

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKÉ MEDICINE

ZBORNİK PREDAVANJA
XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE
ZNAJIA VETERINARA



UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE

**ZBORNİK PREDAVANJA XLIII SEMINARA
ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA**

Beograd, 2022.

XLIII SEMINAR ZA INOVACIJE ZNANJA VETERINARA

Beograd, 25.02.2022.

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

Organizacioni odbor:

Počasni predsednik: Prof. dr Milorad Mirilović, dekan

Predsednik: Prof. dr Danijela Kirovski

Članovi: Prof. dr Vanja Krstić, Doc. dr Milan Maletić, Doc. dr Slađan Nešić,
Doc. dr Ljubomir Jovanović, Asist. dr Branislav Vejnović, Maja Gabrić

Programski odbor:

Predsednik: Prof. dr Jakov Nišavić

Članovi: Prof. dr Ivan Jovanović, Prof. dr Vladimir Nešić, Prof. dr Nedeljko Karabasil, Prof. dr Dragan Šefer,
Prof. dr Sonja Radojičić, Prof. dr Ivan Vujanac, Doc. dr Miloš Vučićević



Izdavač:

Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Centar za izdavačku delatnost i promet učila

CID

Za izdavača:

Prof. dr Milorad Mirilović, dekan FVM

Urednik:

Prof. dr Dragan Gvozdić

Lektura i korektura:

Prof. dr Ivan B. Jovanović

Prof. dr Jakov Nišavić

Prof. dr Dragan Gvozdić

Dizajn korica:

Prof. dr Ivan B. Jovanović

Prelom teksta:

Gordana Lazarević

Štampa:

Naučna KMD, Beograd, 2022

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-46-2

NOVI LABORATORIJSKI PARAMETRI DIJAGNOSTIKE POREMEĆAJA FUNKCIJE BUBREGA KOD PASA I MAČKA

Milica Kovačević Filipović, Jelena Francuski Andrić,
Milena Radaković, Kristina Spariosu*

Procenjuje se da prevalenca bubrežnih bolesti u ukupnoj populaciji pasa i mačka iznosi oko 0,5% do 3%, ali da u gerijatrijskoj populaciji prevalenca hronične bubrežne bolesti dostiže čak 80%. Osim rasne predispozicije i starosti, kao faktori rizika navode se hiperkalcemija, bolesti srca, cistitis, urolitijaza, hipertireoidizam, periodontalni i metabolički poremećaji i hronične ili perzistentne infekcije. Stalni monitoring funkcije bubrega je neophodan da bi se uvela odgovarajuća terapija, koja može značajno da uspori progresivan tok gubitka funkcije bubrega koji prati bubrežne bolesti. Klasični markeri gubitka funkcije bubrega su koncentracija uree i kreatinina u serumu. Njihova koncentracija raste tek kada je rezervni kapacitet bubrega potrošen, odnosno kada propadne 75% svih nefrona. Na radionici će biti objašnjen i demonstriran značaj 1) simetričnog dimetilarginina (SDMA) kao novog, osetljivijeg markera premećaja funkcije bubrega, potom 2) značaj određivanja odnosa proteina i kreatinina u mokraći, kao i 3) potencijal primene elektroforeze na gelu poliakrilamida za detekciju proteina u urinu sa ciljem diferencijalne dijagnostike poremećaja funkcije glomerula, odnosno tubula.

Ključne reči: elektroforeza proteina mokraće, kreatinin, protein-kreatinin odnos, proteinurija, simetrični dimetilarginin

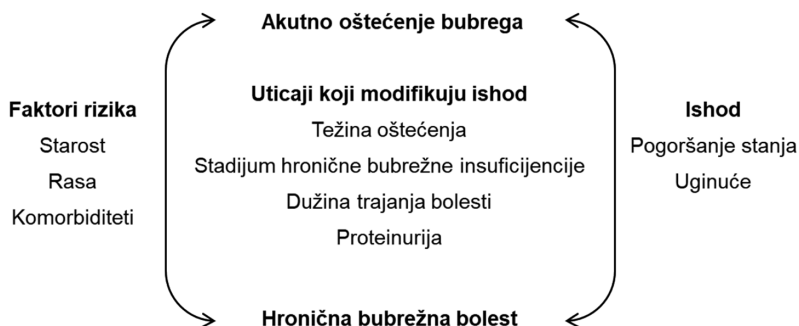
UVOD

Akutna i hronična bubrežna bolest i insuficijencija se relativno često dijagnostikuju kod kućnih ljubimaca. S obzirom na to da bubrezi imaju veliki funkcionalni kapacitet, pacijenti često stižu do veterinara tek kada je bolest već u terminalnom stadijumu, odnosno kada pas ili mačka imaju oliguriju ili anuriju i kada su laboratorijski parametri, koji pokazuju poremećaj funkcije bubrega, već toliko promenjeni

* Dr Milica Kovačević Filipović, profesor, dr Jelena Francuski Andrić, docent, dr Milena Radaković, naučni saradnik, dr Kristina Spariosu, istraživač saradnik, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

da je jasno da je poremećaj funkcije težak, odnosno da ne funkcioniše više od 75%, a često i više od 90% nefrona.

Poslednjih godina je postalo jasno da su akutna i hronična bubrežna bolest povezane i da je akutno oštećenje bubrega faktor rizika za razvoj hronične bubrežne bolesti, a da je hronična bolest faktor rizika na nastanak akutne insuficijencije bubrega (Slika 1). Akutne i hronične promene su faktor rizika za kardiovaskularne bolesti (Chawla i sar., 2014).



Slika 1. Povezanost akutnog oštećenja bubrega i hronične bubrežne bolesti.
Modifikovano u odnosu na Chawla i sar. (2014).

Akutno oštećenje bubrega (eng. *Acute Kidney Injury*, AKI) je termin koji je pre desetak godina zamenio široko rasprostranjeni engleski termin *Acute Renal Failure*, odnosno akutno otkazivanje bubrega. Akutno oštećenje bubrega se definiše kao naglo (u roku od nekoliko sati) povećanje kreatinina (CREA) u serumu, najčešće praćeno oligurijom, koje nastaje zbog strukturnih i funkcionalnih promena na bubrežima. Patofiziološki mehanizmi nastanka AKI često uključuju više faktora koji se preklapaju, od kojih su najčešći sepsa, ishemija i izloženost nefrotoksičnim agensima. Nastanak AKI može biti vezan za prerenalne, renalne i postrenalne poremećaje. Akutno oštećenje bubrega koje se razvija usled prerenalnih poremećaja, u koje spadaju pad krvnog pritiska i dehidracija, ima u osnovi kompenzatorni odgovor, koji organizam uključuje da bi se zaštitio od pada krvnog pritiska. Protok krvi kroz bubrege se smanjuje da bi se smanjilo stvaranje mokraće. Pojačano lučenje vazopresina i aldosterona povećava reapsorpciju vode u tubulima. Ti mehanizmi dovode do zadržavanja vode i eventualnog odgovarajućeg porasta krvnog pritiska. Ova faza kompenzacije se naziva „rani uspeh bubrega“. Da li će „rani uspeh bubrega“ da se pretvori u potpuno „spasavanje“ pacijenta, ili će se uspeh preokrenuti u neuspeh i rezultovati oštećenjem bubrežnih tubula, zbog dugotrajne ishemije i posledične nekroze, zavisi od težine i dužine primarnog poremećaja, kao i komorbiditeta, posebno vezanih za same bubrege. Bez obzira na uzrok, hronična bolest bubrega (CKD) se definiše kao ireverzibilni, progresivni gubitak funkcije bubrega i pad intenziteta glomerularne filtracije (eng. *Glomerular Filtration Rate*, GFR). Marker koji se najviše koriste da bi se dijagno-

stikovala i pratila progresija CKD su koncentracija uree i CREA u serumu i stepen proteinurije. Hronična bubrežna bolest zahvata cele nefrone, tako da uvek postoji i oštećenje tubula ili tubulointersticijalna bolest.

Podela težine oštećenja bubrega na stadijume

Članovi Međunarodnog društva za brigu o bubrežima (eng. *International Renal Interest Society*, IRIS) na svojoj internet stranici (<http://www.iris-kidney.com/>) redovno postavljaju preporuke važne za dijagnostiku i terapiju bubrežnih oboljenja pasa i mačaka. Preporuke u ovom radu su preuzete sa internet stranice IRIS-a.

Da bi se olakšao odgovarajući tretman i praćenje, AKI i CKD se moraju podeliti na različite stadijume bolesti (Tabela 1). Podela se zasniva na merenju serumskog CREA (posle 12h gladovanja) ili SDMA, ili u najboljem slučaju oba markera, ali kod hidriranih, stabilnih pacijenata. Pacijenti, psi i mačke, se potom dodatno dele na podgrupe na osnovu stepena proteinurije i porasta krvnog pritiska. Oslanjajući se na IRIS kriterijume, AKI i CKD se mogu svrstati u odgovarajuće stadijume bolesti i preporučiti terapije, odnosno može se prognozirati ishod terapije (Tabele 1 i 2).

Tabela 1. Stadijumi akutnog oštećenja bubrega, odnosno akutne bubrežne bolesti kod pasa i mačaka u odnosu na koncentraciju kreatinina i druge pokazatelje poremećaja strukture i funkcije bubrega.

AKI/AKD/ insuficijencija	Akutno oštećenje	Serumski CREA (pas) mačka	Pokazatelji oštećenja
Moguć brz oporavak	Stadijum 1	<(125) 140 µmol/L	bez azotemije, a) ali sa pokazateljima disfunkcije bubrega: povećan SDMA, proteinurija, granulirani/voštani cilindri, glukozurija, pozitivan ultrazvučni nalaz, i/ili b) oligurija ili anurija (< 1 mL/kg/h ili anurija tokom 6h) i/ili c) porastom CREA od 26 µmol/L tokom 48h, ili životinje koje za 48h po terapiji tečnošću odgovore smanjenjem koncentracije CREA i povećanjem volumena mokraće
	Stadijum 2	(126) 141-220 µmol/L	se razlikuje od prvog jer se tu svrstavaju životinje koje imaju blagu azotemiju (1,5x veća koncentracija CREA) i sve druge gore navedene pokazatelje disfunkcije bubrega. Svi znaci bolesti se povlače tokom terapije
Uginuće za 5 do 10 dana	Stadijum 3	221-440 µmol/L	progresivna azotemija (porast uree i CREA preko 3-10x ili više od 340 µmol/L) i ostali pokazatelji akutne bubrežne insuficijencije
	Stadijum 4	441-880 µmol/L	
	Stadijum 5	>881 µmol/L	

Tabela 2. Stadijumi hronične bubrežne bolesti kod pasa i mačaka u odnosu na koncentraciju kreatinina i simetričnog dimetilarginina.

Stadijum	Serumski CREA i SDMA (pas) mačka	Pokazatelji oštećenja
1	<(125) 140 µmol/L <(18) 18 µg/dL	Normalan serumski CREA ili normalan ili blago povišen SDMA. Drugi poremećaji prisutni: neadekvatna koncentraciona sposobnost bez prepoznatljivog nerenalnog uzroka bolesti (kod mačaka, ne kod pasa), abnormalan palpatorni, imidžing i patohistološki nalaz, proteinurija. Ukoliko se obavljaju serijska praćenja azotemije, uočljiv porast CREA. Perzistentno povećan SDMA preko 14 µg/dL.
2	(126) 141-250 µmol/L 18-(35) 25 µg/dL	Normalan ili blago povišen CREA. Donja granica ovog intervala je u okviru referentnih vrednosti mnogih laboratorija, ali neosetljivost CREA na promene GFR znači da mnogi pacijenti, čije se vrednosti CREA nalaze na gornjoj granici referentnih vrednosti, zapravo imaju poremećaj ekskrecije CREA. Blago povišen SDMA. Klinički znaci blagi ili odsutni.
3	251-440 µmol/L (36-54) 26-38 µg/dL	Umerena renalna azotemija. Klinička slika je varijabilna. Ukoliko nema kliničkih znakova, smatra se da je stadijum 3 u samom začetku, dok prisustvo kliničkih znakova označava kasni stadijum 3.
4	>440 µmol/L >(54) 38 µg/dL	Sistemske kliničke znake i uremijska kriza.

Kreatinin

Oštećenje tkiva bubrega vodi ka oštećenju njegove funkcije i smanjenju GFR, uz akumulaciju neproteinskog azota, odnosno uree i CREA u serumu. Koncentracija uree i CREA na prvom mestu odražava poremećaj funkcije, ali ne i stepen oštećenja glomerula.

Kreatinin nastaje razgradnjom kreatina i fosfokreatina u mišićima i njegova koncentracija u serumu zavisi od muskuloznosti životinje, pojedinih patoloških stanja i u manjoj meri od ishrane. Određivanje koncentracije CREA je ekonomično, ali postoje ograničenja vezana za njegov dijagnostički značaj povezan sa AKI:

1. Nivo CREA u serumu je viši što je životinja muskuloznija. Rabdomioliza može dovesti do brzog porasta CREA. Kod zdravih, gerijatrijskih pasa i mačaka, i pored smanjenja mišićne mase koja prati starenje, ne dolazi do značajnih promena u nivou kreatinina.
2. S obzirom na to da su referentne vrednosti za CREA relativno široke, u najvećem broju slučajeva se zapravo ne zna koja je njegova fiziološka, bazalna vrednost, te je evaluacija stanja samog pacijenta otežana.

3. Izolovano oštećenje tubulocita nije povezano sa koncentracijom CREA. Prerenalna i postrenalna azotemija, odnosno porast CREA u akutnom toku bolesti, nisu povezani za oštećenjem tkiva bubrega.
4. Kreatinin nije senzitivn marker smanjenja funkcije bubrega, jer je potrebno da bude oštećeno više od 75% funkcije bubrega da bi se njegova koncentracija povećala. S druge strane, CREA se nagomilava u organizmu, te njegova koncentracija ne odražava brze promene GFR.
5. Najrasprostranjenija metoda za određivanje kreatinina je Džafeova (*Jaffé*) metoda. Ovom metodom se dobijaju vrednosti koje su 25% više od stvarne koncentracije CREA, zbog interferencije sa različitim hromogenim materijama u serumu. Na tačnost ove metode posebno utiču hiperbilirubinemija i ketoacidoza. Zbog toga se preporučuje prelazak na nešto skuplju, ali precizniju enzimsku metodu određivanja CREA.

Urea

Urea se stvara u hepatocitima od amonijaka i CO₂ i putem krvi stiže do bubrega, filtruje se u potpunosti, ali se potom između 40% i 60% reapsorbuje u proksimalnim tubulocitima pasivno uz natrijum i vodu. Zbog toga je klirens uree manji od vrednosti GFR. Kada mokraćna sporije protiče kroz sistem tubula (npr. hipovolemija, dehidracija) dolazi do reapsorpcije veće količine uree u proksimalnim tubulocitima i povećanja njene koncentracije u plazmi, u većoj meri nego što je to slučaj sa CREA. Kada se mokraćna stvara u količini od 2 mL/min, izlučuje se oko 80% filtrovane uree, a kada je stvaranje oko 1-2 mL/min (što je najčešće kod zdrave jedinke) eliminiše se 50% filtrovane uree. Ukoliko se stvaranje mokraćne smanji ispod 1 mL/min izlučuje se svega 20% filtrovane uree. Ukoliko je stvaranje mokraćne smanjeno usled dehidracije, porast koncentracije uree u plazmi će biti veći nego porast CREA.

Osim sniženja GFR, na porast koncentracije uree u plazmi utiču i povećan unos proteina putem hrane, krvarenje u digestivni trakt, kao i pojačan katabolizam proteina tokom odgovora akutne faze.

Simetrični dimetilarginin

Novi i osetljivi marker pada GFR je SDMA. Simetrični dimetilarginin je aminokiselina arginin, koja sadrži dve metil grupe (dimetil) u simetričnoj orijentaciji, a njegova molekulska masa je duplo veća od CREA (SDMA 202 Da, CREA 113 Da). Prvi put je opisan u urinu ljudi pre 50 godina i od tada se vrše ispitivanja o njegovom značaju ne samo u humanoj, nego i u veterinarskoj medicini.

Smatra se osetljivim i ranim markerom opadanja GFR kod pasa i mačaka (Hokamp i Nabiti, 2016). Osetljiv je indikator poremećaja funkcije bubrega, čime se detektuje gubitak 25% nefrona, za razliku od povećanja koncentracije uree i CREA, čija se koncentracija povećava nakon gubitka više od 75% nefrona. Povećanje koncentracije SDMA se može uočiti kroz pad GFR (akutna i hronična

bubrežna insuficijencija) i kod bolesti koje imaju sekundarni uticaj na funkciju bubrega.

Simetrični dimetilarginin proizvode, konstantnom brzinom, sve ćelije sa jedrom, sa najvišom koncentracijom u mozgu (Hokamp i Nabiti, 2016), a izlučuju ga prvenstveno bubrezima. Dosadašnjim ispitivanjima je zaključeno da se ne reapsorbira u bubrenim tubulima i da na njega ne utiču ostali faktori kod pasa i mačaka. Kod mesojeda je pokazano da telesna masa i starost ne utiču na koncentraciju SDMA, kao što je to slučaj sa serumskim CREA (Hall i sar., 2014; Hall i sar., 2015).

Imunološki test za rutinsku upotrebu je nedavno patentirala firma IDEXX Laboratories. Međunarodno društvo za procenu bolesti bubrega, IRIS, je 2019. godine modifikovalo stadijume za procenu oštećenja bubrega (1-4) kod AKI i CKD, a na osnovu koncentracije CREA u serumu i SDMA, proteinurije i krvnog pritiska (Tabele 1 i 2).

Diskrepanca između kreatinina i simetričnog dimetilarginina kod hronične bubrežne bolesti

Određivanje stadijuma CKD, prema IRIS, se oslanja na koncentraciju CREA i SDMA. Međutim, nekada se može desiti da koncentracija CREA i SDMA budu u diskrepanci. U tim situacijama, preporuke za pse i mačke su sledeće:

1. Ukoliko je CREA ispod 125 mmol/L kod pasa, odnosno 140 mmol/L kod mačaka (stadijum 1 CKD), a SDMA perzistentno iznad 18 mg/dL, pacijent se mora tretirati kao da je CKD stadijum 2 bolesti.
2. Ukoliko je vrednost CREA u okviru stadijuma 2 CKD, a SDMA pokazuje da je u pitanju stadijum 3, pacijent se mora tretirati kao da je CKD stadijum 2 bolesti.
3. Ukoliko je vrednost CREA u okviru stadijuma 3 CKD, a SDMA pokazuje da je u pitanju stadijum 4, pacijent se mora tretirati kao da je CKD stadijum 2 bolesti.

Protein-kreatinin odnos u urinu kao pokazatelj oštećenja glomerula

Kvantitativna procena težine proteinurije je važan deo kompletne analize urina. Proteinurija nije samo rani marker oštećenja bubrega, već i faktor rizika za uremijsku krizu i smrt kod životinja sa CKD. Zbog toga je procena i rana intervencija kod pacijenta sa renalnom proteinurijom veoma važna. Protein-kreatinin odnos (*Urine Protein/Creatinin Ratio*, UP/C) je postao zlatni standard testa za otkrivanje proteinurije i trebalo bi ga primeniti kod svakog pacijenta, kod kojeg je proteinurija dokazana pomoću test tračice ili pozitivnim testom sa sulfosalicilnom kiselinom.

Za razliku od test tračica, UP/C pokazuje veću osetljivost za detekciju proteina (<5 mg/dL). Pored toga, na UP/C ne utiču specifična težina niti volumen urina.

Dodatna prednost određivanja UP/C je da dobro korelira sa dnevnim izlučivanjem proteina i stoga je praktičan, jer se proteinurija može proceniti u jednom uzorku urina, uzorkovanim slobodnim uriniranjem ili cistocentezom (Lees i sar., 2005). Prema IRIS, a na osnovu UP/C, klasifikacija pacijenata je sledeća: bez proteinurije, granična proteinurija ili proteinurija (Tabela 3).

Tabela 3. Klasifikacija proteinurije na osnovu odnosa proteina i kreatinina u urinu

IRIS klasifikacija	Psi	Mačke
Bez proteinurije	UP/C < 0,2	UP/C < 0,2
Granična proteinurija	UP/C ≥ 0,2 i ≤ 0,5	UP/C ≥ 0,2 i ≤ 0,4
Proteinurija	UP/C > 0,5	UP/C > 0,4

Iako se UP/C koristi za otkrivanje proteinurije, njegov značaj je i u prepoznavanju bolesti glomerula, praćenju odgovora na terapiju i može poslužiti kao prognostički indikator. Perzistentna proteinurija sa UP/C od 0,4 kod mačaka i 0,5 kod pasa, kada su prerenalna i postrenalna proteinurija isključene, javlja se kod hronične glomerulopatije ili tubulointersticijalne bolesti, dok UP/C 2,0 ukazuje na bolest glomerula (Lees i sar., 2005). Uz to, kod pasa i mačaka sa CKD, povišene vrednosti UP/C je indikacija da je pacijent u većem riziku od morbiditeta i mortaliteta. Snižene vrednosti UP/C ukazuju na pozitivan odgovor na terapiju za stanja povezana sa proteinurijom, ali do momenta pogoršanja azotemije.

Važno je napomenuti da se ovaj test ne preporučuje kod životinja sa aktivnim sedimentom urina, odnosno kada postoje piurija, hematurija ili bakteriurija. Naime, ukoliko je urin kontaminiran krvlju (>5% tj. crveni urin) dolazi do značajnog povećanja vrednosti UP/C (2,0), dok blaga kontaminacija krvlju usled cistocenteze (tj. 5-20 eritrocita/uveličanje 40×, ili čak >100 eritrocita/uveličanje 40× u urinu normalne boje) ne utiče na vrednosti UP/C (Jillings i sar., 2019). Imunosupresivne doze kortikosteroida mogu blago povećati UP/C u urinu kod pasa (Tinklenberg i sar., 2020). Takođe, na pouzdanost UP/C može uticati prisustvo aktivnog sedimenta urina (zapaljenje) ili hiperproteinemija veća od 90 g/L, što otežava tumačenje odnosa UP/C. Kada se prati UP/C, treba biti obazriv, jer se smanjenje vrednosti UP/C može naći kod pacijenata sa azotemijom, s obzirom na to da povećanje koncentracije CREA u krvi dovodi do njegove povećane tubularne sekrecije, odnosno, povećanja CREA u urinu i snižavanja vrednosti UP/C.

Da bi se izračunao UP/C neophodno je spektrofotometrijski odrediti koncentracije ukupnih proteina i CREA u istom uzorku. Najveći broj biohemijskih analizatora u veterinarskoj praksi za određivanje koncentracije ukupnih proteina koriste reagense sa bojama kao što su pirogalol crveno-molibdat (PRM) (Kuwahar i sar., 2008) i Coomassie briljantno plava (CBB) (Fiorina i sar., 2001). Oba testa su laka za izvođenje, relativno su brza i finansijski pristupačna. Međutim, iako su oba testa precizna, CBB testom su dobijeni veći odnosi, što može uticati na interpretaciju prema IRIS sistemu (Rossi i sar., 2016).

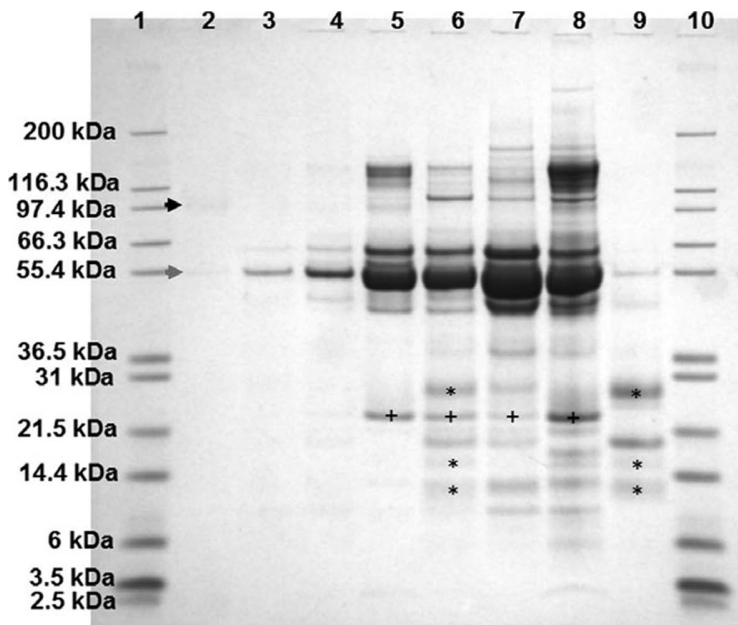
Za određivanje CREA u urinu koristi se *Jaffé* metoda ili enzimski kreatinin. Oba testa su u visokoj korelaciji. Za razliku od *Jaffé* metode, enzimski CREA ima manje interferirajućih faktora, ali znatno veću cenu i kraći rok trajanja. Na sobnoj temperaturi, UP/C je stabilan 4h, 12h na 4°C i 72h zamrznut na -20°C. Dobijene vrednosti za ukupne proteine i CREA se izražavaju u istim mernim jedinicama, a UP/C se dobija njihovim deljenjem.

Primena elektroforeze u identifikaciji markera oštećenja glomerula i tubula u urinu

Pored kvantitativne ocene proteinurije pasa i mačaka, koja je objašnjena u prethodnom poglavlju, imunohemijskim metodama se mogu odrediti koncentracije specifičnih proteina u urinu, koje mogu da ukažu na oštećenje pojedinih segmenata tubula. Međutim, te metode nisu dovoljno ekonomične za rutinsku praksu. Kvalitativnu analizu proteinurije je moguće izvesti detekcijom i klasifikacijom proteina u urinu na osnovu njihove veličine, odnosno kilodaltonaže. U tu svrhu se koriste SDS-AGE (eng. *Sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis*), SDS-PAGE (eng. *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) i *Western blot* metode. U savremenoj veterinarskoj laboratorijskoj dijagnostici, SDS-PAGE je prepoznata kao neinvazivna i precizna metoda na osnovu koje je moguće odrediti poreklo proteinurije.

Kod zdravih životinja, finalna mokraća ne sadrži proteine (ili se oni mogu detektovati u tragovima), zahvaljujući efikasnim mehanizmima glomerularne filtracije i tubularne reapsorpcije. Kvalitativna analiza proteina elektroforezom u urinu daje uvid u tzv. obrazac proteinurije, koji je prepoznatljiv za identifikovanje dela nefrona koji je zahvaćen poremećajem, odnosno može da pokaže da li su oštećeni glomeruli, tubuli ili čitav nefron (Schaefer i sar., 2011). Glomerularna proteinurija nastaje usled izmenjene selektivne propustljivosti filtracione barijere glomerula, usled čega se u finalnoj mokraći može naći povišena koncentracija proteina srednje (60-80 kDa) i velike molekulske mase (>80 kDa). Ukoliko su prisutni samo proteini srednje molekulske mase, poput albumina, u pitanju je selektivna glomerularna proteinurija. Kada su u urinu detektovani proteini velike molekulske mase, kao što je imunoglobulini G (IgG), to ukazuje na neselektivnu glomerularnu proteinuriju (Yalcin i Cetin, 2004). Proteini manje molekulske mase (<60 kDa), poput RBP (eng. *retinol-binding protein*) prolaze glomerularnu barijeru i bivaju reapsorbovani u proksimalnim tubulima. Ukoliko se ipak nađu u većim količinama u mokraći, njihovo prisustvo ukazuje na poremećaj u tubularnoj reapsorpciji, odnosno, reč je o tubularnoj proteinuriji. Kod oštećenja glomerularne barijere u kombinaciji sa poremećajem reapsorpcije u proksimalnim tubulima, može doći do kombinovane proteinurije. Ovo je najčešće posledica velikog opterećenja filtracije u glomerulima, odnosno velike količine filtrovanih proteina koja nije ispraćena proporcionalnom reapsorpcijom u tubulima, zbog zasićenja megalin-kubilin kompleksa (Vinge i sar., 2010).

Metoda SDS-PAGE je zlatni standard za kvalitativnu analizu proteina u urinu. Nakon što se pod neredukujućim uslovima proteini denaturišu, usmereni svojim negativnim naelektrisanjem, kreću se u gelu poliakrilamida i pozicioniraju shodno svojoj molekularnoj masi, odnosno veličini. Finalni rezultat je elektroforezogram (Slika 2), odnosno „obrazac“ koji pokazuje koji proteini dominiraju u analiziranom uzorku, na osnovu čega možemo reći da li je uzrok proteinurije na nivou glomerula, tubula ili celog nefrona.



Slika 2. Kvalitativna evaluacija proteinurije u uzorcima urina pasa, SDS-PAGE metoda

Albumin se najčešće može utvrditi u urinu, bilo da je reč o zdravim ili obolelim jedinkama i pozicionira se na 60 ± 10 kDa. Kod zdravih pasa i mačaka, takođe, u tragovima je moguće detektovati *Tamm-Horsfall* protein (100 kDa), a kod nekastriраниh mužjaka i proteine manje molekulske mase (8-9,5 kDa, 15-16 kDa i 26-27 kDa) (Hokamp i sar., 2018).

Yalcin i Cetin (2004) su putem SDS-PAGE analize urina detektovali 10 različitih proteina kod pasa sa nefropatijom, a Western blotom dalje potvrdili da su dominantno bili prisutni transferin, $\alpha 1$ -mikroglobulin, $\beta 2$ -mikroglobulin i RBP, sa glomerularnim oštećenjem kod 67% i tubularnim oštećenjem kod 33% pacijenata. Kod pasa sa CKD, služeći se SDS-PAGE tehnikom, pokazano je da u početnim fazama dominira glomerularno oštećenje, dok se napredovanjem bolesti, oštećenje širi i na tubule (Patitucci i sar., 2020). Istraživanje Meyer-Lindenberg i sar. (1997) je pokazalo da kod mačaka sa (histološki dokazanom) nefropatijom, proteini detektovani SDS-PAGE metodom imaju izmenjen obrazac čak i pre nego što je

došlo do promene koncentracije uree i CREA u plazmi. Mačke sa predispozicijom i one kod kojih je utvrđena CKD imaju dominantno glomerularnu proteinuriju (Gibaldi i sar., 2020). Kod infekcije mačaka morbilivirusom, za koji postoje indikacije da doprinosi nastanku CKD, utvrđena je dominantno tubularna proteinurija.

Primena SDS-PAGE metode se pokazala korisnom i kod oboljenja koje sekundarno dovode do oštećenja bubrega. Kod pasa sa hiperadrenokorticismom, utvrđeno je i glomerularno oštećenje, praćeno gubitkom albumina, i tubularna proteinurija. Psi, kojima je potvrđen sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (eng. *systemic inflammatory response syndrome*, SIRS), imali su proteinuriju prouzrokovanu prvenstveno oštećenjem tubula (58%), što je najviše bilo izraženo kod kuja sa piometrom (Schaefer i sar., 2011). Ova metoda je našla svoju primenu i u analizi proteina u urinu poreklom od pasa sa dijagnostikovanom lajšmaniozom (Zagarozza i sar., 2003) i dirofilariozom (Beristain-Ruiz i sar., 2013).

Tretman pacijenata sa hroničnom bubrežnom bolešću

Detaljne IRIS preporuke za terapiju bubrežnih bolesti su dostupne na internet stranici: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/recommendations.html>. Uopšteni pristup terapiji je sledeći:

1. Prestati sa davanjem nefrotoksičnih supstanci (i lekova),
2. Identifikovati i tretirati bilo koji postojeći prerenalni ili postrenalni poremećaj,
3. Isključiti mogućnost postojanja nefrolitijaze ili urolitijaze,
4. Izmeriti krvni pritisak i odrediti UP/C,
5. Sanirati dehidraciju,
6. Sniziti krvni pritisak ispod 160 mm Hg, smanjujući unos natrijuma i uz pomoć inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima. Pratiti efekat antihipertenzivne terapije,
7. Ukoliko je prisutna proteinurija, uvesti medicinsku ishranu,
8. Ukoliko su prisutni povraćanje i metabolička acidoza, adekvatno terapiirati.

ZAKLJUČAK

Ukoliko se akutna bubrežna bolest dijagnostikuje na vreme, promene su reverzibilne i, uz odgovarajuću terapiju, pacijent se može u potpunosti oporaviti. Laboratorijski pregled krvi i mokraće je od ključnog značaja za donošenje dijagnoze i prognoze. Ukoliko se uz pomoć primene SDMA, novog i osetljivog markera, koji vrlo rano u toku bolesti otkriva gubitak funkcije glomerula, utvrdi da se razvija CKD, mogućnosti terapije usmerene na usporavanje napredovanja bolesti su brojne, a psi i mačke, uz redovne kontrole, dugo vremena mogu imati zadovoljavajući kvalitet života.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-9/2021-14).

LITERATURA

1. Beristain-Ruiz DM, Carreton E, Rodriguez-Alarcon CA, Montoya-Alonso JA, Barrera R, 2013, SDS-PAGE analysis of urinary proteins in dogs with heartworm disease, *Iran J Vet Res*, 14, 3, 245-9.
2. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL, 2014, Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes, *N Engl J Med*, 371, 1, 58-66.
3. Fiorina JC, Aimone-Gastin I, Pitiot V, Guéant JL, 2001, Total urinary protein assays: pyrogallol red versus coomassie blue, *Ann Biol Clin*, 59, 2, 187-92.
4. Giraldi M, Paltrinieri S, Scarpa P, 2020, Electrophoretic patterns of proteinuria in feline spontaneous chronic kidney disease, *J Feline Med Surg*, 22, 2, 114-21.
5. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Jewell DE, 2014, Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease, *J Vet Intern Med*, 28, 6, 1676-83.
6. Hall J, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Melendez LD, Jewell DE, 2015, Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs, *J Vet Intern Med*, 29, 3, 808-14.
7. Hokamp JA, Leidy SLL, Gaynanova I, Cianciolo R, Nabity MB, 2018, Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease, *Vet Clin Pathol*, 47, 3, 425-34.
8. Hokamp JA, Nabity MB, 2016, Renal biomarkers in domestic species, *Vet Clin Pathol*, 45, 1, 28-56.
9. <http://www.iris-kidney.com/>
10. Jillings EKP, Squires RA, Azarpeykan S, Lopez-Villalobos N, 2019, Does blood contamination of urine compromise interpretation of the urine protein to creatinine ratio in dogs? *N Z Vet J*, 67, 2, 74-8.
11. Kuwahar Y, Nishii N, Takasu M, Ohba Y, Maeda S, Kitagawa H, 2008, Use of urine albumin/creatinine ratio for estimation of proteinuria in cats and dogs, *J Vet Intern Med*, 70, 8, 865-7.
12. Lees GE, Brown SA, Elliot J, Grauer GE, Vaden SL, 2005, Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum consensus statement (small animal), *J Vet Intern Med*, 19, 3, 377-85.
13. Meyer-Lindenberg A, Wohlsein P, Trautwein G, Nolte I, 1997, Urine protein analysis with the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in healthy cats and cats with kidney diseases, *Zentralbl Veterinarmed A*, 44, 1, 39-54.
14. Patitucci LT, Azeredo MV, Vericimo MA, Almosny NRP, Castro MCN, 2020, Electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of canine urinary proteins according to the stage of the chronic kidney disease, *Arq Bras Med Vet Zootec*, 72, 4, 1185-96.
15. Rossi, G, Bertazzolo W, Binnella M, Scarpa P, Paltrinieri S, 2016, Measurement of proteinuria in dogs: analytic and diagnostic differences using 2 laboratory methods, *Vet Clin Pathol*, 45, 3, 450-8.
16. Schaefer H, Kohn B, Schweigert FJ, Raila J, 2011, Quantitative and qualitative urine protein excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome, *J Vet Intern Med*, 25, 6, 1292-7.
17. Tinklenberg RL, Murphy SD, Mochel JP, Seo YJ, Mahaffey AL, Yan Y, Ward JL, 2020, Evaluation of dose-response effects of short-term oral prednisone administration on clinicopathologic and hemodynamic variables in healthy dogs, *Am J Vet Res*, 81, 4, 317-25.

18. Vinge L, Lees GE, Nielsen R, Kashtan CE, Bahr A, Christensen EI, 2010, The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis in the kidney, *Nephrol Dial Transplant*, 25, 8, 2458-67.
19. Yalcin AN, Cetin B, 2004, Electrophoretic separation of urine proteins of healthy dogs and dogs with nephropathy and detection of some urine proteins of dogs using immunoblotting, *Rev Med Vet*, 155, 2, 104-12.
20. Zagaroza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Duran E, Gonzalez M, Mane MC, 2003, SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis, *Vet Res*, 34, 2, 137-51.

NEW LABORATORY PARAMETERS FOR THE DIAGNOSTIC ALGORITHM OF KIDNEY FUNCTION DISORDERS IN DOGS AND CATS

**Milica Kovačević Filipović, Jelena Francuski Andrić,
Milena Radaković, Kristina Spariosu**

It is estimated that the prevalence of kidney disease in the total population of dogs and cats is about 0.5% to 3%, but in the geriatric population the prevalence of chronic kidney disease reaches as much as 80%. In addition to breed predisposition and age, hypercalcemia, heart disease, periodontal problems, cystitis, urolithiasis, hyperthyroidism, metabolic disorders, and chronic or persistent infections are listed as risk factors. Continuous monitoring of the renal function is important for timely and appropriate therapy management. Appropriate therapy can significantly slow down the progressive course of renal disease. The classic markers to test the loss of kidney function are concentration of urea and creatinine in the serum. Their concentration increases only when the reserve capacity of the kidneys is lost, ie. when 75% of all nephrons fail. The workshop will explain and demonstrate the importance of 1) symmetric dimethylarginine (SDMA) as a new, more sensitive marker of renal dysfunction, 2) determining the urine protein-creatinine ratio, as well as 3) differential diagnosis of glomerular or tubular proteinuria using polyacrilamid gel electrophoresis.

Key words: creatinine, proteinuria, symmetric dimethylarginine, urine protein electrophoresis, urine protein-creatinine ratio

**Organizaciju XLIII simpozijuma za inovacije znanja veterinara,
finansijski su podržale sledeće organizacije i preduzeća:**

Pokrovitelj

Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu
uz podršku Veterinarske komore Srbije

Veliki sponzori:

Ave & Vetmedic
Aevum pet care
Kinološki savez Srbije
Veterinarski institut dr Vaso Butozan

Sponzori:

VSI Kraljevo
VSI Jagodina
Naučni institut za veterinarstvo Srbije
Institut za higijenu u tehnologiju mesa
Marlofarma
Promedia
Vivogen
VS Bujanovac
Veterinarski zavod Subotica
Hrana produkt
Superlab
VSI Šabac
Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad
UVPS
VSI Niš
Krka Farma
Fishcorp 2000 feed
Evrolek
Zoolek
Biochem Balkan
VSI Subotica
VSI Sombor
VS Mladenovac
Naturavitalis
VSI Pančevo
VSI Zaječar
Lusa vet
Royal Vet
VSI Požarevac
Primavet

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије, Београд
636.09(082)

СЕМИНАР за иновације знања ветеринара (43 ; 2022 ; Београд)
Зборник предавања XLIII Seminara za inovacije znanja veterinara,
Београд, [25.02.2022.] / [urednik Dragan Gvozdić]. - Београд : Факултет
ветеринарске медицине, Центар за издавачку делатност и промет учила,
2022
(Београд : Научна КМД). - [7], 205 str. : ilustr. ; 24 cm

На врху насл. стр.: Универзитет у Београду. - Тираж 450. - Str. [3]:
Предговор / Milorad Mirilović, Danijela Kirovski. - Bibliografija uz
svaki rad. - Summeries. - Registar.

ISBN 978-86-80446-46-2

а) Ветерина - Зборници

COBISS.SR-ID 58357769