovi sadrže NP koji je globoidan i želatinast s visokim sadržajem vode, omogućujući disku da funkcionira kao hidroelastični jastuk koji održava njegovu širinu tijekom opterećenja. Histološki je NP odvojen od AF tranzicijskom ili perinuklearnom zonom (TZ).

Vlakna unutarnjeg AF su snažno povezana s hrskavičnim završnim pločama, a vlakna vanjskog AF povezana su s epifizama tijela kralježaka i ona se zovu Sharpeyeva vlakna (BERGKNUT i sur., 2012).

AF je 1,5-2,8 puta deblji ventralno nego dorzalno, što rezultira ekscentričnom lokalizacijom NP unutar intervertebralnog diska. Vjeruje se kako to povećava rizik od ekstruzije ili hernije dorzalno prema vertebralnom kanalu. Nehondrodistrofični psi imaju usku TZ, koja se sastoji od vlaknaste hrskavice, dok je TZ biglova i jazavčara 3 do 4 puta šira od hrtova, neorganizirana je i zauzima najveći dio AF-a. Periferna trećina AF može biti rijetko inervirana dok unutarnji slojevi AF i NP nisu inervirani. Dorzalni longitudinalni ligament koji prekriva IVD je opsežno inerviran te je istezanje i kidanje vanjskog AF i dorzalnog longitudinalnog ligamenta predloženo kao uzrok diskogene boli kod pasa (BRISSON, 2010).

#### 4. DEGENERACIJA INTERVERTEBRALNOG DISKA

Degeneracija IVD-a je složen, višefaktorski proces kojeg karakteriziraju promjene u sastavu stanica i izvanstaničnog matriksa NP, TZ, AF i EP (BERGKNUT i sur., 2012). Degeneracija IVD-a definirana je kao strukturalno oštećenje intervertebralnog diska povezano s abnormalnim ili ubrzanim promjenama koje se zbivaju starenjem (FINGEROTH i THOMAS, 2015). U patogenezi sudjeluju mehanički i biomehanički čimbenici. Starenjem dolazi do promjena u središnjoj jezgri, a karakterizira ih fragmentacija i gubitak proteoglikana. To rezultira smanjenjem sadržaja vode u jezgri zbog čega ona od gelastog tkiva postaje više čvrsto, fibrozno tkivo (VUJČIĆ, 2021). Avaskularna i niskostanična priroda IVD-a i promijenjeni biomehanički uvjeti rezultiraju umanjenom sposobnosti stanica IVD-a za adekvatno popravljavanje matriksa. Tako oslabljeni IVD postaje ranjiv na stresogene faktore koji su inače fiziološki kod zdravog IVD-a (BERGKNUT i sur., 2012).

U hondrodistrofičnih pasmina (H) je starenjem češća pojava hondroidne metaplazije dok je u nehondrodistrofičnih pasmina (NH) učestalija fibrozna metaplazija (HANSEN, 1952). Hondroidnu metaplaziju karakterizira gubitak glikozaminoglikana i povećanje udjela kolagena uz smanjenje udjela vode što dovodi do smanjenja hidroelastičnih svojstava diska i njegove sposobnosti podnošenja pritiska.

Fibrozna metaplazija je degenerativni proces vezan uz dob koji se javlja neovisno o pasmini, ali je češće zabilježena kod nehondrodistrofičnih pasa u starosti od 7 i više godina. Karakterizira ga fibrozna kolagenizacija NP s istodobnom degeneracijom AF i može se pojaviti bilo gdje duž kralježnice. Ovaj degenerativni proces dovodi do ispupčenja NP unutar oslabljenog AF i posljedično dorzalnom IVD protruzijom (BRISSEON, 2010).

## 5. HERNIJACIJA INTERVERTEBRALNOG DISKA

Potpuna ruptura AF s ekstruzijom NP klasificirana je kao Hansen tip 1 (engl. *intervertebral disc extrusion*, IVDE) dok je djelomična ruptura AF s određenim stupnjem protruzije AF klasificirana kao Hansen tip 2 (engl. *intervertebral disc disease*, IVDD) (HANSEN, 1952).

### HANSEN TIP I

U slučaju Hansen tip I hernijacije, razlikuje se nekoliko podtipova. Podtipovi 1 i 2 podrazumijevaju kraću disperziju ekstrudiranog materijala degeneriranog *nucleus pulposus* u kanal kralježnične moždine, akutnog su do sporo progredirajućeg nastanka i najčešće se javljaju u hondrodistrofičnih pasmina pasa (HEBLINSKI i SCHMÖKEL, 2018).

Ekstruzija diska s ekstenzivnim epiduralnim krvarenjem (engl. *disk extrusion with extensive hemorrhage* – DEEH) nazvana je sukladno kliničkoj manifestaciji. Nastaje perakutno do akutno s težim simptomima koji uključuju paraparezu koja brzo progredira do paraplegije s jakom boli (FENN i OLBY, 2020).

Uz navedene Hansen tip I oblike, unutar te grupe razlikuje se i Hansen tip 3, koji se u literaturi još naziva i akutna ekstruzija intervertebralnog diska nedegeneriranog *nucleus pulposus* čiji je uzrok najčešće trauma (BUREŠ i sur., 2022). Unutar akutne ekstruzije intervertebralnog diska razlikuju se dva podtipa: akutna nekompresivna ekstruzija *nucleus pulposus* (engl. *acute non-compressive nucleus pulposus extrusion*, ANNPE) te intraduralna/intramedularna ekstruzija intervertebralnog diska (engl. *intradural/intramedullary intervertebral disc extrusion*, IIVDE) (DE RISIO, 2015).

Sljedeća varijacija IVDE-a je ekstruzija hidriranog *nucleus pulposus* (engl. *hydrated nucleus pulposus extrusion*, HNPE) koji se najčešće dijagnosticira u cervikalnom području kralježnice. Histološki je vidljiva blaga degeneracija *nucleus pulposus*, akutnog je do perakutnog nastanka te je najčešće bezbolan oblik ekstruzije (HEBLINSKI i SCHMÖKEL, 2018). U Hansen tip I ubraja se i ekstruzija intervertebralnog diska daleko-lateralno (*far-lateral intervertebral disc extrusion*), pri čemu dolazi do ekstruzije intervertebralnog diska lateralno



što stvara kompresiju na korijen živca i živac koji prolazi kroz *foramen intervertebrale* (BUREŠ i sur., 2022).

## HANSEN TIP II

Hansen tip II koji se u recentnijoj veterinarskoj literaturi sve više naziva protruzija intervertebralnog diska, odnosi se na djelomičnu rupturu i dorzalno bujanje *anulus fibrosus* međukralježničnog diska (HEBLINSKI i SCHMÖKEL, 2018). Klinička prezentacija ovisi o lokaciji zahvaćenog IVD i stupnju kompresije struktura kao što su kralježnična moždina i korijeni živaca. Klinički znakovi su uglavnom kronični, sporo progresivni s blažim neurološkim deficitima nego oni kod akutne ozljede kralježnične moždine zbog IVD ekstruzije (MACIAS i sur., 2002).

IVD protruzija se javlja uz druga degenerativna stanja kralježnice kao što su spondilitična cervikalna mijelopatija povezana s diskom i degenerativna lumbosakralna stenoza te je vjerojatno kako se nuklearna degeneracija i anularna protruzija javljaju kao dio multifaktorijalne etiologije (FENN i OLBY, 2020). Protrudirani materijal je obično gladak, čvrst i zaobljen te rijetko pričvršćen za duru mater. Nije prisutno krvarenje, a vanjski AF i dorzalni longitudinalni ligamenti su intaktni. Iako su Hansenove postmortem studije sugerirale da dolazi do ekstruzije tipa I češće u hondrodistrofičnih pasmina i da se izbočine tipa II češće javljaju obično u nonhondrodistrofičnih pasmina, novija istraživanja su pokazala da 62% do 92% nehondrodistrofičnih pasa težih od 20 kg s torakolumbalnom (TL) IVD hernijacijom doživljava nuklearnu ekstruziju za razliku od anularne protruzije. Hondrodistrofični psi također mogu razviti prstenasti Hansen tip II izbočine, ali to čine rjeđe (BRISSEON, 2010).

## 6. CEREBROSPINALNI LIKVOR

Cerebrospinalni likvor (cerebrospinalna tekućina) je tekućina koja ispunjava klijetke, središnje kanale i subarahnoidalne prostore. To je bezbojna, bistra tekućina s malo stanica i proteina koja uz određene razlike ima ionski sastav sličan plazmi (KNEŽEVIĆ, 2020). Cerebrospinalni likvor ima 4 glavne funkcije:

- 1.) Fizička potpora neuralnih stuktura
- 2.) Ekskrecija
- 3.) Intracerebralni transport
- 4.) Kontrola kemijskog okoliša središnjeg živčanog sustava

Također ima i zaštitnu funkciju budući da se volumen likvora mijenja recipročno s volumenom intrakranijalnog sadržaja, konkretno krvi (VERNAU i sur., 2008). Cerebrospinalna tekućina održava homeostazu kemijskog okoliša potrebnog za moždane stanice unatoč stalnoj promjeni koncentracije određenih supstrata u plazmi. Sudjeluje u ekskreciji neželjenih metaboličkih produkata i djeluje kao intracerebralni prijenosnik neurotransmitera.

Krvno-moždanu barijeru tvore endotelne stanice i intraparenhimalne kapilare, a sam kapilarni endotel u mozgu i produženoj moždini razlikuje se od onog u ostatku tijela jer nema fenestre, susjedne stanice su čvrsto povezane (eng. *tight junctions*; lat. *zonula occludens*), niži je broj pinocitotičnih vezikula, a veći broj mitohondrija. Te karakteristike čine kapilarni endotel selektivno propusnim (WOLBURG i LIPPOLDT, 2002).

### 6.1. Stvaranje likvora

Koroidni pleksus stvara većinu cerebrospinalnog likvora, a manji dio izlučuju endim, pija, arahnoida i moždane kapilare (KNEŽEVIĆ, 2020). Endotel kapilara koroidnog pleksusa nema čvrste međustanične spojeve, nego je fenestriran, što omogućuje filtraciju tekućine u stromu koroidnog pleksusa, iz koje se potom odabrani sastojci aktivno transportiraju preko epitelnih stanica u ventrikularni sustav, stvarajući likvor. Koroidni pleksus nalazi se u parnim lateralnim ventrikulima, trećem i četvrtom ventrikulu. Likvor se stvara relativno konstantno, a tvorba je izravno povezana sa stupnjem izmjene natrija koji je povezan s bikarbonatnim ionom. Enzim ugljična anhidraza važan je zbog toga što pomaže nastajanju bikarbonata, a njegova

inhibicija usporava tok natrija, bikarbonata i klorida što rezultira smanjenjem sekrecije likvora (BROWN i sur., 2004). U prvoj fazi plazma se pasivno filtrira preko fenestriranog kapilarnog endotela u koroidalni intersticijski prostor zbog gradijenta osmotskog tlaka između dviju površina. Ultrafiltrat se zatim podvrgava aktivnom transportu kroz koroidalni epitel u ventrikularne prostore (KHASAWNEH i sur., 2018).

Stvaranje likvora je aktivan proces na koji ne utječe intrakranijalni tlak. U uravnoteženim fiziološkim uvjetima, brzina stvaranja likvora mora biti jednaka brzini apsorpcije. Pretpostavlja se kako bi se to moglo proširiti na brzinu protoka, s obzirom na to da se stvaranje i apsorpcija odvijaju u različitim odjeljcima sustava. Sukladno tome, smatra se da je lučenje likvora pokretačka snaga protoka i cirkulacije kako bi postojao stabilan volumen likvora (OREŠKOVIĆ i KLARICA, 2010).

Zbog inkonzistentnosti klasične teorije, nastaje nova koja ima sustavniji pristup, prebacuje pozornost na Virchow-Robinove prostore (također poznate kao perivaskularni prostori), koji postoje između mjesta gdje se cerebralna vaskulatura spušta iz subarahnoidalnog prostora u CNS, perforirajući *pia mater* (KHASAWNEH i sur., 2018). Upravo na tom spoju dolazi do stvaranja i apsorpcije intersticijske tekućine i CSF-a zbog razlika hidrostatskog i osmotskog tlaka između cirkulacijskog sustava CSF-a i okolnog tkiva. To bi značilo da se CSF kontinuirano proizvodi kroz cijeli cirkulacijski put, a ne u lokaliziranim sekretornim organima, a sve promjene u volumenu CSF-a su pod utjecajem osmolarnosti CSF-a.

Aktivno izlučivanje i apsorpciju likvora provode pokretne cilije smještene u stijenci endodima (SPECTOR i sur., 2015). CSF uključuje transport čimbenika rasta u određena područja mozga u krvožilnom sustavu (SOYTÜRK i sur., 2021).

## 6.2. Cirkulacija i apsorpcija

Likvor cirkulira s mjesta nastanka do mjesta apsorpcije. Iz lateralnih ventrikula ulazi kroz parne interventrikularne otvore (lat. *foramina Monroi*) u treći ventrikul, a zatim kroz moždani akvedukt (lat. *aqueductus Sylvii*) u četvrti ventrikul. Većina likvora izlazi iz četvrtog ventrikula u subarahnoidni prostor dok mala količina može ući kroz središnji kanal kralježnične moždine (BRINKER i sur., 2014). Protok likvora iz subarahnoidalnog prostora ovisi o hidrostatskom tlaku, a pulzacije moždanih arterija, respiratorni pokreti i pokreti mozga i kralježnične moždine dodatno pridonose cirkulaciji cerebrospinalne tekućine (KNEŽEVIĆ,

2020). Uz primarno mjesto apsorpcije, apsorpcija je moguća kroz limfatične kanale u duru te kroz perineuralne ovojnice kranijalnih i spinalnih živaca.

Likvor se iz subarahnoidnog prostora na kraju reapsorbira preko arahnoidalnih granulacija u venske sinuse. Intrakranijski arahnoidalni viliji smješteni su unutar duralnog zida koji stvara superiorni sagitalni sinus, a spinalni arahnoidalni viliji nalaze se u duralnom zidu koji čini sinusoidne uz dorzalne spinalne živčane korijenove (KNEŽEVIĆ, 2020).

Likvor koji se ne reapsorbira kroz arahnoidne granulacije može doći do cervikalnih limfnih žila kroz dva potencijalna puta. Prvi je duž subarahnoidnog prostora izlaznih kranijalnih živaca, a drugi je putem Virchow-Robinovog prostora. Istraživanja su opisala i reapsorpciju CSF u duralni venozni plexus (KHASAWNEH i sur., 2018).

### 6.3. Sastav likvora

#### 6.3.1 Ukupan broj eritrocita i bijelih krvnih stanica

Likvor normalno ne sadrži eritrocite, a njih nalaz je većinom uzrokovan traumom iglom ili potječe od patološkog krvarenja (DI TERLIZZI i PLATT, 2009). Normalan broj bijelih krvnih stanica u pasa je 0-2 stanice/ $\mu\text{L}$ , dok su 3 stanice/ $\mu\text{L}$  upitno abnormalne, a 4 stanice/ $\mu\text{L}$  definitivno abnormalne. U mačaka normalan raspon iznosi 0-2 stanice/ $\mu\text{L}$ , a 3 ili više stanica je abnormalan nalaz (VERNAU i sur., 2008).

#### 6.3.2. Diferencijalni broj stanica

Varijabilan broj malih leukocita i monocita se nalazi u normalnom likvoru, a njihov broj ovisi o starosti i vrsti (DI TERLIZZI i PLATT, 2009). Rijetki neutrofilni mogu biti normalan nalaz, dok eozinofili uglavnom nisu prisutni u normalnom likvoru (WINDSOR i sur., 2009). Mali limfociti su najčešći tip stanica u normalnom likvoru pasa, dok prisutnost srednje velikih i velikih limfocita može upućivati na postojanje patološkog procesa (CHRISMAN, 1992). Veliki pjenušavi aktivirani makrofagi i fagociti se normalno ne nalaze u likvoru, a njihova prisutnost je nespecifičan pokazatelj upale. Isto vrijedi i za plazma stanice čija se prisutnost javlja kod kuge, virusnih meningitisa, granulomatoznog meningoencefalitisa, neoplazija i apscesa. Osim leukocita, ostale stanice mogu biti prisutne kako u normalnom tako

i u abnormalnom likvoru, a odnosi se na stanice koje oblažu leptomeninge, stanice koroidnog pleksusa i endodimske stanice. Istraživanje koje je uključivalo 359 uzoraka psećeg likvora utvrdilo je 7.5% incidenciju meningealnih stanica, stanica koroidnog pleksusa, endodimskih i endotelnih stanica te nije utvrđena korelacija između njihove prisutnosti i pleocitoze, povećane koncentracije proteina ili primarne bolesti (LEVINE i COOK, 2020). Povremeno se mogu naći skvamozne stanice zbog kontaminacije kožom ili kod nekih patoloških stanja. Moguće je pronaći i stanice koje su posljedica punkcije iglom, primjerice hondrocite i elemente koštane srži (CRISTOPHER, 1992).

### 6.3.3. Biokemijski sastav

Cerebrospinalni likvor je bistar, bezbojan, gotovo acelularan, a koncentracija proteina je znatno niža nego u plazmi ili serumu (DI TERLIZZI i PLATT, 2009). Postoje razlike u njegovu izgledu i sastavu između mladunčadi i odrasle jedinke što se pripisuje nerazvijenosti krvno-moždane barijere. Sazrijevanjem raste koncentracija natrijevih, magnezijevih i kloridnih iona te je njihova koncentracija u likvoru veća nego u plazmi. Koncentracija kalijevih iona, bikarbonatnih iona, ureje, glukoze i ukupnih proteina opada sa sazrijevanjem. U likvoru su također prisutni i neurotransmitori, elektroliti, plinovi, prostaglandini, citokini, hormoni, plinovi, organske kiseline i aminokiseline, kretinin, urea i amonijak (VERNAU i sur., 2008).

#### a) Proteini

Koncentracija proteina u likvoru je obrnuta njihovoj molekularnoj težini. Gotovo su svi normalno prisutni proteini u likvoru podrijetlom iz seruma osim transtiretina (prealbumina), retinol vezajućeg proteina (engl. *retinol binding protein*) i transferina koje također sintetizira i koroidni pleksus (FORTERRE i sur., 2006). Protein  $\beta$ -obilježivač (engl. *beta-trace protein*), protein  $\gamma$  obilježivač (engl. *gamma-trace protein*), tau protein, glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *glial fibrillary acidic protein*), bazični mijelinski protein (engl. *myelin basic protein*) sintetiziraju se intratekalno (REIBER, 2001). Proteini cerebrospinalnog likvora se elektroforezom mogu podijeliti na prealbumine, albumine te  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  globuline. Kroz krvno-likvorsku barijeru lakše prolaze proteini male molekulske mase, poput albumina, stoga je njihova koncentracija u likvoru veća. Omjer albumina u likvoru i serumu se koristi za procjenu funkcije barijere jer se sintetizira samo u jetri i ne stvara se u središnjem živčanom sustavu (FORTERRE i sur., 2006).

U normalnom likvoru nalaze se IgG, IgM i IgA imunoglobulini. Oni uobičajeno potječu iz seruma, a prilikom bolesti se mogu stvarati i unutar SŽS-a (WIEDERKEHR, 1991). Prevladavaju IgG imunoglobulini, čiji je porast čest u brojnim bolestima SŽS-a (TIPOLD i sur., 1993). IgM se može detektirati vrlo rano tijekom imunološkog odgovora te je prvi imunoglobulin koji se vraća u normalne vrijednosti nakon uklanjanja uzroka.

#### b) Glukoza

Glukoza u cerebrospinalnom likvoru podrijetlom je iz krvi, a njezina koncentracija u likvoru ovisi o koncentraciji u krvi i stupnju prijenosa glukoze. Glukoza u likvor dopijeva procesom olakšane difuzije, odnosno difuzije posredovane nosačem (GLUT1), a veličina difuzije ovisi o koncentraciji transportera. Normalna razina glukoze u likvoru je oko 80% koncentracije glukoze u serumu (KLIŠANIN, 2022).

#### c) Enzimi

Enzimi prisutni u likvoru podrijetlom su iz krvi, živčanog tkiva, tumora i stanica unutar likvora. Njihova vrijednost je uglavnom manja od one u krvi (DASH i PATRO, 2014).

### 6.4. Prikupljanje likvora

Likvor se može prikupiti iz cerebelomedularne cisterne (u atlantookcipitalnom prostoru) te lumbalnom punkcijom u području L5-L6 kod velikih pasmina ili L6-L7 kod malih pasmina (EARLY i sur., 2019). Punkcija iz cerebelomedularne cisterne vrši se pod općom anestezijom dok je lumbalnu punkciju moguće provesti uz sedaciju i lokalnu anesteziju. Likvor prikupljen iz cerebelomedularne cisterne uglavnom ima nižu koncentraciju mikroproteina u usporedbi s onim dobivenim lumbalnom punkcijom (LEVINE i COOK, 2020). Prilikom odabira mjesta punkcije treba uzeti u obzir veličinu životinje obzirom da lumbalna punkcija često nije moguća kod velikih ili pretilih životinja te lokaciju neurološke lezije. Mjesto punkcije treba biti što bliže leziji bez penetriranja same lezije ili kaudalnije od lezije (THOMSON i sur., 1990).

## 6.5. Analiza likvora

Razvojem osjetljivijih i specifičnijih analitičkih metoda analiza likvora neizostavna je u dijagnostici i praćenju bolesti SŽS-a. Prilikom interpretacije nalaza važno je imati na umu kako se sadržaj likvora mijenja iz sata u sat, između punkcija te je ovisan kako o volumenu tako i o mjestu uzimanja. Kako bi se smanjila degradacija stanica, uputno je za analizu koristiti svježi likvor (FRY i sur., 2006). Dijagnostika likvora obuhvaća citološke, mikrobiološke i biokemijske pretrage te pretrage molekularne dijagnostike i proteomike.

### a) Proteinska analiza

Tehnike za kvantitativno mjerenje ukupnog broja proteina u likvoru uključuju turbidimetrijske metode, biuret reakcije i Lowryjevu metodu. Za mjerenje koncentracije proteina likvora koriste se kolorimetrijske metode koje se temelje na izravnom vezivanju boje, npr. Coomasie brilliant blue (RIOND i sur., 2014).

Za kvalitativnu analizu proteina postoje brojne tehnike kao što su imunoelektroforeza, elektroforeza u agaroznom gelu te izoelektrično fokusiranje. Koriste se kako bi se usporedila i opisala distribucija proteina u likvoru i serumu (BEHR i sur., 2006).

Albumin je najzastupljeniji protein u likvoru te iako je primjena limitirana, omjer albumina u likvoru i serumskih albumina može ukazivati na oštećenu barijeru ili intratekalno krvarenje (CHAN i HEROLD, 2009).

## 6.6. Karakteristike likvora kod bolesti

### 6.6.1. Fizikalne karakteristike

Obzirom da je likvor fiziološki bezbojan, promjena njegove boje uglavnom upućuje na prisutnost abnormalnosti. Crveno ili ružičasto obojenje likvora ukazuje na recentno krvarenje lezije ili na ono jatrogeno uzrokovano. Žuto obojenje (ksantokromija) često je uzrokovano povećanom koncentracijom bilirubina ili visokom koncentracijom proteina u likvoru. Promjenu boje likvora mogu uzrokovati bolesti jetre, hemolitičke bolesti i određeni lijekovi (COOK i DENICOLA, 1988).

### 6.6.2. Citologija

Povećana celularnost u likvoru naziva se pleocitoza. Stupanj pleocitoze ovisi o primarnom uzroku, zahvaćenosti i lokaciji lezije (COOK i DENICOLA, 1988). Ovisno o dominantnim stanicama pleocitoza se može podijeliti na neutrofilnu, limfocitnu, monocitnu, eozinofilnu i mješovitu (HUGO i sur., 2014). Neutrofilija može upućivati na bakterijski meningitis ili neseptični meningitis. Pleocitoza u kojoj prevladavaju eozinofili je rijetka u životinja. Neoplastične stanice mogu se naći kod neoplazija središnjeg živčanog sustava kao što je limfom.

U pasa s hernijacijom intervertebralnog diska prisutne su različite varijacije u sastavu likvora ovisno o lokaciji uzorkovanja, mjestu hernijacije, kronicitetu lezije i stupnju ozljede kralježnične moždine (DI TERLIZZI i PLATT, 2009). Psi s kroničnim ili akutnim tipom I intervertebralne bolesti diska često imaju pleocitozu u kojoj prevladavaju limfociti (WINDSOR i sur., 2008).

### 6.6.3. Proteini

Povećanje ukupnog broja proteina u likvoru je jedan od najkorisnijih pokazatelja promijenjenog kemijskog sastava likvora. Uzroci mogu biti povećana propusnost barijere krv-mozak/kralježnična moždina/likvor, intratekalna proizvodnja globulina i poremećaji u protoku ili apsorpciji likvora. Smanjenje ukupnih proteina je puno rjeđe (DELORENZI i MANDARA, 2010).

Iako se kod mnogih bolesti broj stanica u likvoru povećava paralelno s brojem ukupnih proteina u likvoru, kod nekih bolesti broj stanica ostaje normalan dok je ukupan broj proteina znatno povećan. Taj fenomen naziva se albuminocitološka disocijacija te se vjeruje kako se javlja kod bolesti koje mijenjaju krvno-moždanu barijeru, povećavaju proizvodnju likvora ili ometaju njegov protok (SUÑOL i sur., 2021).

Budući je IgG tipično povišen kod upalnih bolesti, njegov indeks može se koristiti za razlikovanje upalnih od neupalnih lezija. Koncentracija bazičnog mijelinskog proteina je povišena u likvoru pasa s hernijom intervertebralnog diska (IVDH) i utvrđeno je kako je on neovisni prediktor loše prognoze (LEVINE i COOK, 2020).

Koncentracija komponente matriksa hrskavice agrekana, povećana je u likvoru u slučajevima oštećenja živaca i upale kralježnične moždine. Kod pasa s hernijacijom intervertebralnog diska, oslobađanje hrskavičnog oligomernog matriksnog proteina (engl.



*cartilage oligomeric matrix protein*, COMP) kod ozljede kralježnične moždine može rezultirati akumulacijom COMP-a i tako biti prediktivni marker ozljede kralježnične moždine (TOKUNAGA i sur., 2010).

Razine tau proteina u likvoru su pozitivno povezane s težinom oštećenja kralježnične moždine te njegovo određivanje može poslužiti kao prognostički pokazatelj kod pasa s IVDH (ROERIG i sur., 2013).

#### 6.6.4. Enzimi

Brojna istraživanja pokazala su korelaciju u porastu aktivnosti kreatin kinaze u likvoru s lošom prognozom kod pasa s neurološkom bolešću ili ozljedom leđne moždine.

Matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9) se normalno ne eksprimira u psećem likvoru te njegova prisutnost u likvoru pasa s akutnom intervertebralnom bolesti diska upućuje na aktivnu ulogu u traumi kralježnične moždine (LEVINE i sur., 2006).

Istraživanjem enzimske aktivnosti paraoksonaze 1 u pasa s hernijacijom intervertebralnog diska utvrđena je povećana aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). Povećana razina i aktivnost PON1 može se objasniti time što PON1 ima zaštitnu ulogu u ranoj fazi oksidativnog stresa zbog potrošnje antioksidativnih enzima (HORVATIĆ i sur., 2021).

#### 6.6.5. Neurotransmitori

Povećana izvanstanična koncentracija glutamata u središnjem živčanom sustavu može dovesti do sekundarnog oštećenja tkiva i stanične smrti. U pasa s teškom, akutnom torakolumbalnom hernijacijom diska pronađen je porast glutamata u likvoru za 2-10 puta te se čini kako bi jakost kliničkih znakova mogla biti povezana s koncentracijom glutamata u lumbalnom likvoru (OLBY i sur., 1999).

#### 6.6.6. Laktična kiselina

Koncentracija laktata neovisna je o njegovoj koncentraciji u krvi. Pokazalo se kako je kod pasa s bolestima diska, razina laktata u likvoru u normalnim granicama (STOLIĆ i sur., 2020).

## 7. PROTEOMIKA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Proteomika se bavi kvalitativnom i kvantitativnom analizom proteoma (svih proteina u stanici, organu i/ili organizmu), proučavajući strukturu i funkciju proteina. Budući da se proteom mijenja pod utjecajem vanjskih faktora, fizioloških i patofizioloških procesa, proteomika se neizostavno primjenjuje u biomedicini i veterinarskoj medicini. Uzorci koji se u te svrhe koriste uključuju tjelesne tekućine (serum, plazma, likvor, urin, slina i sl.), stanice ili tkiva, pri čemu neinvazivnost sakupljanja uzoraka ima prednost radi dobrobiti životinja (BILIĆ i sur., 2018).

Proteomska analiza temeljena na spektrometriji masa (MS, engl. *Mass spectrometry*) temelji se na ekstrakciji proteina, razgradnji tripsinom, odvajanjem dobivenih peptida koristeći tekućinsku kromatografiju (LC, engl. *Liquid chromatography*) te analizom spektrometrijom masa. Spektrometar masa se sastoji od izvora ionizacije u kojem se ioniziraju molekule, masenog analizatora u kojem dolazi do razdvajanja iona na temelju mase i naboja ( $m/z$ ) i detektora koji detektira signal. Dobiveni spektri masa koriste se za pretraživanje baza podataka koje sadrže podatke o aminokiselinskim slijedovima proteina (njihove teoretske mase) i omogućavaju identifikaciju proteina (GALIĆ i CINDRIĆ, 2008).

Baze podataka koje se najčešće koriste su NCBI i UniProtKB. Sekvenciranje cijelog genoma životinjskih vrsta, npr. psa, mačke, kokoši, krave, ovce, konja i sl. bio je preduvjet za primjenu MS-a u proteomskim istraživanjima u veterinarskim znanostima (BILIĆ i sur., 2018).

Dobiveni podaci o identificiranim proteinima i njihovoj relativnoj zastupljenosti ili koncentraciji bioinformatičkim pristupom (analiza genske ontologije ili molekulskih puteva) dobivaju biološko značenje čime je omogućena i identifikacija biomarkera za pojedinu bolest (SCHMIDT i sur., 2014).

### 7.1. Dosadašnja proteomska istraživanja IVDH

Proteomika temeljena na spektrometriji masa koristi se za proučavanje patofizioloških procesa u bolestima središnjeg živčanog sustava i drugim neurološkim stanjima analizom tkiva i bioloških tekućina kao što su i serum ili likvor (CSF).

Budući da su patološke i biokemijske karakteristike slične u psećem i ljudskom NP intervertebralnog diska, tako su slična i obilježja degenerativne bolesti diska u različitim fazama kod pasa i ljudi. U ovom se istraživanju koristila visokoučinkovita kvantitativna proteomska analiza za usporedbu sekretoma u NP intervertebralnog diska hondrodistrofične

pasmine (slično ljudskom disku) s onim nehondrodistrofičnih pasa, što je analogno IVD-u zdravog, mladog čovjeka. Dobiveni podaci sugeriraju kako ugrožena biomehanička svojstva degenerativnog diska proizlaze barem djelomično iz fibrokartilaginozne metaplazije NP sekundarno fragmentaciji proteina decorina i biglikana, što je povezano s gubitkom homeostaze ekstracelularnog matriksa. Ova opažanja dodaju kvantitativne proteomske i biomehaničke podatke koji podržavaju korištenje psa kao optimalnog modela za proučavanje ljudske degenerativne bolesti diska i procjenu potencijalnih bioloških lijekova (ERWIN i sur., 2015).

Kako bi se bolje razumjeli patofiziološki mehanizmi koji leže u pozadini ozljede korijena spinalnog živca izazvane lumbalnom disk hernijom (LDH), provedena je usporedna proteomska analiza cerebrospinalne tekućine (CSF) između pacijenata s LDH (eksperimentalna skupina) i inače zdravih pacijenata kojima su implantati uklonjeni iz zacijeljenih prijeloma donjih udova (kontrolna skupina). Analiza je obavljena pomoću dvodimenzionalne gel elektroforeze što je praćeno LC-IT-MS i pretraživanjem baze podataka. Proteomskom analizom su u konačnici identificirani proteini koji su uključeni u proces ozljede korijena spinalnog živca zbog hernijacije intervertebralnog diska (LIU i sur., 2006).

Jedno istraživanje je obuhvaćalo analizu različito izraženih proteina u potpunim i nepotpunim oblicima ozljede kralježnične moždine. Budući da je prognoza slučajeva nepotpunih ozljeda znatno bolja od onih kod potpunih vrsta ozljeda, izgledno je da su molekularni procesi ti koji mogu biti odgovorni za obrasce oporavka. Ovo je jedno od prvih istraživanja koje stavlja naglasak na patofiziološku situaciju u okolini ozlijeđene moždine pomoću ekspresije i brojnosti proteina te statističke analize umjesto analize transkriptoma (SENGUPTA i sur., 2014).

## 8. MATERIJALI I METODE

### Uzorci:

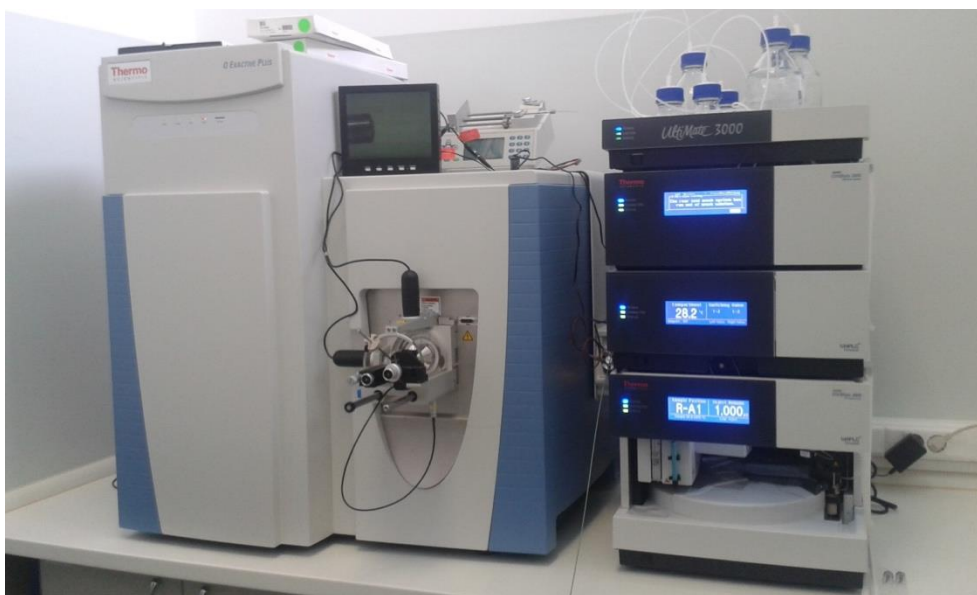
Etičko povjerenstvo Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrilo je istraživanje (br. 640-01/18-17/67; Zapisnik br. 251-61-21/333-18-01). Kontrolna skupina obuhvaćala je 6 zdravih pasa (mješanci prosječne tjelesne težine 20 kg, starosti 2-6 godina), dok je skupina pasa s hernijom intervertebralnog diska obuhvaćala 9 mješanaca (tjelesne težine 6-15 kg, dob 6–12 godina). Hernija je dijagnosticirana CT-om u T13/L1/L2 diskovima. Psi u skupini IVDH bili su paraplegičari s očuvanim dubokim refleksom boli i bili su podvrgnuti kirurškom zahvatu dekompresije leđne moždine.

### Kemikalije:

Acetonitril (LC-MS čistoće, Honeywell Internacional Inc.), Ditiotritol (p.a., Sigma), Jodoacetoamid (p.a., Sigma), Metanska kiselina (LC-MS čistoće, Sigma), MilliQ voda, Mravlja kiselina (LC, Sigma-Aldrich), Trietilamonijev bikarbonat (LC-MS čistoće, Honeywell Internacional Inc.), Tripsin Gold (LC-MS čistoće, Promega).

### Instrumenti i oprema:

Analitička vaga (WBA-220, Wisd Laboratory Elements), centrifuga (Universal 320, Hettich), vakuum koncentrador (TermoScientific Fisher), spektrofotometar, mikročitač (Tecan, Austria GmbH).



Slika 1. Vezani sustav Dionex UltiMate 3000 RSLCnano i spektrometar masa Q Exactive Plus na kojem je provedena proteomska analiza (Autorska slika).

#### Prikupljanje uzoraka:

Cerebrospinalna tekućina prikupljena je u općoj anesteziji iz *cisterna magne* prije operacije. Indukcija u opću anesteziju je postignuta s intravenozno apliciranim propofolom (Propofol®, Abbott, Maidenhead, UK), a održana je sa sevofluranom (Sevorane®, Abbott, Maidenhead, UK) koji je apliciran kroz endotrahealni tubus. Anestezija je prilagođena kako bi minimalno utjecala na protok krvi u mozgu i intrakranijalni tlak. CSF je prikupljen u sterilnu Eppendorf epruvetu (veličine 1.5 mL), odmah centrifugiran na 3000× g pri 4 °C kroz 5 min te pohranjen na –80 °C do analize. Svi uzorci su prikupljeni tijekom 6 mjeseci.

#### 8.1. Proteomska analiza

LC-MS/MS analiza uzoraka likvora provedena je korištenjem tekućinskog kromatografa Dionex UltiMate 3000 RSLCnano spregnutog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus kao što je opisano u literaturi (HORVATIĆ i sur., 2019). Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima likvora određena je koristeći kolorimetrijsku BCA metodu. Princip ove metode je da proteini mogu reducirati ione bakra (II) u ione bakra (I) u alkalnoj otopini (biuret reakcija) i rezultiraju stvaranjem kompleksa s bicinhoninskom kiselinom koji je ljubičaste boje. Intenzitet apsorbancije na 562 nm odgovara koncentraciji proteina u usporedbi sa standardom.

Peptidi su otopljeni u puferu za nanošenje uzoraka i razdvojeni na analitičkoj koloni (PepMap™ RSLC C18, 50 cm×75 μm). Protok pokretne faze bio je 0,3 μL/min, a trajanje linearnog gradijenta eluacije peptida 120 minuta. Pokretna faza A sastojala se od 0,1% mravlje kiseline u vodi, a pokretna faza B bila je 0,1% mravlja kiselina u 80%-om acetonitrilu. Spektrometrija masa je provedena u pozitivnom načinu rada koristeći metodu Top8. Napon ionskog izvora za MS je bio 2 kV, a temperatura kapilare za prijenos iona 275°C. Spektar masa snimljen je u rasponu od 350,0 m/z do 1800,0 m/z pri razlučivosti od 70 000 i AGC vrijednošću 1x106. Fragmentacija iona u kolizijskoj ćeliji je provedena pri normaliziranoj energiji sudara (NCE) (29% i 35%) s razlučivanjem od 17 500 i ciljnom vrijednošću AGC 2x105.

Za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju proteina korišten je SEQUEST algoritam unutar računalnog programa Proteome Discoverer (verzija 2.3., Thermo Fisher Scientific). Provedena je pretraga baze podataka *Canis lupus familiaris* preuzete s UniprotKB prema navedenim parametrima: dozvoljena dva promašena mjesta cijepanja tripsinom, tolerancija pogreške izmjerene mase prekursora i fragmenata od 10 ppm i 0,05 Da, karbomidometil (C) kao fiksna modifikacija peptida, oksidacija (M) i deamidacija (N, Q) kao dinamičke modifikacije peptida. Postotak krivih očitavanja (engl. *false discovery rate*, FDR). Proteini s najmanje dva jedinstvena peptida i 1% FDR smatrani su pouzdano identificiranima te su korišteni u daljnjim analizama.

#### Bioinformatička analiza:

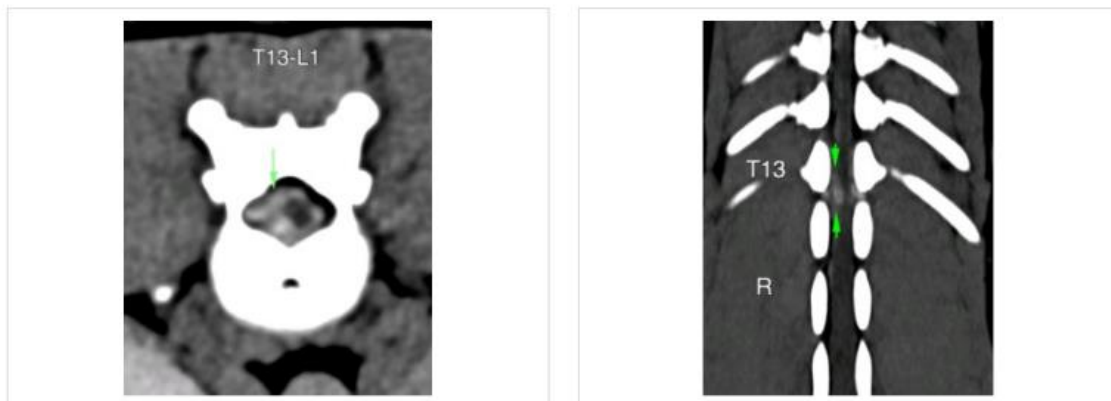
Za statističku obradu podataka korišten je računalni program R v3.2.2 (Team 2013). Primjenom Dixon's testa su u paketu outliers v0.14 (KOMSTA, 2011) uklonjene ekstremne vrijednosti, a razlike u količini proteina među skupinama su testirane primjenom Wilcoxon-Mann-Whitney testa. Razlika u ekspresiji između dvije skupine izračunata je prema srednja vrijednost (skupina 2)/srednja vrijednost (skupina 1) i izražena u log2 bazi. PCA i raspršeni grafički prikaz (volcano plot) izrađeni su primjenom ggplot2 v3.1.1 (WICKHAM, 2009) paketa u R programu. Za bioinformatičku analizu korištene su različite javno dostupne mrežne bioinformatičke platforme PANTHERdb (<https://www.pahtherdb.org>) i STRINGdb v11.0 (<https://string-db.org/>).

## Validacija proteomskih rezultata

Proteomske rezultate dobivene spektrometrijom masa potrebno je potvrditi nekom drugom metodom da bi se rezultati mogli smatrati točni i pouzdani. U ovom slučaju, za validaciju je odabran protein paraoksonaza 1 (PON1), enzim koji ima protuupalne i antioksidativne učinke. Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) u likvoru 6 pasa s IVDH i 6 zdravih pasa (kontrola) određena je primjenom automatiziranog biokemijskog analizatora prema parametrima metode koje su definirali (TVARIJONAVICIUTE i sur., 2012) koristeći p-nitrofenil-acetat kao supstrat. Statistička analiza provedena je u program Graphpad prism (v.8) koristeći t-test pri čemu se rezultati čija je p-vrijednost  $p < 0,05$  smatraju statistički značajnima.

## 9. REZULTATI

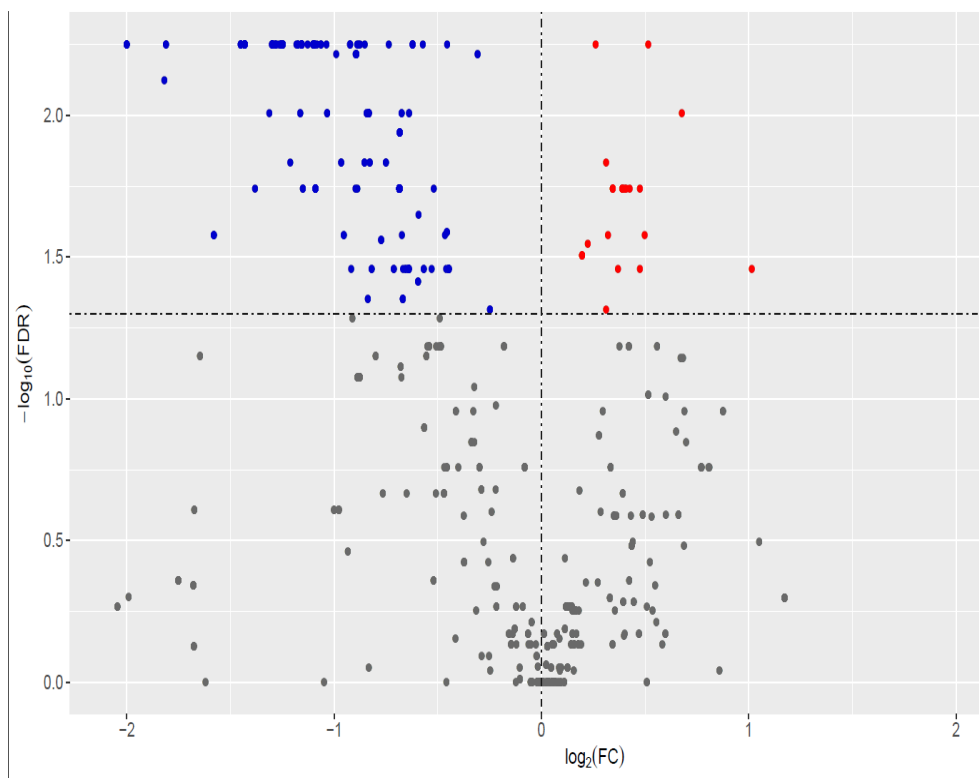
Hernijacija intervertebralnog diska dijagnosticirana je CT metodom.



Slika 2. Desno orijentirana akutna ekstruzija intervertebralnog diska T13-L1 (Autorska slika).

Da bi se odredilo koje molekule sudjeluju u procesima vezanim uz IVDH, njihove interakcije i identificirale molekule s dijagnostičkim potencijalom, za analizu likvora primijenjen je proteomski pristup temeljen na spektrometriji masa. Proteomskim pristupom identificirano je 205 proteina u uzorcima likvora zdravih pasa, kao i u pasa s IVDH. Statistička analiza dobivenih rezultata pokazala je da se 75 proteina razlikuje u zastupljenosti (ekspresiji), pri čemu je 12 proteina više, a 63 proteina manja eksprimirano u skupini pasa s IVDH u odnosu na kontrolnu skupinu (zdrave pse). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici, kao i na slici.





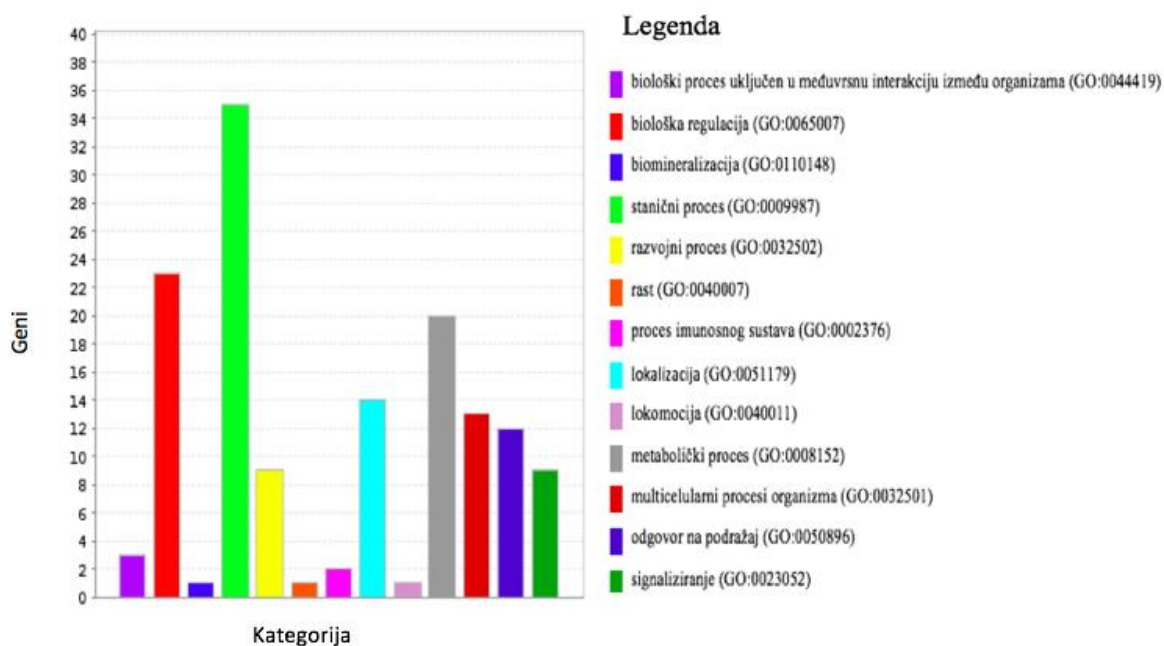
Slika 3. Grafički prikaz (engl. *Volcano plot*) različito eksprimiranih proteina u likvoru pasa s IVDH u odnosu na zdrave pse. Plavo su označeni proteini manje, a crveno više eksprimirani u likvoru pasa s IVDH. Sivo su označeni proteini koji nisu statistički značajni.

Tablica 1. Tablični prikaz različito eksprimiranih proteina.

Pristupni broj (NCBI)	Ime proteina	Simbol gena	log2FC	p-vrijednost
1418304654	apolipoprotein C-I	APOC1	1.01	0.03
73975797	serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	0.68	0.01
1418241889	apolipoprotein A-I	APOA1	0.47	0.03
1418515495	alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	0.43	0.02
1418328547	serum albumin-like	ALB	0.40	0.02
1239925760	complement C5	C5	0.39	0.02
73975389	afamin	AFM	0.37	0.03
57091057	membrane primary amine oxidase isoform X1	AOC3	0.34	0.02
359321961	prothrombin	F2	0.31	0.01
130314	Plasminogen;	PLG	0.31	0.05
1418510423	serotransferrin-like	TF	0.26	0.01
928156540	maltase-glucoamylase, intestinal isoform X2	MGAM	0.20	0.03

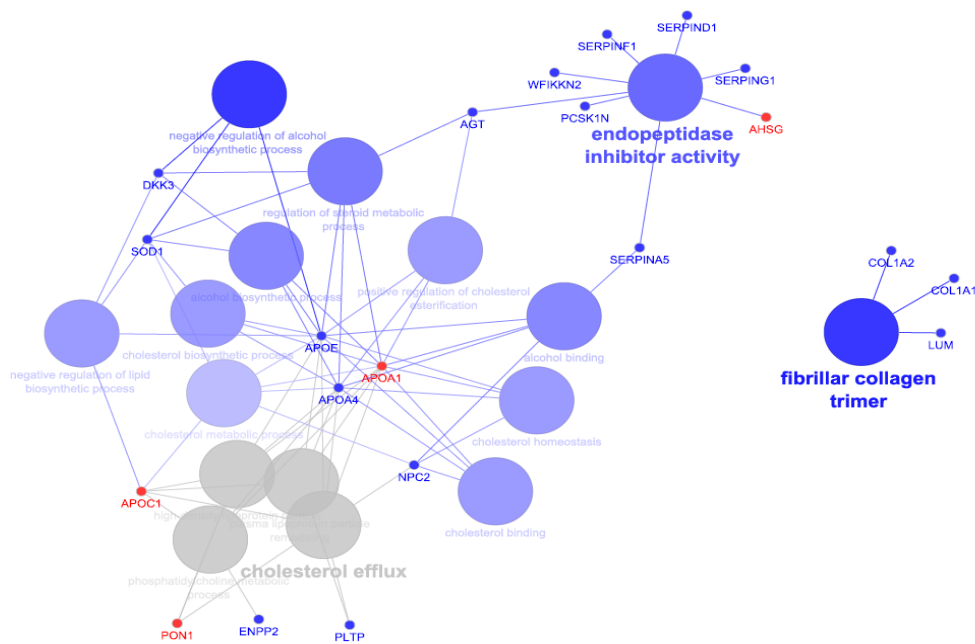
345799905	apolipoprotein A-IV	APOA4	-0.25	0.05
345791439	heparin cofactor 2	SERPIND1	-0.31	0.01
1353234	Lectin mannose-binding 2;	LMAN2	-0.45	0.03
1418201165	SPARC-like protein 1 isoform X1	SPARCL1	-1.16	0.01
244539517	chromogranin A, partial	CHGA	-1.21	0.01
76161575	osteopontin, partial	SPP1	-1.25	0.01
7688731	matrix metalloproteinase-2, partial	MMP2	-1.26	0.01
18150346	Cu/Zn superoxide dismutase	SOD1	-1.26	0.01
1418248954	proSAAS	PCSK1N	-1.28	0.01
359319344	ganglioside GM2 activator	GM2A	-1.28	0.01
1418222978	calcitonin receptor-stimulating peptide 2-like isoform X2	CRSP2	-1.30	0.01
1239976444	follistatin-related protein 1	FSTL1	-1.30	0.01
1418314244	transthyretin	TTR	-1.31	0.01
73970011	augurin	C10H2orf40	-1.38	0.02
73974395	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 isoform X11	ENPP2	-1.45	0.01
3046976	prepro-alpha 1 type I collagen, partial	COL1A1	-1.58	0.03
345795204	neuroendocrine protein 7B2 isoform X1	SCG5	-1.81	0.01
1418342647	secretogranin-2	SCG2	-1.82	0.01
345789648	secretogranin-1 isoform X1	CHGB	-2.00	0.01

Provedena je analiza genske ontologije (GO) koristeći mrežni bioinformatički alat PANTHERdb. (<https://www.pantherdb.org/>) pri čemu su korištena imena gena različito eksprimiranih proteina. Dobiveni rezultati analize (slika 4) pokazuju da je, obzirom na biološki proces, najviše gena uključeno u stanične procese (45,5%, žuto na slici), biološku regulaciju (29,9%, crveno) i metaboličke procese (26%, sivo).



Slika 4. Rezultati genske ontologije (Biološki proces – BP) različito eksprimiranih proteina u likvoru pasa s IVDH u odnosu na zdrave pse dobiveni koristeći alat PANTHERdb uz pripadajuću legendu.

Različito eksprimirani proteini korišteni su u daljnjoj bioinformatičkoj analizi primjenom javno dostupne baza podataka STRINGdb kako bi se vizualizirale interakcije između različito eksprimiranih proteina, ali i odredilo u kojim molekulskim putevima sudjeluju navedeni proteini. Kao što je prikazano na slici 5, dobiveni rezultati ukazuju da IVDH najviše utječe na procese vezane uz metabolizam lipida i kolesterola, polimerizaciju kolagena i endopeptidatnu aktivnost proteina.



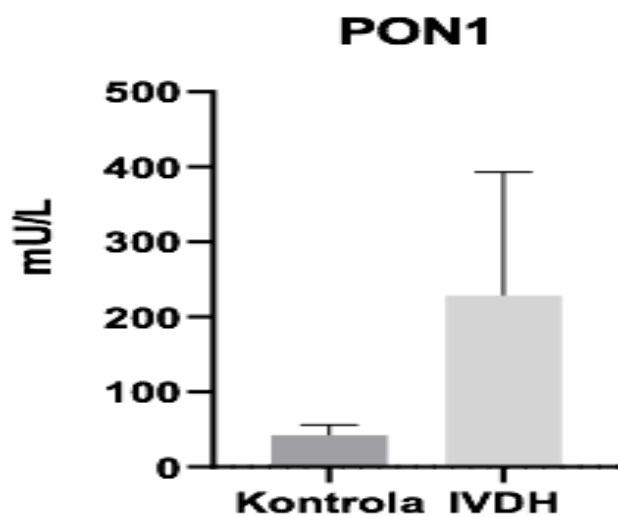
Slika 5. Molekulski procesi na koje utječe IVDH. Izdvojeni su različito eksprimiranim proteinima koji sudjeluju u pripadajućim procesima (crveno više eksprimirani u skupini pasa s IVDH, a plavo u kontrolnoj skupini).

### Validacija proteomskih rezultata

Rezultati dobiveni proteomskim pristupom analitički su validirani pri čemu je izmjerena aktivnost PON 1 u likvoru (Slika 6). Dobiveni rezultati ukazuju da je aktivnost PON1 statistički značajno veća ( $p=0,02$ ) u likvoru pasa s IVDH (tablica 2, slika 6), što je u skladu s rezultatima dobivenim proteomskim pristupom.

Tablica 2. Rezultati aktivnosti PON1.

	Kontrola (mU/L)	IVDH (mU/L)
	36.20	134.60
	21.80	128.80
	61.40	110.20
	51.40	240.40
	40.00	208.40
	43.80	548.40
Srednja vrijednost	42.43	228.5
St. dev.	13.51	164.7
p-vrijednost	0.02	



Slika 6. Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) u likvoru zdravih pasa (kontrola) i pasa s IVDH.

## 10. RASPRAVA

Bolesti kralježnice predstavljaju značajan zdravstveni problem za ljude i pse, utječući na kvalitetu života. Hernija intervertebralnog diska je najčešći uzrok ozljede kralježnične moždine u pasa, dok su bolesti povezane s IVDH česti razlozi za eutanaziju kod pasa mlađih od 10 godina. Isto tako, pas se često koristi kao translacijski model za znanstvena istraživanja, kirurške zahvate te biomehaničke studije kralježnice. Nadalje, znanstvene studije IVDH u pasa iznimno su korisne i informativne za razumijevanje patofiziologije same bolesti i za provjeru učinkovitosti novih terapija prije kliničkih ispitivanja u ljudi. Iako se za dijagnostiku degenerativne promjene diska obično koriste MR, CT i/ili RTG (kao što je vidljivo i u ovom radu), patogeneza uključuje kompleksne molekularne procese koji se ne mogu identificirati primjenom navedenih tehnika već zahtijevaju sistemski pristup. Pristup sistemske biomedicine omogućuje identifikaciju molekula (DNA, RNA, proteina i metabolita) koje su uključene u navedene procese ili nastaju uslijed istih. Dijagnoza u ranoj fazi bolesti mogla bi pomoći u obnavljanju strukture diska i mehaničke strukture korištenjem personaliziranih i ciljanih terapijskih strategija, zaobilazeći bolne simptome kod pacijenata (SMITH i sur., 2011).

Korištenje najsuvremenije proteomske tehnologije, točnije spektrometrije masa i bioinformatičkih alata, omogućilo je identifikaciju i relativnu kvantifikaciju 205 proteina u složenoj matrici kao što je likvor, koristeći niske koncentracije analita. Iako nije lako dostupan kao krv, urin ili slina, zbog svojih višestrukih funkcija (strukturne, hidrodinamičke, metaboličke i imunološke) likvor je jedina dostupna biološka tekućina koja omogućuje procjenu trenutnog statusa središnjeg živčanog sustava. Likvor je ključan u proučavanju neurodegenerativnih poremećaja jer na kemijski sastav likvora utječu patofiziološki procesi povezani sa središnjim živčanim sustavom (KHASAWNEH i sur., 2018).

U našem istraživanju, kvantitativni proteomski pristup temeljen na izobarnim privjescima (engl. *tandem mass tag*, TMT) omogućio je multipleksnu analizu 10 uzoraka istovremeno pri čemu je identificirano 75 diferencijalno eksprimiranih proteina koji su uključeni u vezanje kalcija (ALB), oksidativni stres (SOD1), metabolizam lipida (APOE), polimerizaciju kolagena (COL1A1, COL1A2, VIM), upalne procese (APOA1) i imunološki odgovor (SERPIN F1, CCL23, MMP) kao što je prikazano na slici 4 i 5.

Albumin je glavni protein u likvoru, koji proizvodi isključivo jetra. Njegova koncentracija u likvoru ovisi o krvno-moždanoj barijeri. Ima dobru sposobnost vezanja vode, kalcijevih, natrijevih i kalijevih iona, masnih kiselina, hormona, bilirubina i lijekova. Kada se ukupna koncentracija proteina u likvoru poveća, poveća se i koncentracija albumina, posebice radi oštećenja krvno-moždane barijere. Eksperimentalno je dokazano je da se koncentracija albumina u likvoru povećava nakon ozljede leđne moždine i radi toga se smatra potencijalnim molekularnim biljegom za progresiju ozljede leđne moždine (ali i oporavak) (SENGUPTA i sur., 2014). U ovom radu također je uočena povećana koncentracija albumina u likvoru pasa s IVDH.

IVDH je česti uzrok ozljede leđne moždine (engl. *spinal cord injury*, SCI) kod pasa, što rezultira kompresijom kralježnične moždine povezanom s oksidativnim stresom, neuropatskom boli, kao i senzornim i motoričkim nedostacima. Zbog kompresije kralježnične moždine i ozljede živca dolazi do upale i/ili ishemije koji se javljaju kod pacijenata s IVDH. U ovom radu identificirani su proteini povezani s ozljedom kralježnične moždine, čija je koncentracija statistički značajno promijenjena u likvoru pasa s IVDH, kao što je npr. matriks metaloproteinaza (MMP). Matriks metaloproteinaze su proteini uključeni u različite funkcije kao što su remodeliranje vaskulature, angiogeneza, regeneracija tkiva, invazija tumora, upala i sl., ali i u patogenezu neuropalnih bolesti (KÖNNECKE i BECHMANN., 2013). MMP2 se nalazi u mozgu i likvoru zdravih pasa, dok je smanjenje koncentracije ovog proteina u likvoru IVDH skupine povezano s neuroinflamacijom (MLEKUSCH i HUMPEL, 2009). Isto tako je u literaturi opisano kako MMP2 cijepa kolagen, glavnu strukturnu komponentu bazalnih membrana, povećavajući propusnost krvno-moždane barijere. Kada se kolagen razgradi, fibrozni prsten pukne, a izbočenje *nucleus pulposus* može pritisnuti korijen živca i/ili leđnu moždinu, pri čemu dolazi do oštećenja istih.

Superoksid dismutaza 1, SOD1, pripada obitelji Cu-Zn superoksid dismutaza te sudjeluje u razgradnji citotoksičnih superoksidnih radikala koji nastaju u stanicama i izazivaju oštećenja. Povećanje koncentracije antioksidativnih molekula SOD1 u likvoru upućuje da oksidativni stres ima važnu ulogu u IVDH.

Proteini likvora povezani s neuropatskom boli čija je koncentracija značajno promijenjena uslijed IVDH uključeni su u upalne procese (APO A1) i imunološki odgovor (transtiretin (TTR)). Zbog kompresije kralježnične moždine i ozljede živca dolazi do upale i/ili ishemije, što su važni procesi koji se odvijaju uslijed IVDH. Jedan od proteinskih biljega upale,

APO A1, glavna je proteinska frakcija lipoproteina visoke gustoće (HDL), uključena u metabolizam kolesterola, kao i u upalni i imunološki odgovor. Ima zaštitnu ulogu kod kardiovaskularnih bolesti te kod neuroinflamacije koja se javlja tijekom neurodegenerativnih bolesti (MANGARAJ i sur., 2016). Transtiretin je tetramerni protein koji prenosi hormone u krvnoj plazmi i mozgu, a negativno je povezan s upalom jer ima antioksidativno djelovanje. Također sudjeluje u biomineralizaciji i kalcifikaciji (WIECZOREK i OŽYHAR, 2021).

### Validacija proteomskih rezultata

Rezultati dobiveni proteomskom analizom zahtijevaju validaciju – ponajprije analitičku, a potom i kliničku na većem broju pacijenata ukoliko se radi o potencijalnom molekularnom biljegu za pojedinu bolest. PON1 igra važnu ulogu u održavanju homeostatske ravnoteže intervertebralnog diska i zbog navedene biološke važnosti kao potencijalni molekularni biljeg za IVDH odabran je za analitičku validaciju. Dokazano je da aktivnost PON1 u krvnoj plazmi u životinjskim modelima ozljede leđne moždine raste. Povećane razine PON1 i njegova aktivnost mogu se objasniti zaštitnom ulogom PON1 u ranoj fazi oksidativnog stresa radi povećane potrebe za antioksidativnim enzimima (TOPSAKAL i sur., 2003). Povećanje aktivnosti PON1 u likvoru pasa s IVDH također je dobiveno u ovom radu koristeći p-nitrofenil acetat kao supstrat, potvrđujući rezultate proteomske analize.



## 11. ZAKLJUČCI

- Složena stanja, kao što je IVDH, zahtijevaju sistemski biološki pristup koji može rasvijetliti različite patofiziološke procese povezane s težinom i ishodom liječenja bolesti
- Proteomska analiza u kombinaciji s najsuvremenijim bioinformatičkim alatima omogućila je identifikaciju 205 proteina, od kojih je 75 proteina diferencijalno eksprimirano u pasa s IVDH omogućujući razumijevanje patofiziologije bolesti na razini molekula (proteina)
- Identificirani su proteini s dijagnostičkim potencijalom čija je ekspresija direktno vezana za IVDH, a sudjeluju u neuropatskoj boli, mijelinizaciji, neuroinflamaciji i imunološkom odgovoru
- Iako su rezultati validirani (PON1), klinička primjena pojedinih proteina kao molekularnih biljega za rano otkrivanje IVDH zahtijeva daljnju kliničku validaciju i razvoj prikladnih testova za rutinsku analizu

## 12. LITERATURA

1. ADAMS, M.A., P.J. ROUGHLEY (2006): What is intervertebral disc degeneration, and what causes it?. *Spine* 31, 2151-2161.  
doi: 10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c
2. ADEEB, N., M. MORTAZAVI, A. DEEP, C. J. GRIESSENAUER, K. WATANABE, M. SHOJA, M. LOUKAS, R. S. TUBBS (2013): The pia mater: a comprehensive review of literature. *Child. Nerv. Syst.* 29, 1803-1810.  
doi:10.1007/s00381-013-2044-5
3. ASLAM, B., M. BASIT, M.A. NISAR, M. KHURSHID, M.H. RASOOL (2017): Proteomics: Technologies and Their Applications. *J.Chromatogr. Sci.* 55, 182-196.  
doi: 10.1093/chromsci/bmw167
4. BAKA, R., D. ECKERSALL, A. HORVATIC, A. GELEMANOVIC, V. MRLJAK, M. MCLAUGHLIN, L. V. ATHANASIOU, N. PAPAIOANNOU, I. STYLIANAKI, H. Q. HANH, C. C. CHADWICK, Z. POLIZOPOULOU (2021): Quantitative proteomics of cerebrospinal fluid using tandem mass tags in dogs with recurrent epileptic seizures. *J. Proteomics* 231.  
doi: 10.1016/j.jprot.2020.103997
5. BEHR, S., C. TRUMEL, L. CAUZINILLE, F. PALENCHÉ, J.P. BRAUN (2006): High Resolution Protein Electrophoresis of 100 Paired Canine Cerebrospinal Fluid and Serum. *J. Intern. Med.* 20, 657-662.  
doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[657:hrpeop]2.0.co;2
6. BERGKNUT, N., J. RUTGES, H-J. KRANENBURG, L. SMOLDERS, R. HAGMAN, H-J. SMIDT, A-S. LAGERSTEDT, L. PENNING, G. VOORHOUT, H. HAZEWINKEL, G.C. GRINWIS, L. CREEMERS, B. MEIJ, W. DHERT (2012): The Dog as an Animal Model for Intervertebral Disc Degeneration?. *Spine* 37, 351-358.  
doi: 10.1097/BRS.0b013e31821e5665.
7. BERGKNUT, N., L. A. SMOLDERS, G. C. GRINWIS, R. HAGMAN, A. S. LAGERSTEDT, H. A. HAZEWINKEL, M. A. TRYFONIDOU, B. P. MEIJ (2013): Intervertebral disc degeneration in the dog. Part 1: Anatomy and physiology of the intervertebral disc and characteristics of intervertebral disc degeneration. *The Vet. J.* 195, 282-291.  
doi: 10.1016/j.tvjl.2012.10.024

8. BILIĆ, P., J. KULEŠ, A. GALAN, L. GOMES DE PONTES, N. GUILLEMIN, A. HORVATIĆ, A. FESTA SABES, V. MRLJAK, P.D. ECKERSALL (2018): Proteomics in Veterinary Medicine and Animal Science: Neglected Scientific Opportunities with Immediate Impact. *Proteomics*, 18.  
doi: 10.1002/pmic.201800047
9. BRINKER, T., E. STOPA, J. MORRISON, P. KLINGE (2014): A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS*, 11, 1-16.  
doi: 10.1186/2045-8118-11-10
10. BRISSON, B. A. (2010): Intervertebral disc disease in dogs. *Vet. Clin. N. Am-Small*. 40, 829–858.  
doi:10.1016/j.cvsm.2010.06.001
11. BROWN, P. D., S.L. DAVIES, T. SPEAKE, I.D. MILLAR (2004): Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Visual Neurosci*. 129, 955-968.  
doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.003
12. BUREŠ, T., H. CAPAK, B. ŠKRLIN, D. STANIN, A. KRALJEVIĆ, D. NAPPO, Z. VRBANAC (2022): Usporedba metoda slikovne dijagnostike hernijacije intervertebralnog diska u pasa. *Vet. stanica* 53, 475-486.  
doi:10.46419/vs.53.4.3
13. CHAN, O.T., D.A. HEROLD (2009): Chip Electrophoresis as a Method for Quantifying Total Albumin in Cerebrospinal Fluid. *J. Assoc. Lab. Automat.* 14, 6-11.  
doi: 10.1373/clinchem.2006.072801
14. CHRISMAN, C. L. (1992): Cerebrospinal Fluid Analysis. *Vet. Clin. N. Am-Small*. 22, 781-810.  
doi:10.1016/s0195-5616(92)50077-8.
15. CHRISTOPHER, M. M. (1992): Bone marrow contamination of canine cerebrospinal fluid. *Vet. Clin. Path.* 21, 95-98.  
doi: 10.1111/j.1939-165x.1992.tb00592.x
16. COOK, J. R., D.B. DENICOLA (1988): Cerebrospinal Fluid. *Vet. Clin. N. Am-Small*. 18, 475–499.  
doi: 10.1016/s0195-5616(88)50051-7
17. DASH, P.C., D. PATRO (2014): Role of CSF CK, LDH, GGTP Enzyme Levels in Diagnostic and Prognostic Evaluation of Meningitis. *J. Clin. Diagn. Res.* 8, MC1  
doi: 10.7860/JCDR/2014/9675.4615

18. DE LORENZI, D., M.T. MANDARA (2016): The Central Nervous System. *Canine and Feline Cytology*, 369-407.  
doi: 10.1016/B978-141604985-2.50019-0.
19. DE RISIO, L. (2015): A review of fibrocartilagenous embolic myelopathy and different types of peracute non-compressive intervertebral disk extrusions in dogs and cats. *Front. Vet. Sci.* 2, 24.  
doi: 10.3389/fvets.2015.00024
20. DI TERLIZZI, R., S.R. PLATT (2009): The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part II—analysis. *Vet. J.* 180, 15-32.  
doi: 10.1016/j.tvjl.2007.11.024.
21. EARLY, P.J., K.J. MUNANA, N.R. OLBY, C.L. MARIANI (2019): Comparison of cerebrospinal fluid parameters from the cerebellomedullary and lumbar cisterns in 54 dogs. *Can. Vet. J.* 60, 885.
22. ERWIN, W.M., L. DESOUZA, M. FUNABASHI, G. KAWCHUK, M.Z. KARIM, S. KIM, S. MÄDLER, A. MATTA, X. WANG, K.A. MEHRKENS (2015). The biological basis of degenerative disc disease: Proteomic and biomechanical analysis of the canine intervertebral disc. *Arthritis Res. Th.* 17, 1-13.  
doi: 10.1186/s13075-015-0733-z
23. FENN, J., OLBY, N. J. (2020): Classification of intervertebral disc disease. *Front. Vet. Sci.* 7, 579025.
24. FINGEROTH, M., W. B. THOMAS (2014): *Advances in Intervertebral Disc Disease in Dogs and Cats*. Wiley Blackwell, Danvers.  
doi:10.1002/9781118940372
25. FORTERRE, F., D. GORGAS, M. DICKOMEIT, A. JAGGY A, J. LANG, D. SPRENG (2010): Incidence of spinal compressive lesions in chondrodystrophic dogs with abnormal recovery after hemilaminectomy for treatment of thoracolumbar disc disease: a prospective magnetic resonance imaging study. *Vet. Surg.* 39, 165-172.  
doi: 10.1111/j.1532-950X.2009.00633.x.
26. FORTERRE, S. J. RAILA, F. FORTERRE, L. BRUNNBERG, F.J. SCHWEIGERT (2006): Characterisation of transthyretin and retinol-binding protein in plasma and cerebrospinal fluid of dogs. *Vet. J.* 171, 451–455.  
doi: 10.1016/j.tvjl.2004.11.017
27. FRY, M.M., W. VERNAU, P.H. KASS, K.M. VERNAU (2006): Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis.

- Vet. Clin. Path. 35, 72-77.  
doi: 10.1111/j.1939-165x.2006.tb00090.x
28. GALIĆ, N., M. CINDRIĆ (2008): Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kemija u industriji: časopis kemičara i tehnologa Hrvatske* 57, 231 – 24.
29. GHANNAM, J. Y., K. A. AL KHARAZI (2023): *Neuroanatomy, Cranial Meninges*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
30. HANSEN, H. J. (1952): A pathologic-anatomical study on disc degeneration in dog: With special reference to the so-called enchondrosis intervertebralis. *Acta Orthop. Scand.* 23, 1-130.  
doi: 10.3109/ort.1952.23.suppl-11.01
31. HEBLINSKI, N., H. SCHMOKEL (2018): Our approach to intervertebral disc disease in dogs: a review of the current literature. *J. Vet. Sci. Med. Diagn.* 7, 1-9 .  
doi: 10.4172/2325-9590.1000246
32. HORVATIĆ, A., A. GELEMANOVIĆ, B. PIRKIĆ, O. SMOLEC, O.; B. BEER LJUBIĆ, I. RUBIĆ, P.D. ECKERSALL, V. MRLJAK, M. MCLAUGHLIN, M. SAMARDŽIJA, M. LIPAR (2021): Multi-Omics Approach to Elucidate Cerebrospinal Fluid Changes in Dogs with Intervertebral Disc Herniation. *Int. J. Mol. Sci.* 22.  
doi: 10.3390/ijms222111678
33. HORVATIĆ, A., N. GUILLEMIN, H. KAAB, D. MCKEEGAN, E. O'REILLY , M. BAIN, J. KULEŠ, PD. ECKERSALL (2018): Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin. *J. Proteomics* 192, 64-77.  
doi: 10.1016/j.jprot.2018.08.009
34. HRISHI, A. P., M. SETHURAMAN (2019): Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis and Interpretation in Neurocritical Care for Acute Neurological Conditions. *Indian J. Crit. Care. Med.* 23, 115-119.  
doi: 10.5005/jp-journals-10071-23187
35. HUGO, T.B., K.L. HEADING, R.H. LABUC (2014): Canine cerebrospinal fluid total nucleated cell counts and cytology associations with the prevalence of magnetic resonance imaging abnormalities. *Vet. Med. Res.* 5, 75-84.  
doi: 10.2147/VMRR.S63805

36. KHASAWNEH, A.H., R.J. GARLING, C.A. HARRIS (2018): Cerebrospinal fluid circulation: what do we know and how do we know it?. *Brain Circ.* 4, 14-18.  
doi: 10.4103/bc.bc\_3\_18
37. KLIŠANIN, I. (2022): Dijagnostička točnost UK-NEQAS smjernica za određivanje hematogenih pigmenata u cerebrospinalnoj tekućini kod sumnje na subarahnoidalno krvarenje. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska.
38. KNEŽEVIĆ, P. (2020): Analiza likvora u dijagnostici meningitisa neurokirurških bolesnika. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska.
39. KÖNIG, H. E., H. G. LIEBICH (2008): Anatomija domaćih sisavaca. Naklada Slap, Zagreb.
40. KÖNNECKE, H., I. BECHMANN (2013): The Role of Microglia and Matrix Metalloproteinases Involvement in Neuroinflammation and Gliomas. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 914104.  
doi: 10.1155/2013/914104
41. LEVINE, G.J., J.R. COOK (2020): Cerebrospinal Fluid and Central Nervous System Cytology. *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* 5, 210-228.  
doi: 10.1016/B978-0-323-53314-0.00014-6
42. LEVINE, J. M., C.G. RUAUX, R.L. BERGMAN, J.R. COATES, J.M. STEINER, D.A. WILLIAMS (2006): Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. *A. J. Vet. Res.* 67, 283-287.  
doi: 10.2460/ajvr.67.2.283
43. LIPAR, M., B. PIRKIĆ, M. PEĆIN, B. RADIŠIĆ, O. SMOLEC, J. BUBIĆ ŠPOLJAR, B. ŠKRLIN, I. STOLIĆ (2020): Analiza cerebrospinalne tekućine u pasa s kralježničnim tumorom i hernijacijom intervertebralnog diska. *Vet. stanica* 51, 387-392.  
doi:0.46419/vs.51.4.6
44. LIU, C., M. YANG, L. LIU, Y. ZHANG, Q. ZHU, C. HUANG, H. WANG, Y. ZHANG, H. LI, C. Li, B. HUANG, C. FENG, Y. ZHOU (2020). Molecular basis of degenerative spinal disorders from a proteomic perspective (Review). *Mol. Med. Reports* 21, 9–19.  
doi: 10.3892/mmr.2019.10812

45. LIU, X.D., B.F. ZENG, J.G. XU, H.B. ZHU, Q.C. XIA (2006): Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of patients with lumbar disk herniation. *J. Proteomics* 6, 1019–1028.  
doi: 10.1002/pmic.200500247
46. MACIAS, C., W.M. MCKEE, C. MAY, J. F. INNES (2002): Thoracolumbar disc disease in large dogs: a study of 99 cases. *J. Small. Anim. Pract.* 43, 439-446.  
doi: 10.1111/j.1748-5827.2002.tb00010.x. PMID: 12400641
47. MAMIĆ, M., P. DMITROVIĆ, T. KOVAČ, V. PLICHTA, B. PIRKIĆ (2020): Liječenje pasa s grudno-slabinskim sindromom. *Vet. stanica* 51, 267-280.  
doi:10.46419/vs.51.3.4
48. MANGARAJ, M., R. NANDA, S. PANDA (2016): Apolipoprotein A-I: A Molecule of Diverse Function. *Indian J. Clin. Biochem.* 31, 253–259.  
doi: 10.1007/s12291-015-0513-1.
49. MLEKUSCH, R., C. HUMPEL (2009): Matrix metalloproteinases-2 and -3 are reduced in cerebrospinal fluid with low beta-amyloid1–42 levels. *Neurosci. Lett.* 466, 135–138.  
doi: 10.1016/j.neulet.2009.09.043.
50. OLBY, N.J., N.J. SHARP, K.R. MUNANA, M.G. PAPICH (1999): Chronic and acute compressive spinal cord lesions in dogs due to intervertebral disc herniation are associated with elevation in lumbar cerebrospinal fluid glutamate concentration. *J. Neurotraum.* 16, 1215–1224.  
doi: 10.1089/neu.1999.16.1215
51. RANSOM, B.R. (2016): The neuronal microenvironment. U: *Medical Physiology*. (Boron, W.F., E. L. Boulpaep, Eds.) Saunders Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania, 399-419.
52. REIBER, H. (2001): Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin. chim. acta* 310, 173-186.  
doi: 10.1016/s0009-8981(01)00573-3
53. RIOND, B., F. STEFFEN, O. SCHMIED, R. HOFMANN-LEHMANN, H. LUTZ (2014): Total protein measurement in canine cerebrospinal fluid: agreement between a turbidimetric assay and 2 dye-binding methods and determination of reference intervals using an indirect a posteriori method. *Vet. Clin. Path.* 43, 78-88.  
doi:10.1111/vcp.12107

54. ROERIG, A., R. CARLSON, A. TIPOLD, V.M. STEIN (2013): Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. *Vet. J.* 197, 253-258.  
doi: 10.1016/j.tvjl.2013.02.005
55. SCHMIDT, A., I. FORNE, A. IMHOF (2014): Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Syst. Biol.* 8, 1-7.  
doi: 10.1186/1752-0509-8-S2-S3
56. SENGUPTA, M.B., M. BASU, S. ISWARARI, K.K MUKHOPADHYAY, K.P. SARDAR, B. ACHARYYA, P.K. MOHANTY, D. MUKHOPADHYAY (2014): CSF Proteomics of Secondary Phase Spinal Cord Injury in Human Subjects: Perturbed Molecular Pathways Post Injury. *Plos one.* 9, e110885.  
doi: 10.1371/journal.pone.0110885
57. SMITH, L.J., N.L. NERURKAR, K. S. CHOI, B.D. HARFE, D.M. ELLIOTT (2011): Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: Lessons from development. *Dis. Model. Mech.* 4, 31–41.  
doi: 10.1242/dmm.006403.
58. SOYTÜRK, H., M. YILMAZ, C. ÖNAL, E. SUVEREN, Ü. KILIÇ (2021): Circulation of Cerebrospinal Fluid (CSF). *U Cerebrospinal Fluid.* (P.K. Bektaşoğlu, B. Gürer) IntechOpen, 1-12.  
doi: 10.5772/intechopen.99621
59. SPECTOR, R., S.R SNODGRASS, C.E. JOHANSON (2015): A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. *Exp Neurol.* 273, 57-68.  
doi: 10.1016/j.expneurol.2015.07.027
60. SUÑOL, A., S. GARCIA-PERTIERRA, K.M.E. FALLER (2021): Cerebrospinal fluid analysis in dogs: Main patterns and prevalence of albuminocytological dissociation. *Vet. Rec.* 188, 1-7.  
doi: 10.1002/vetr.27
61. THOMPSON, K., S. MOORE, S. TANG, M. WIET, D. PURMESSUR (2018): The chondrodystrophic dog: A clinically relevant intermediate-sized animal model for the study of intervertebral disc-associated spinal pain. *JOR spine.* 1.  
doi: 10.1002/jsp2.1011.



62. THOMSON, C.E., J.N. KORNEGAY, J.B. STEVENS (1990): Analysis of cerebrospinal fluid from the cerebellomedullary and lumbar cisterns of dogs with focal neurologic disease: 145 cases (1985–1987). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 19, 1841–1844.
63. TIPOLD, A., H. PFISTER, M. VANDEVELDE (1993): Determination of the IgG index for the detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in dogs using an elisa. *Res. Vet. Sci.* 54, 40–44.  
doi: 10.1016/0034-5288(93)90008-4
64. TOKUNAGA, S., K. YAMANOKUCHI, A. YABUKI, M. FUJIKI, K. MISUMI (2010): Cartilage Oligomeric Matrix Protein in Canine Spinal Cord Appears in the Cerebrospinal Fluid Associated With Intervertebral Disc Herniation. *Spine* 35, 4-9.  
doi: 10.1097/BRS.0b013e3181b61f14
65. TOPSAKAL, C., N. KILIC, F. OZVEREN, I. AKDEMIR, M. KAPLAN, M. TIFTIKCI, F. GURSU (2003): Effects of prostaglandin E1, melatonin, and oxytetracycline on lipid peroxidation, antioxidant defense system, paraoxonase (PON1) activities, and homocysteine levels in an animal model of spinal cord injury. *Spine* 28, 1643–1652.  
doi: 10.1097/01.BRS.0000083163.03910.B1.
66. TVARIJONAVICIUTE, A., F. TECLES, M. CALDIN, S. TASCA, J. CERÓN (2012): Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 73, 34–41.  
doi: 10.2460/ajvr.73.1.34
67. VERKHRATSKY, A., A. PIVORIŪNAS (2023): Astroglia support, regulate and reinforce brain barriers. *Neurobiol. Dis.* 179.  
doi: 10.1016/j.nbd.2023.106054
68. VERNAU, W., K.A. VERNAU, C. SUE BAILEY (2008): Cerebrospinal Fluid. U: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. (Kaneko, J.J., J.W. Harvey, M. L. Bruss, Eds), Academic Press, Massachusetts, 769–819.  
doi: 10.1016/B978-0-12-370491-7.00026-X
69. VITRINEL, B., H. W. KOH, F.M. KAR, S. MAITY, J. RENDLEMAN, H. CHOI, C. VOGEL (2019): Exploiting interdata relationships in next-generation proteomics analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 18, 5-14.  
doi: 10.1074/mcp.MR118.001246.

70. VUJČIĆ, H. (2021): Utjecaj mehaničke trakcije na smanjenje subakutne boli i stupnja onesposobljenosti uzrokovanih lumbalnom diskus hernijom. Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Republika Hrvatska.
71. WALSH, D. R., Z. ZHOU, X. LI, J. KEARNS, D.T. NEWPORT, J.J. MULVIHILL (2021): Mechanical properties of the cranial meninges: a systematic review. *J. Neurotraum.* 38, 1748-1761.  
doi: 10.1089/neu.2020.7288
72. WIECZOREK, E., A. OŻYHAR (2021): Transthyretin: From Structural Stability to Osteoarticular and Cardiovascular Diseases. *Cells* 10, 1768.  
doi: 10.3390/cells10071768
73. WIEDERKEHR, F. (1991). Analysis of cerebrospinal fluid proteins by electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* 569, 281–296.  
doi: 10.1016/0378-4347(91)80234-4
74. WINDSOR, R. C., B.K. STURGES, K.M. VERNAU, W. VERNAU (2009): Cerebrospinal fluid eosinophilia in dogs. *J. Vet. Intern Med.* 23, 275-28.  
doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0276.x
75. WINDSOR, R. C., K.M. VERNAU, B.K. STURGES, P.H. KASS, W. VERNAU (2008): Lumbar Cerebrospinal Fluid in Dogs with Type I Intervertebral Disc Herniation. *J. Vet. Intern Med.* 22, 954-960.  
doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0141.x
76. WOLBURG, H., A. LIPPOLDT (2002): Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vasc. Pharmacol.* 38, 323-337.  
doi: 10.1016/s1537-1891(02)00200-8

## 13. SAŽETAK

Proteomska analiza likvora u pasa s hernijacijom intervertebralnog diska

Andrea Starčević

Hernijacija intervertebralnog diska važna je i česta patologija kako u ljudi, tako i u pasa. Iako je slikovna dijagnostika (CT i MR) glavna rutinska metoda dijagnoze IVDH, nemoguće ju je primijeniti u otkrivanju ranog stadija bolesti, kao i objašnjavanju molekulskih procesa i interakcija proteina koji sudjeluju u patofiziologiji bolesti. Upravo s tim ciljem, provedena je kvalitativna i kvantitativna proteomska analiza likvora 6 zdravih pasa kao i 9 pasa s IVDH temeljena na spektrometriji masa koristeći algoritam SEQUEST u sklopu računalog programa Proteome Discoverer. Identificirano je 205 proteina likvora, od kojih je 75 jedinstvenih proteina diferencijalno eksprimirano. Genska ontologija ukazala je da su dobiveni proteini koji su uključeni u vezanje kalcija, oksidativni stres, metabolizam lipida, polimerizaciju kolagena, upalne procese i imunološki odgovor. Identificirani su proteini s dijagnostičkim potencijalom koji sudjeluju u neuropatskoj boli, mijelinizaciji, neuroinflamaciji i imunološkom odgovoru. Njihova klinička primjena olakšala bi dijagnostiku IVDH u ranoj fazi bolesti. Jedan od navedenih proteina, točnije paraoksonza 1 (PON1), koji ima ključnu ulogu u održavanju homeostatske ravnoteže intervertebralnog diska, analitički je validiran, no za kliničku primjenu u dijagnostici potrebna je validacija na većem broju pacijenata.

Ključne riječi: IVDH, proteomika, likvor, pas, PON1

## 14. SUMMARY

### Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in dogs with intervertebral disc herniation

Andrea Starčević

Intervertebral disc herniation is an important and common pathology in both humans and dogs. Although imaging diagnostics (CT and MR) is the main routine method of diagnosing IVDH, it can not be used to detect the early stage of the disease, as well as to explain the molecular processes and protein interactions involved in the pathophysiology of the disease. In this light, to decipher molecules involved in pathophysiology of IVDH, a qualitative and quantitative proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of 6 healthy dogs as well as 9 dogs with IVDH was performed using mass spectrometry-based proteomics. Using the SEQUEST algorithm integrated within Proteome Discoverer software, 205 cerebrospinal fluid proteins were identified, 75 of which were differentially expressed. Gene ontology indicated that the obtained proteins are involved in calcium binding, oxidative stress, lipid metabolism, collagen polymerization, inflammatory processes and immune response. Proteins with diagnostic potential involved in neuropathic pain, myelination, neuroinflammation and immune response were identified herein. Their clinical application of those molecules would facilitate the diagnosis of IVHD in the early stages of the disease. One of the differentially expressed proteins, more precisely paraoxonase 1 (PON1), which plays a key role in maintaining the homeostatic balance of the intervertebral disc, has been analytically validated, but for its clinical application in IVDH diagnostics, validation on a larger number of patients is required.

Key words: IVDH, proteomics, cerebrospinal fluid, dog, PON 1

## 15. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22.7.1996. u Gospiću.. Pohađala sam Osnovnu školu dr. Jure Turića, nakon čega sam upisala Opću gimnaziju, također u Gospiću. Srednju školu završila sam s odličnim uspjehom te sam 2015. godine upisala integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.