



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) hos hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration.

Hanna Olson

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:86*

N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) hos hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration.

Hanna Olson

*Huvudhandledare: Ingrid Ljungvall, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Jens Häggström, Institutionen för kliniska vetenskaper*

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: natriuretiska peptider, N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), hund, kronisk mitralisklaffdegeneration

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:86*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning.....	2
Syfte	2
Litteraturoversikt.....	3
Natriuretiska peptider	3
BNP	4
Kronisk klaffdegeneration.....	5
Patogenes och patofysiologi.....	5
Kliniska tecken.....	6
Diagnos.....	7
Material och metoder	7
Inklusionskriterier	7
Datainsamling.....	7
Ekokardiografi.....	7
Analysmetod.....	8
Statistisk analys	9
Resultat.....	9
Diskussion	12
Studiens svagheter.....	13
Slutsats	13
Litteraturförteckning	14

SAMMANFATTNING

Natriuretiska peptider är en grupp proteiner som via natriuretiska, diuretiska och vasodilaterande egenskaper reglerar vätskehomeostasen i kroppen (Levin *et al*, 1998). De frisätts bland annat när hjärtmuskelcellerna utsätts för stress och kan fungera som biomarkör för att utvärdera hjärtsjukdom. Analysering av typ B natriuretisk peptid (BNP) i blod kan komma att vara till hjälp för den praktiserande veterinären vid diagnostisering av hjärtsvikt och även vid uppskattning av grad av hjärtsjukdom. Det har även visat sig att BNP kan användas för att uppskatta prognosen hos hundar med kronisk klaffdegeneration (Chetboul *et al*, 2009; Moonarmart *et al*, 2010).

Kronisk klaffdegeneration är den vanligaste hjärtsjukdomarna hos hund och drabbar fram för allt små till medelstora hundar från medelåldern och uppåt (Kogure, 1980). Atrioventrikulärklaffarna, vanligtvis mitralis, blir nodulärt förtjockade med inlagring av glukosaminoglykaner och fibrosvävnad vilket leder till klaffinsufficiens. Sjukdomen har ett långsamt förlopp, ofta över flera år, och kan i slutändan leda till hjärtsvikt.

Syftet med arbetet var att undersöka serumnivåerna av N-terminal pro B-typ natriuretisk peptid (NT-proBNP) hos hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration i olika stadier. I studien ingick 48 hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration samt 21 friska kontrollhundar. Vi fann att nivåerna av NT-proBNP ökade med ökad grad av kronisk mitralisklaffdegeneration ($P < 0,0001$). Den största stegringen av NT-proBNP hittades hos hundar med kraftig kronisk mitralisklaffdegeneration, ett fynd som kan vara av värde vid handläggning av hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration.

SUMMARY

Natriuretic peptides are a group of proteins with natriuretic, diuretic and vasodilatory properties, which are important for regulating the fluid homeostasis in the body and blood pressure (Levin *et al*, 1998). They are released from cardiac myocytes in case of myocardial stress and may function as a biochemical marker for cardiac disease. Analysis of BNP in blood may be helpful for the practicing veterinarian to diagnose heart failure, but also for obtaining an objective measurement of disease severity.

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is the most common cardiac diseases in dogs, affecting older, small to medium sized dogs (Kogure, 1980). The atrioventricular valves, usually the mitral valve, become thickened with nodular deposits of glycosaminoglycans and fibrous tissue, which lead to insufficiency of the valve. The disease has a slow progression, often over several years, and may lead to heart failure.

The aim of this study was to investigate the serum levels of N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in dogs with chronic mitral valve degeneration in different stages. 48 dogs with chronic mitral valve degeneration and 21 healthy control dogs were included in the study. We found that the levels of NT-proBNP increased with severity of the mitral valve degeneration ($P < 0.0001$). The largest increase of NT-proBNP was found in dogs with severe disease, which suggests that the test may be useful for managing dogs with MMVD.

INLEDNING

Analysering av natriuretiska peptider, som frisätts vid olika typer av hjärtpåverkan, har länge använts som ett komplement till mera traditionella metoder vid diagnostisering av vissa hjärtsjukdomar hos människor (van Kimmenade *et al*, 2009). Ett flertal studier på hundar har uppvisat lovande resultat när det gäller användning av natriuretiska peptider, framförallt typ B natriuretic peptide (BNP), vid diagnostisering av hjärtsjukdom (Boswood *et al*, 2008; Tarnow *et al*, 2009)

Syfte

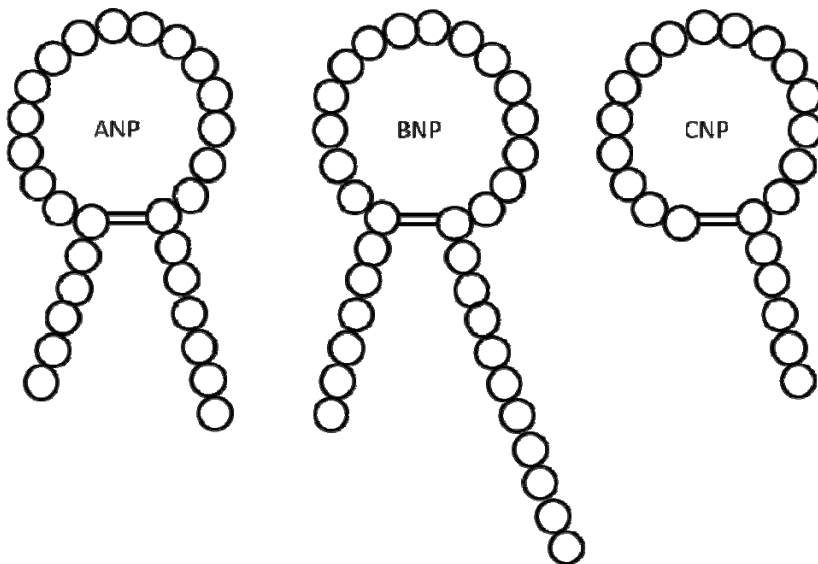
Syftet med detta arbete var att undersöka serumnivåerna av N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) hos hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration i olika stadier.

LITTERATURÖVERSIKT

Natriuretiska peptider

Natriuretiska peptider är en grupp proteiner som är lika varandra både strukturmässigt (se figur 1) och funktionellt (Levin *et al*, 1998). Dess huvudfunktion i kroppen är att reglera vätskehomeostasen och skydda cirkulationssystemet från effekterna av en volymsöverfyllnad. Den skyddande effekten utgörs till största delen av vasodilatation, natriures och diures. Hittills har man identifierat fem olika typer av natriuretiska peptider; atrial natriuretic peptide (ANP), typ B natriuretic peptide (BNP), C-type natriuretic peptide (CNP), dendroaspis natriuretic peptide (DNP) samt ventricular natriuretic peptide (VNP) (van Kimmenade *et al*, 2009). Av dessa förekommer ANP, BNP samt CNP hos däggdjur.

Figur 1. Strukturell uppbyggnad av ANP, BNP och CNP.



De natriuretiska peptiderna karakteriseras av en ringstruktur bestående av 17 aminosyror (Levin *et al*, 1998; Vesely *et al*, 2003; Meyer *et al*, 2008). Till denna ring är det kopplat olika många aminosyror beroende på vilken natriuretisk peptid det handlar om, ANP består av totalt 28 aminosyror, BNP av 32 och CNP av 23 aminosyror.

ANP produceras och lagras i granula i kardiomyocyter i både höger och vänster förmak (Levin *et al*, 1998). Syntes och utsöndring av proteinet sker när förmaksväggarna tänjs ut till följd av ökad blodvolym eller ökat blodtryck (Vesely, 2003). Eftersom det finns färdigbildat ANP i kardiomyocyterna fås en snabb frisättning vid stimulering och ANP fungerar därför som en bra indikator på akut volymöverbelastning. Urodilatin är en peptid som är mycket snarlik ANP i sin struktur, men produceras till skillnad från denna endast i distala njurtubuli. Vidare återfinns den bara i urin och inte i blodet som de övriga natriuretiska peptiderna. Urodilatin verkar lokalt i njuren och dess funktion är framför allt att inhibera natriumreabsorptionen. BNP produceras i både förmak och kammare. Under normala

förhållanden sker produktionen till största delen i förmaken men vid patologiska processer i kamrarna ökar BNP syntesen i kammarkardiomyocyterna kraftigt. Till skillnad från ANP finns inget färdigbildat BNP i kardiomyocyterna utan det sker en nysyntes efter stimulering. CNP förekommer på en mängd olika ställen i kroppen såsom centrala nervsystemet, endotelceller, chondrocyter, njurar och hypofysen (van Kimmenade *et al*, 2009). CNP agerar i CNS som neurotransmittor och cirkulatoriskt har den en kraftigt vendilaterande effekt. Till skillnad från ANP och BNP har CNP ingen stor natriuretisk eller diuretisk funktion. Dendroaspis natriuretic peptide (DNP) har än så länge bara identifierats i giftet från den gröna mamban (*Dendroaspis angusticeps*) (Schweitz *et al*, 1992). Man vet inte riktigt vilken funktion DNP har, men det är möjligt att dess vasodilaterande egenskaper underlättar toxinupptag hos djur som blivit bitna av den gröna mamban. Ventricular natriuretic peptide (VNP) finns i kardiomyocyter hos strålfeniga benfiskar, såsom laxfiskar och ål (van Kimmenade *et al*, 2009). Av de olika natriuretiska peptiderna som finns beskrivna verkar BNP vara bäst lämpad vid diagnostisering av klinisk hjärtsjukdom hos människor och hundar. (Doust *et al*, 2004; Boswood *et al*, 2008; Tarnow *et al*, 2009)

BNP

Typ B natriuretic peptide syntetiseras i form av pre-proBNP i kammarkardiomyocyterna och klyvs sedan till proBNP (Daniels *et al*, 2007). Därefter klyvs proBNP ner av serumproteaser till lika stor mängd biologiskt aktivt BNP och inaktivt N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP). Eftersom BNP har en mycket kortare halveringstid i blodet än NT-proBNP används den sistnämnda med fördel.

Den absolut viktigaste faktorn som ger ökad cirkulatorisk koncentration av BNP är uttänjning av kammarkardiomyocyter till följd av tryck-/volymsöverfyllnad samt hypoxi (van Kimmendale *et al*, 2009). Andra stimuli är angiotensin II, interleukin -1beta, endothelin-1 samt adrenerga agonister. Det finns tre typer av receptorer för de natriuretiska peptiderna (NRP): NRP-A, NRP-B samt NRP-C (Meyer *et al*, 2008): varav BNP binder till NRP-A och NRP-C. NRP-A finns bland annat i perifera blodkärl, aorta, förmak, kammare, njurtubuli, glatt muskulatur i njurarna och i de presynaptiska sympatiska nervfibrerna medan NRP-C är lokaliserade till binjurar, njurar, endotelceller, lungor och hjärna. Alla natriuretiska peptider binder till NRP-C som är en så kallad clearance receptor vilket betyder att den är involverad i elimineringen av de natriuretiska peptiderna från cirkulationen (Levin *et al*, 1998). När de natriuretiska peptiderna binder till denna receptor startar en enzymatisk nedbrytning av peptiderna varefter de återgår till cirkulationen för att slutligen utsöndras via njurarna.

Den fysiologiska effekten av BNP utgörs av vasodilatation, nedreglering av Renin – Angiotensin II – Aldosteron Systemet (RAAS), minskad frisättning av endothelin-1 samt att de motverkar aktiviteten av det sympatiska nervsystemet (Suzuki *et al*, 2001; Meyer *et al*, 2008). Vidare har BNP vissa antiproliferativa och antifibrotiska egenskaper samt verkar relaxerande på hjärtmuskeln (van Kimmenade *et al*, 2009). När RAAS aktiveras fås ett ökat blodtryck, ökad blodvolym samt ökat upptag av Na⁺, Cl⁻ och vatten från njurens distala tubuli och samlingsrör. Endothelin-1 är en peptid med vasokontraherande egenskaper som, vid

exempelvis ökat tryck i höger förmak och lungkärl, frisätts från kärlendotel och kardiomyocyter. En aktivering av det sympatiska nervsystemet leder bland annat till perifer vasokonstriktion. Genom att hämma ovanstående leder BNP-frisättning således till minskat blodtryck, natriures och diures. Den antiproliferativa och antifibrotiska effekten uppkommer genom hämning av DNA syntesen i hjärtats fibroblaster (Cao *et al*, 1995).

Oyama *et al*, 2008 visade att hundar med hjärtsjukdom (dilaterad kardiomyopati och kronisk klaffdegeneration) hade signifikant mycket högre nivåer av NT-proBNP än friska kontrollhundar. I samma studie erhöles även en signifikant skillnad i nivåer av NT-proBNP hos hundar med hjärtsjukdom utan hjärtsvikt jämfört med de hundar som hade utvecklat hjärtsvikt. Det har även visats att den cirkulatoriska koncentrationen av NT-proBNP/BNP är signifikant mycket högre hos hundar med hjärtsvikt än hos hundar med primär respiratorisk sjukdom (DeFrancesco *et al*, 2007; Prošek *et al*, 2007; Boswood *et al*, 2008). Således kan analysering av NT-proBNP vara till hjälp för att utesluta, eller konfirmera, hjärtsvikt som grundorsak till respiratoriska sjukdomstecken.

Kronisk klaffdegeneration

Kronisk klaffdegeneration är en av de vanligaste hjärtsjukdomarna hos hund (Kogure, 1980). Den förekommer hos alla hundraser men ses framför allt hos små till medelstora hundraser såsom cavalier king charles spaniel (CKCS), tax, chihuahua, pudel och papillon (Egenvall *et al*, 2006). Prevalensen av kronisk klaffdegeneration ökar med åldern. Hanar drabbas i större utsträckning än honor och sjukdomen har även ett snabbare förlopp och debuterar tidigare hos hanhundar än hos tikar. Karakteristisk för sjukdomen är nodulär förtjockning av atrioventrikulärklaffarna, vanligen mitralis, vilket så småningom leder till klaffinsufficiens (Kogure, 1980). Klaffinsufficiens gör att blodet åker tillbaka upp i vänstra förmaket som då dilaterar. Blodvolymen ökar för att bibehålla hjärtats slagvolym vilket leder till kompensatorisk eccentric hypertrofi av vänster kammare (Häggström *et al*, 2005).

Patogenes och patofysiologi

Kronisk mitralisklaffdegeneration karaktäriseras av en ackumulering av glukosaminoglykaner (myxomatös degeneration) och fibrosvävnad i atrioventrikulärklaffarna och corda tendinae (Häggström *et al*, 2005). Det är fortfarande oklart vad det är som initierar dessa morfologiska förändringar. Hos CKCS och tax har man dock påvisat en ärftlighet avseende uppkomsten av kronisk klaffdegeneration (Swenson *et al.*, 1996; Olsen *et al.* 1999). Klaffdefekterna leder till att klaffarna börjar röra sig onormalt med prolaberering upp i förmaket och blod börjar läcka tillbaka upp i detsamma. Den onormala rörelsen och regurgitationen ger ett ökat slitage på klaffarna. Slitaget aktiverar fibroblastceller i klaffarna vilket leder till ytterligare myxomatös degeneration och fibros (Black *et al*, 2005). Klaffarna blir successivt tjockare, mer kontraherade och oregelbundna i formen.

I takt med att de morfologiska förändringarna i klaffarna fortskrider ökar regurgitationen tillbaka upp i förmaket (Olsen *et al*, 1999; Pedersen *et al*, 1999). Detta leder till en successivt ökad volymöverbelastning i förmaket som dilaterar till följd av detta (Häggström *et al*, 2005).

En annan följd av successivt ökat återflöde upp i förmaket är att slagvolymen minskar och blodtrycket sjunker. För att kompensera detta och upprätthålla blodtrycket sker en ökning av blodvolymen, vilket ställer krav på ökad kontraktionskraft och därmed initierar eccentric hypertrofi av vänster kammare. Dilatationen av vänster kammare leder i sig till att mitralisregurgitationen ökar ytterligare. En annan följd av en blodtryckssänkning är sympaticuspåslag (de Moraes *et al*, 2005). Baroreceptorer i aortabågen känner av trycksänkningen och skickar signaler till vasomotorcentrum i hjärnan att utsöndra noradrenalin, som stimulerar β -1 receptorer i hjärtat, vilket leder till ökad hjärtfrekvens och slagkraft. Kronisk aktivering av det sympatiska nervsystemet gör att det sker en remodulering med bland annat fibrosbildning i hjärta och kärl. Hjärtat måste då arbeta mot ett kraftigare motstånd, vänster kammare får en allt sämre funktion, kardiomyocyterna får ett ökat syrebehov och ventrikulära arytmier kan förekomma.

I början av sjukdomen sker storleksökningen av vänster förmak och kammare relativt långsamt för att sedan drastiskt öka 6-12 månader innan hundarna utvecklar hjärtsvikt (Lord *et al*, 2010). När hjärtat och de icke-kardiogena kompensatoriska mekanismerna inte längre klarar av att motverka effekten av det allt mer tilltagande mitralisregurgitationen, minskar hjärtminutvolymen och trycket i lungartären ökar. Detta leder till lungödem och vänstersidig hjärtsvikt (Häggström *et al*, 2005). Lunghypertension kan även utvecklas, vilket i sin tur kan leda till högersidig hjärtsvikt som följd av ökat tryck i *vena cava caudalis*, vilket leder till leverstas och ascites. Med hjärtsvikt menas ett tillstånd då hjärtmuskeln inte förmår att pumpa ut tillräckligt mycket blod i kroppen för att tillgodose dess behov vilket ger en minskad slagvolym, sänkt cardiac-output och minskat blodtryck (de Moraes *et al*, 2005). Hjärtsvikt leder till en aktivering av det sympatiska nervsystemet och en nedreglering av det parasympatiska. En volymöverbelastning på hjärtat, exempelvis som följd av kronisk mitralisklaffdegeneration, gör att hjärtmuskeln sträcks ut. Enligt Frank-Starling mekanismen kommer en ökad fyllnad ge en ökad kontraktion av hjärtmuskeln för att upprätthålla slagvolymen. När de kompensatoriska mekanismerna inte längre klarar av att motverka den allt sämre hjärtfunktionen blir cirkulationen kraftigt nedsatt och det utvecklas en icke-kompenserad hjärtsvikt. Högersidig icke-kompenserad hjärtsvikt leder till systemisk venstas som bland annat kan yttra sig som leverstas och ascites, medan vänstersidig svikt ger upphov till lungödem.

Kliniska tecken

Kliniska tecken hos hundar som lider av kronisk mitralisklaffdegeneration är mycket varierande och beror på hur långt gången sjukdomen är (Borgarelli *et al*, 2010). Sjukdomen har ett långsamt förlopp, vanligtvis över flera år, och många hundar hinner dö av andra orsaker innan de utvecklar hjärtsvikt till följd av kronisk mitralisklaffdegeneration. I tidigt skede är hundarna asymtomatiska och det enda man upptäcker vid en klinisk undersökning kan vara ett blåsljud över mitralisområdet. Vid utvecklande av hjärtsvikt ses kliniska tecken som nedsatt cirkulation, trötthet, tackycardi, förlust av respiratorisk sinusarrytmi, motionsintolerans, tachypne/dyspne, hosta, ascites (vid högersidig hjärtsvikt), viktförlust, inappetens samt svimning (Häggström *et al*, 2005). I en del fall kan vänster förmak rupturera

och orsaka en hjärttamponad. Plötslig död kan uppkomma som följd av rupturerade chorda tendinae.

Orsaker till hosta relaterade till kronisk klaffdegeneration är lungödem till följd av utvecklad hjärtsvikt samt kompression av huvudbronkerna av ett förstorat vänster förmak (Boragelli *et al*, 2010).

Diagnos

Förekomst av ett systoliskt blåsljud med högst intensitet över mitralisområdet och eventuellt ett förstorat hjärta på röntgen hos en hund med för sjukdomen typisk ras och ålder leder till stark misstanke om kronisk mitralisklaffdegeneration. För definitiv diagnos krävs att misstanken verifieras med hjälp av en ultraljudsundersökning. Typiska förändringarna som ses är förtjockning och/eller prolaps av en eller båda mitralisklaffarna samt förekomst av regurgitation över desamma (Boragelli *et al*, 2010). I takt med att regurgitationen över klaffarna ökar fås en vänstersidig volymöverbastning med ökad vänster förmak- och kammarstorlek som följd.

MATERIAL OCH METODER

Studien har blivit godkänd i en etisk prövning. Djurägarna fick skriftlig information om studiens innehåll och utförande. De gav därefter ett skriftligt medgivande, i vilket de informerades om att studien var frivillig och att de när som helst kunde välja att lämna studien.

Inklusionskriterier

I studien ingick privatägda hundar av olika raser som antingen var kliniskt friska eller visade tecken på kronisk mitralisklaffdegeneration utan tecken på annan sjukdom. Hundar äldre än 2 år och med en vikt under 15 kg inkluderades i studien. Hundar som led av hjärtsvikt, med eller utan medicinering, inkluderades i studien. Hundarna rekryterades genom att uppfödare blev kontaktade, men även hundar som kom för rutinkoll samt akuta hjärtsviktspatienter blev inkluderade.

Datinsamling

Hundarna genomgick en klinisk undersökning, blodtrycksmätning, blodprovstagning samt ekokardiografi. Samtliga uppgifter fördes in i ett protokoll

Ekokardiografi

Ekokardiografi användes för att diagnostisera och gradera kronisk mitralisklaffdegeneration. Hundarna var osederade och undersöktes liggandes på både höger och vänster sida. För att ställa diagnosen kronisk klaffdegeneration krävdes att hundarna hade karakteristiska förändringarna på mitralisklaffarna (förtjockade och/eller prolaps upp i vänster förmak) samt regurgitation över mitralisklaffarna. Regurgitationen identifierades med hjälp av en

färgdoppler och delades in i avsaknad av/minimal, mild (<30%), måttligt (<30-50%) och kraftigt (>50%) regurgitation. Undersökningar och mätningar utfördes av samma veterinär.

Gradering av kronisk mitralisklaffdegeneration (normal/minimal, mild, måttlig eller kraftig) baserades på LA/Ao kvoten, som är ett mått på vänster förmaksstorlek, samt storlek på mitralisregurgitationen (MR). LA/Ao kvoten fås genom att dividera diametern på vänster förmak (LA) med diametern på aortaroten (Ao). Ju högre kvot desto större förmak. Graderingen skedde enligt följande; normal/minimal (LA/Ao <1,5 och avsaknad av/minimal MR), mild (LA/Ao ≤ 1.5 och MR < 30%), måttlig (LA/Ao < 1.8 och MR < 50%) samt kraftig (LA/Ao ≥ 1.8 och MR > 50%). Vänster kammars innerdiameter i slut diastole; end-diastolic left ventricular internal dimension (LVIDd) och vänster kammars innerdiameter i slut-systole; end-systolic left ventricular internal dimension (LVIDs) uppmättes med M-mode analyser. Kammarstorleken är beroende av djurens storlek/vikt. Värden för procentuell ökning av LVIDd (LVIDd_{inc}) och LVIDs (LVIDs_{inc}) räknades ut enligt följande: ((observerad diameter – förväntad diameter)/(förväntad diameter x 100)). Den förväntade normala diameterna för de olika måtten räknades ut på följande vis; LVIDd (LVIDd = kroppsvikt(kg)^{0.294} × 1.53) och LVIDs (LVIDs = kroppsvikt(kg)^{0.315} × 0.95) (Cornell *et al*, 2004).

Analysmetod

Blodprov togs i serumrör från *vena jugularis* på samtliga hundar. Serum centrifugerades av och förvarades i -80° C till dess att analysen utfördes. Analyserna gjordes med VetSign™ Canine CardioSCREEN, som är en sandwich Enzyme Immuno Assay (EIA) som mäter mängden immunoreaktivt NT proBNP i blodserum från hund. Provhantering, testutförande och avläsning skedde enligt tillverkarens användarmanual. Testplattorna var coatade med polyklonala får-antikroppar mot NT-proBNP. I varje provbrunn tillsattes detektionsantikroppar konjugerade med horseradish peroxidas (HRP) samt provmaterial (serum). De konjugerade antikropparna bands till det NT-proBNP som fanns i provet, som i sin tur bands till de antikroppar som plattan var coatad med. Därefter tvättades plattorna för att få bort allt obundet material. Sedan tillsattes ett substrat, tetrametylbenzidin (TMB), som reagerar med HRP och ger en blå färg. Mängden färg som bildas är direkt korrelerad till mängden NT-proBNP. Slutligen tillsattes en stopplösning, absorbansen avlästes vid 450 nm och räknades sedan om till koncentration NT-proBNP i provet.

Tolkning av de uppmätta värdena av NT proBNP hos patienter med kliniska tecken på hjärtsvikt är enligt tillverkaren följande:

- <900 pmol/L – sannolikhet att kliniska sjukdomstecken är orsakade av hjärtsvikt är låg.
- 900-1800 pmol/L – gråzon
- >1800 pmol/L – sannolikhet att kliniska sjukdomstecken är orsakade av hjärtsvikt är hög.

Testets högsta detektionsnivå var 3000 pmol/L och värden som översteg detta registrerades som > max. Dessa prover späddes 2 eller 3 gånger och analyserades om. Ingen nedre detektionsgräns för testet fanns angivet.

Statistisk analys

Den statistiska analysen genomfördes med analysprogrammet JMP version 8.0.1. Kruskal-Wallis test användes för att undersöka samband mellan NT-proBNP och de fyra kronisk klaffdegenerationsgrupperna. Om ett signifikant samband ($P < 0,05$) förelåg vid gruppjämförelsen utfördes sedan en parvis jämförelse med bruk av Mann Whitney U-test med Bonferroni korrektion (statistisk signifikans vid $P < 0,008$). Unilinjär regressionsanalys utfördes för att utvärdera samband mellan NT-proBNP och ålder, kön, vikt, LA/Ao, LVIDd inc% samt LVIDs inc%.

RESULTAT

I studien ingick 69 stycken hundar. 51 st. hundar var av rasen Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) och resterande 18 utgjordes av Tax (7 st.), blandrashundar (3 st.), Jack Russel Terrier (2 st.), Chinese Crestes Powder Puff (1 st.), Dvärgpudel (1 st.), Norfolkterrier (1 st.), Shetland Sheepdog (1 st.), Shih-Tzu (1 st.) samt 1 st. Tibetansk Spaniel. Medianåldern var 7,7 år (interquartile range, IQR, 6,0-9,7 år) och medianvikten 9,4 kg (IQR 7,7-10,3 kg). Sammanfattande data för de olika graderna av kronisk mitralisklaffdegeneration ses i tabell 1.

Tabell 1. Hunddata relaterat till grad av kronisk mitralisklaffdegeneration

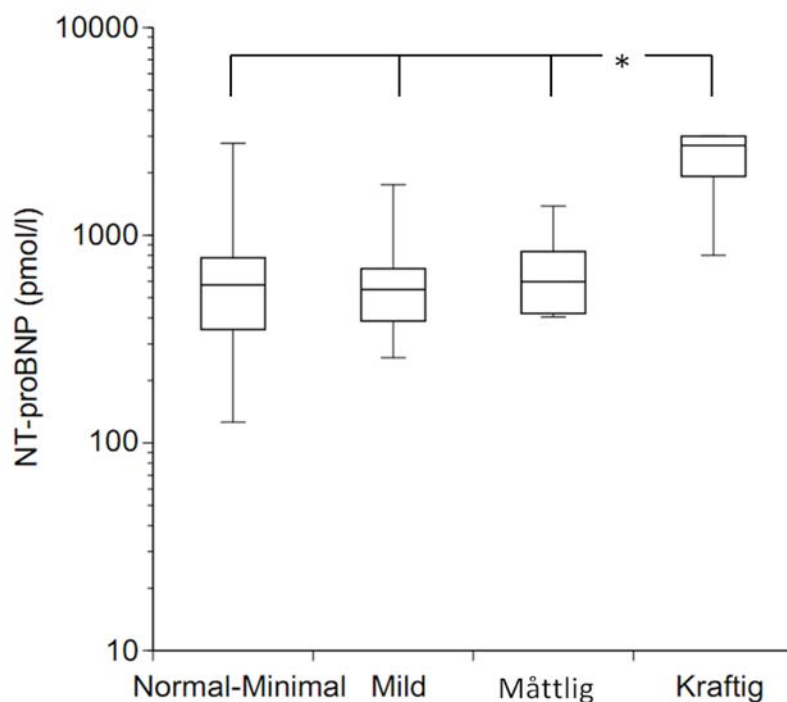
	Normal-minimal	Mild	Måttlig	Kraftig	Totalt
Antal	21	23	8	17	69
Ålder (år)	5,0 (3,0-6,4)	7,1 (6,2-10,4)	9,1 (7,0-10,2)	9,4 (8,7-10,5)	
Kön (tik/hane)	14/7	15/8	5/3	5/12	39/30
Vikt	8,1 (7,0-10,0)	9,6 (8,0-10,6)	8,9 (7,6-10,4)	10 (7,8-11,7)	
NT-proBNP (pmol/L)	474 (352-779)	473 (386-690)	529 (420-836)	3000 (1922-3000)	
LA/Ao	1,2 (1,1-1,2)	1,3 (1,2-1,4)	1,6 (1,5-1,6)	2,1 (2,0-2,6)	
LVIDd inc (%)	4,0 (-3,3-13,9)	13,6 (4,5-23,6)	23,6 (16,3-37,6)	43,6 (40,4-58,7)	
LVIDs inc (%)	6,4 (0,0-27,8)	21,5 (11,7-40,7)	22,1 (16,7-41,8)	42,7 (25,5-56,4)	

Numeriska värden redovisas som medianvärde och interquartile range (IQR) inom parentes.

12 st. prover hade värden som översteg maxvärdet (3000 pmol/L) vid första mätningen, dessa registrerades som 3000 pmol/L i protokollet. I ett prov blev det uppmätta värdet <min vid första analysen varvid det kördes om. Eftersom tillverkaren inte angett någon nedre detektionsgräns använde vi oss av det värde vi fick vid ett andra analystillfälle, vilket var 5,5 pmol/L.

Mängden NT-proBNP steg i takt med ökad grad av kronisk mitralisklaffdegeneration ($P<0,0001$). Hundar med kraftig kronisk mitralisklaffdegeneration hade höga nivåer av NT-proBNP jämfört med friska hundar ($P<0,0001$), och hundar med mild ($P<0,0001$) och måttlig ($P=0,0002$) kronisk mitralisklaffdegeneration (figur 2).

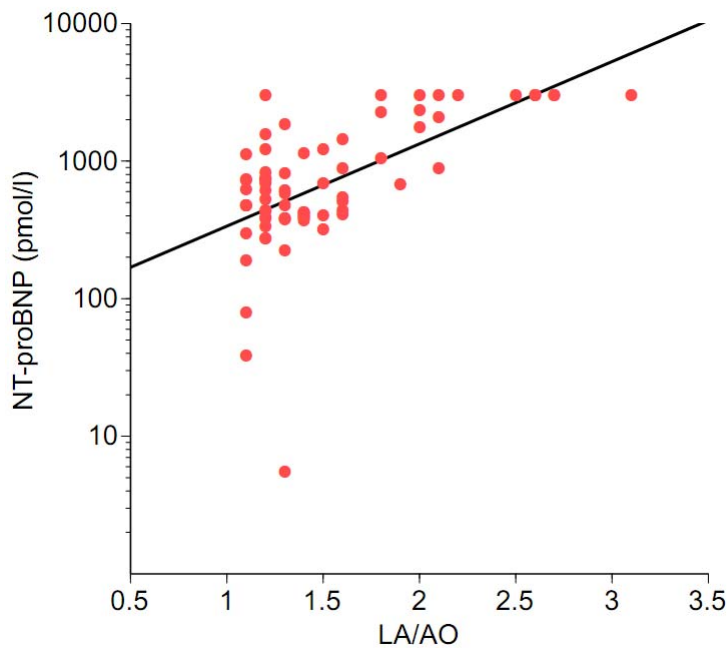
Figur 2. Serumkoncentrationen av NT-proBNP relaterat till grad av kronisk mitralisklaffdegeneration.



Övre och nedre begränsningen på lådorna motsvarar övre (75%) och undre (25%) kvartilen, linjen i varje box representerar medianvärdet (50%). De vågräta linjerna utanför varje box visar övre (90%) och nedre (10%) decilen.

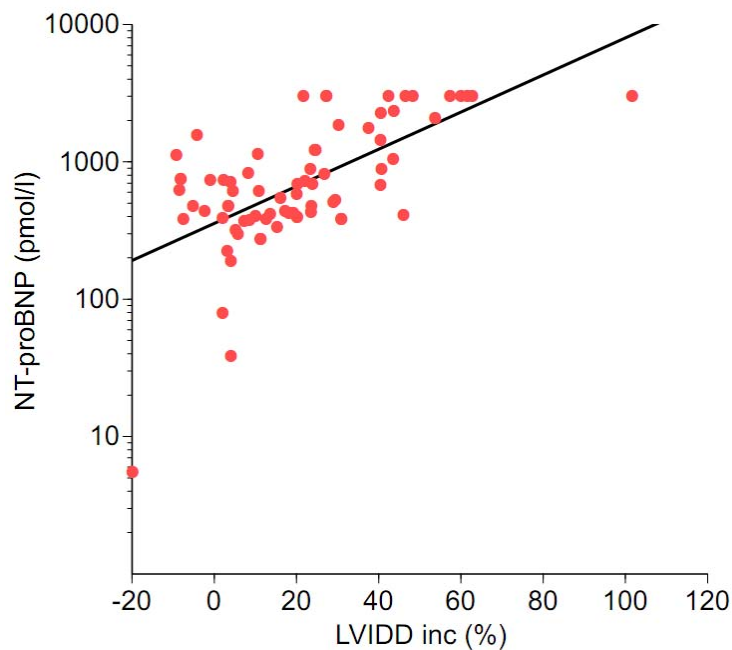
Ökade ålder hade en positiv korrelation med ökade serumnivåer av NT-proBNP ($P=0,0058$), Förstoring av vänster förmak (LA/Ao) gav en ökning i mängden NT-proBNP ($P<0,0001$) (figur 3).

Figur 3. Serumkoncentrationen av NT-proBNP relaterat till LA/Ao hos de 69 inkluderade hundarna.



Koncentrationen NT-proBNP ökade med ökad LVIDs inc% och LVIDd inc% ($P < 0,0001$ i båda fallen). Figur 4 visar sambandet mellan NT-proBNP och LVIDd inc%.

Figur 4. Serumkoncentrationen av NT-proBNP relaterat till procentuell ökning av LVIDd hos de 69 inkluderade hundarna.



DISKUSSION

Denna studie visade att serumnivåerna av NT-proBNP ökar med ökad grad av kronisk mitralisklaffdegeneration. Ökningen skedde successivt men det var först när hundarna utvecklade kraftig grad av kronisk mitralisklaffdegeneration som ökningen blev statistiskt signifikant. Fördelarna med att analysera NT-proBNP är att det är ett enkelt och relativt billigt test som ger värdefull information för den praktiserande veterinären. Det kan visserligen inte ersätta andra undersökningsmetoder, som till exempel ett hjärtultraljud vilket ger mer specifik information om hjärtmorfologin, men det ger en god fingervisning om hur kraftig sjukdomen är. Vidare finns det studier som tyder på att NT-proBNP även ger värdefull prognostisk information (Serres *et al*, 2009; Moonarmart *et al*, 2010).

Vid koncentrationer av NT-proBNP som överstiger 1800 pmol/L är det enligt tillverkarens referensvärden stor sannolikhet att kliniska tecken på sjukdom är orsakade av hjärtsvikt och inte har någon annan primärsak. Hundar med kraftig kronisk mitralisklaffdegeneration hade i vår studie ett medianvärde av NT-proBNP på 3000 pmol/L och ett IQR över 1800 pmol/L, medans både medianvärdet och IQR låg under 900 pmol/L hos de övriga hundarna i studien. Enstaka höga NT-proBNP värden erhöles hos hundar som var friska eller i tidigt stadium av sjukdomen. Dessa bedöms som falskt positiva. Huruvida dessa falskt positiva värden är metodrelaterade, eller om det kan vara så att även friska hundar har höga BNP nivåer är något som det krävs ytterligare studier för att utröna. Med tanke på att testet kan ge falskt höga värden är det av yttersta vikt det används i kombination med andra diagnostiska metoder innan man uttalar sig om diagnos, behandling och prognos för ett enskilt djur.

Både hundar med och utan hjärtsvikt inkluderades i den kraftiga gruppen och det bör poängteras att vi inte undersökte huruvida NT-proBNP kan användas för att diagnostisera hjärtsvikt eller ej. Tarnow *et al* (2009) tittade däremot på detta i en studie på hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration där de jämförde hundar med kliniska tecken på hjärtsvikt med hundar med avsaknad av det samma. De kom då fram till att NT-proBNP var signifikant mycket högre i gruppen som uppvisade kliniska tecken på hjärtsvikt än de som ännu inte uppvisade några sjukdomstecken.

I våra resultat ser man att den största stegringen av NT-proBNP sker vid kraftig kronisk mitralisklaffdegeneration, vilket reflekterar en kraftig uttänjning av kammarkardiomyocyterna till följd av en volymöverfyllnad hos dessa hundar. Vi erhöles även ett positivt samband mellan ökad storlek på vänster förmak (LA/Ao) och ökade nivåer av NT-proBNP ($P < 0,0001$). Vidare sågs ett positivt samband mellan ökad vänster kammarstorlek (LVIDs inc%, LVIDd inc%) och ökade nivåer av NT-proBNP ($P < 0,0001$). Dessa samband har även kunnat visas i tidigare studier (Chetboul *et al*, 2009; Tarnow *et al*, 2009; Moonarmart *et al* 2010). Närmare inspektion av våra resultat visar att det är hos de hundar med kraftig kronisk mitralisklaffdegeneration (se tabell 1) som en kraftig ökning av vänster förmak och kammarstorlek sker. Detta stämmer det även överens med en studie där man, med hjälp av ultraljud och röntgen, visade att storleksökningen av hjärtat sker först 6-12 månader innan

utvecklandet av hjärtsvikt (Lord *et al*, 2010), det vill säga sent i sjukdomsförloppet. Det har även påvisats ett positivt samband mellan dödlighet och mängden NT-proBNP i cirkulationen samt mellan dödlighet och ökad LVIDd hos hundar med kronisk mitralisklaffdegeneration (Moonarmart *et al*, 2010). Chetboul *et al* visade 2009 att NT-proBNP var högre hos hundar med asymtomatisk kronisk klaffdegeneration som utvecklade hjärtsvikt inom 12 månader efter undersökningen jämfört med hundar som ej utvecklade hjärtsvikt. Mängden NT-proBNP i cirkulationen har även visat sig ha ett prognostiskt värde när det gäller överlevnad hos hundar med kronisk klaffdegeneration som utvecklat kliniska tecken på hjärtsvikt (Serres *et al*, 2009). En signifikant skillnad hittades i deras studie av den cirkulatoriska mängden NT-proBNP mellan hundar som dött eller avlivats på grund av hjärtsjukdomen och de som fortfarande levde 6 månader efter provtagningstillfället. Det prognostiska värdet var högst när NT-proBNP användes i kombination med andra undersökningsmetoder men även som enskilt mått kunde det användas prognostiskt. En risk med testet är ju som sagt att det kan ge falskt höga värden och bör därför inte användas som enskilt mått.

Även vid jämförelse mellan NT-proBNP och ålder sågs ett positivt samband ($P=0,0058$) i vår studie. Äldre hundar hade ett högre NT-proBNP än yngre, vilket var väntat eftersom sjukdomen framför allt drabbar medelålders till äldre hundar (Egenvall *et al*, 2006). Med tanke på att det sker ganska många förändringar i den åldrande hundens kropp så finns det med allra största sannolikhet även andra orsaker än hjärtförändringar till varför äldre hundar har ett högre NT-proBNP. Fler studier behövs inom detta område.

STUDIENS SVAGHETER

I gruppen kraftig kronisk mitralisklaffdegeneration låg medianvärdet enligt våra resultat på 3000 pmol/L. Detta värde är sannolikt falskt lågt eftersom de prover som låg >max registrerades som 3000 pmol/L trots att de i själva verket säkerligen låg högre.

SLUTSATS

Serumnivåerna av NT-proBNP stiger med ökad grad av kronisk mitralisklaffdegeneration hos hund. Ökningen är exponentiell och den största stegringen av NT-proBNP sker vid kraftig kronisk mitralisklaffdegeneration, vilket återspeglar den storleksökning av vänster förmak och kammare som sker i sent stadium av sjukdomen. Analysering av NT-proBNP kan således vara ett värdefullt komplement vid handläggning av hundar med kronisk klaffdegeneration.

LITTERATURFÖRTECKNING

Black, A., French, A.T., Duke-McEwan, J., Corcoran, B.M. (2005). Ultrastructural morphologic evaluation of the phenotype of valvular interstitial cells in dogs with myxomatous degeneration of the mitral valve. *American Journal of Veterinary Research* vol. 66, nr. 8, sid. 1408-1414.

Boragelli, M., Häggström, J. (2010). Canine Degenerative Myxomatous Mitral Valve Disease: Natural History, Clinical Presentation and Therapy. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* vol. 40, sid. 651-663.

Boswood, A., Duke-McEwan, J., Loureiro, J., James, R.A., Martin, M., Stafford-Johnson, M., Smith, P., Litle, C., Attree, S. (2008). The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *Journal of Small Animal Practice* vol. 49, sid. 26-32.

Cao, L., Gardner, D.G. (1995). Natriuretic Peptides Inhibit DNA Synthesis in Cardiac Fibroblasts. *Hypertension* vol. 25, sid 227-224. Tillgänglig: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/25/2/227> [29 november, 2010].

Chetboul, V., Serres, R., Tisser, R., Lefebvre, C., Sampedrano, C.C., Gouni, V., Poujol, L., Hawa, G., Pouchelon, J.-L. (2009). Association of Plasma N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Concentration with Mitral Regurgitation Severity and Outcome in Dogs with Asymptomatic Degenerative Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 23, sid. 984-994.

Cornell, C.C., Kittleson, M.D., Della Torre, P., Häggström, J., Lombard, C.W., Pedersen, H.D., Vollmar, A., Wey, A. (2004). Allometric Scaling of M-Mode Cardiac Measurements in Normal Adult Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 18, nr. 3, sid. 311-321.

Daniels, L.B., Maisel, A.S. (2007). Natriuretic Peptides. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 50, nr. 25, sid. 2357-2368.

de Moraes, H.A., Schwartz, D.S. (2005) Pathophysiology of Heart Failure. I: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Red.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6. Ed. sid. 914-940. St. Louis: Elsevier Saunders.

DeFrancesco, T.C., Rush, J.E., Rozanski, E.A., Hansen, B.D., Keene, B.W., Moore, D.T., Atkins, C.E. (2007). Prospective Clinical Evaluation of an ELISA B-Type natriuretic Peptide Assay in the Diagnosis of Congestive Heart Failure in Dogs Presenting with Cough or Dyspnea. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 21, sid. 243-250.

Doust, J.A., Glasziou, P.P., Pietrzak, E., Dobson, A.J. (2004). A Systematic Review of the Diagnostic Accuracy of Natriuretic Peptides for Heart Failure. *Archive of Internal Medicine* vol. 164, nr. 18, sid.1978-1984.

Egenvall, A., Bonnet, B.N., Häggström, J. (2006). Heart Disease as a Cause of Death in Insured Swedish Dogs Younger Than 10 Years of Age. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 20, sid. 894-903.

Häggström, J., Kwart, C., Pedersen, H.D. (2005). Acquired Valvular Heart Disease. I: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Red.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6. Ed. sid. 1022-1039. St. Louis: Elsevier Saunders.

Kogure, K. (1980). Pathology of Chronic Mitral Valvular Disease in the Dog. *Japans. Journal of Veterinary Science* vol. 42, sid. 323-335 .

Levin, E.R., Gardner, D.G., Samson W.K. (1998). Natriuretic Peptides. *The New England Journal of Medicine* vol. 339, nr 5, sid. 321-328. Tillgänglig: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199807303390507> [28 oktober, 2010].

Lord, P., Hansson, K., Kwart, C., Häggström, J. (2010). Rate of change of heart size before congestive heart failure in dogs with mitral regurgitation. *Journal of Small Animal Practice* vol. 51, sid.210-218.

Meyer, M., Lüss, H., Mitrovic, V., Mebazaa, A. (2008). Natriuretic peptides. I: Mebazaa, A., Gheorghide, M., Zannad, F.M., Parrillo, J.E. (Red). *Acute Heart Failure*. Sid. 608-620. London: Springer.

Moonamart, W., Boswood, A., Fuentes, V.L., Brodbelt, D., Souttar, K., Elliot, J. (2010). N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *Journal of Small Animal Practice* vol. 51, sid. 84-96.

Olsen, L.H., Fredholm, M., Pedersen, H.D. (1999). Epidemiology and Inheritance of Mitral Valve Prolapse in Dachshunds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 13, nr. 5, sid. 448-456.

Oyama, M.A., Fox, P.R., Rush, J.E., Rozanski, E.A., Lesser, M. (2008). Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 232, nr. 10, sid. 1496-1503.

Pedersen, D., Lorentzen, K.A., Kristensen, B.O. (1999). Echocardiographic mitral valve prolapse in cavalier King Charles spaniels: epidemiology and prognostic significance for regurgitation. *Veterinary Record* vol. 144, sid. 315-320.

Prošek, R., Sisson, D., Oyama, M.A., Solter, P.F. (2007). Distinguishinh Cardiac and Noncardiac Dyspnea in 48 Dogs Using Plasma Atrial Natriuretic Factor, B-Type Natriuretic Factor, Endothelin and Cardiac Troponin-I. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 21, sid. 238-242.

Schweitz, H., Vigne, P., Moinier, D., Frelin, C. & Lazdunski, M. (1992) A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *The Journal of Biological Chemistry* vol. 267, nr. 20, sid. 13928–13932. Tillgänglig: <http://www.jbc.org/content/267/20/13928.abstract> [20 september, 2010].

Serres, F., Pouchelon, J.-L., Poujol, L. Lefebvre, H.P., Trumel, C., Daste, T., Sampedrano, C.C., Gouni, V., Tissier, R., Hawa, G., Chetboul, V. (2009). Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *Journal of Veterinary Cardiology* vol. 11, sid 103-121.

Suzuki, T. (2001). The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* vol. 51, nr. 3, sid. 489-494.

Swenson, L., Häggström, J., Kwart, C., Juneja, R.K. (1996). Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 208, nr. 12, sid. 2009-2012.

Tarnow, I., Olsen, L.H., Kwart, C., Höglund, K., Moesgaard, S.G., Kamstrup, S.G., Pedersen, H.D., Häggström, J. (2009). Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *The Veterinary Journal* vol. 180, nr. 2, sid. 195-201.

van Kimmenade, R.R. & Januzzi Jr., J.L. (2009) The evolution of the natriuretic peptides – Current applications in human and animal medicine. *Journal of Veterinary Cardiology* vol 11, sid 9-21.

Vesley, D.L. (2003). Natriuretic peptides and acute renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* vol. 285, sid. 167-177. Tillgänglig: <http://ajprenal.physiology.org/cgi/content/full/285/2/F167> [29 oktober, 2010].