



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Histologisk karakterisering av myokardvävnad från hundar med myxomatös mitralisklaffdegeneration

Kristina Larsdotter Törnvall

*Uppsala
2014*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:70*

Histologisk karakterisering av myokardvävnad från hundar med myxomatös klaffdegeneration

Histological characterization of myocardial tissue from dogs affected by myxomatous mitral valve disease

Kristina Larsdotter Törnvall

Handledare: *Ingrid Ljungvall, Institutionen för kliniska vetenskaper*

Biträdande handledare: *Jens Häggström, Institutionen för kliniska vetenskaper*

Biträdande handledare: *Fredrik Södersten, Institutionen för BVF*

Biträdande handledare: *Katja Höglund, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi*

Examinator: *Helene Hamlin, Institutionen för kliniska vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: *30 hp*

Nivå och fördjupning: *Avancerad nivå, A2E*

Kurskod: *EX0736*

Utgivningsort: *Uppsala*

Utgivningsår: *2014*

Delnummer i serie: *Examensarbete 2014:70*

ISSN: *1652-8697*

Elektronisk publicering: *<http://stud.epsilon.slu.se>*

Nyckelord: *Myxomatös mitralisklaffdegeneration (MMVD), histologi, kärlförändringar, vänster kammare*

Key words: *Myxomatous mitral valve disease (MMVD), histology, arteriosclerosis, left ventricle*

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Myxomatös mitralisklaffdegeneration (MMVD) är den vanligaste hjärtsjukdomen hos hund. Sjukdomen debuterar vanligtvis hos medelålders till äldre hundar och det är främst små- mellanstora raser som drabbas. Cavalier King Charles spaniel kan ha utvecklat MMVD redan vid två-tre års ålder. Genetiska studier har identifierat loci (områden i genomet) kopplade till tidig utveckling av sjukdomen. Sjukdomen leder till en myxomatös degeneration av mitralisklaffarna vilket leder till läckage av blod från vänster kammare till vänster förmak. Med tiden leder detta till att förmak och kammare dilateras. Dilatationen gör att sammansättningen och strukturen i myokardiet förändras. Först förändras kompositionen hos extracellulära matrix och myocyterna förlängs. Senare i sjukdomsförloppet ses fibrotisering i myokardiet med ackumulering av kollagenfibrer. Förändringarna gör så småningom att hjärtat får en minskad elasticitet och den systoliska funktionen reduceras. I slutskedet av sjukdomen är det inte ovanligt drabbade hundar utvecklar kongestiv hjärtsvikt.

Målsättningen med denna studie var att studera och dokumentera histologiska förändringar i vänster kammarvägg hos hundar med MMVD och friska kontrollhundar. Observationer och mätningar av fibrotisering, myocytutseende, fettinfiltration och kärltjocklek har gjorts hos 14 hundar med MMVD samt 11 friska kontrollhundar.

Undersökningen visade att, i jämförelse med kontrollhundar, hade MMVD hundar tjockare kärlväggar och de tenderade att ha mer fibros i myokardiet, men ingen skillnad förelåg i fettmängd, myocytfibertjocklek och myocytstriering. Detta är information som kan vara viktig för ökad inblick i och förståelse för sjukdomsutvecklingen.

SUMMARY

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is the most common cardiovascular disease in dogs. Dogs that develop the disease are often middle aged or elderly and of small to middle sized breeds. Some breeds, like Cavalier King Charles spaniel, are sometimes affected at two to three years of age. Recent studies have identified genetic loci associated with early development of the disease.

The disease is characterized by a myxomatous degeneration of the mitral valve which leads to thickening of the valves. Because of the abnormal valve morphology, blood starts leaking in to the left atrium leading to enlargement of the left heart chambers.

Dilatation of the left ventricle and atrium causes changes in the myocardium. The structure of extracellular matrix changes, myocyte fiber elongate and accumulation of collagen fibers occur.

Eventually the elasticity of the cardiac wall decreases and the systolic function reduce. In the end stage it is not uncommon that the dogs develop congestive heart failure due to the disease.

In this study microscopic changes in the left ventricular wall have been assessed in 14 dogs affected by MMVD and in 11 healthy control dogs. Amount of fibrosis, appearance of the myocytes, fat infiltration and size of arteries have been investigated.

This study showed that dogs with MMVD had significant thicker arteries than the healthy control dogs. The analysis did not show a significant difference between affected and healthy dogs according to the amount of fat in the myocardium. The amount of fibrosis was almost statistically significant between affected dogs and control dogs, meaning that dogs with MMVD had more fibrosis. This information is important for deeper knowledge about the development of MMVD.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	1
MATERIAL OCH METODER.....	5
RESULTAT	8
DISKUSSION	13
TACK.....	15
REFERENSER.....	16

FÖRKORTNINGAR

CKCS = Cavalier King Charles spaniel

MR = Mitralisregurgitation

MMVD = Myxomatös mitralisklaffdegeneration

MMP = Matrix metalloproteinaser

ECM = Extracellulärt matrix

HF = Hjärtfrekvens

TIMP = Tissue inhibitor of metalloproteinases

INLEDNING

Myxomatös mitralisklaffdegeneration (MMVD) är den vanligaste hjärtsjukdomen hos hund. Under lång tid har intresset för de patologiska förändringarna i klaffarna varit stort. På senare år har även intresset för de förändringar som sker i vänster kammarvägg ökat. Fördjupad kunskap om remodeleringsprocessen i vänster kammarvägg kan bidra med viktig information om sjukdomsutvecklingen hos hundar med MMVD.

Syfte

Syftet med detta examensarbete var att göra en histologisk karakterisering av myocyter, kärl, mängd fibros och fett i vänster kammarvävnad från hundar drabbade av MMVD samt från friska kontrollhundar.

LITTERATURÖVERSIKT

Hjärtats histologiska uppbyggnad

Hjärtat är histologiskt uppdelat i tre lager; endokardium, myokardium och epikardium. Myokardiet tar upp den största delen av hjärtat och består av ca 70 % myocyter och resten bindväv (Katz, 2001). Myocyterna är ordnade i en regelbunden uppställning av strierade buntar av myofibriller. Dessa består av sarkomerer som är längsgående myosin- och aktinfilament. Sarkomererna ger myocyterna deras kontraherande förmåga. Vävnadens extracellulära matrix (ECM) håller myocyterna på plats i hjärtat samt ger det styrka och support (Spinale, 2002). Extracellulär matrix innehåller kollagen uppbyggt i ett nätverk av laminin, fibronectin, elastin, proteoglykaner, glukosaminoglykaner (GAGs) samt olika signalmolekyler. Matrixet är under ständig remodelering för att ge hjärtat flexibilitet och stabilitet (Aupperle & Disatian, 2012).

Klaffarnas histologi

Klaffarna är uppbyggda av fyra lager: Atrialis är det översta lagret (närmast förmaket) och sedan följer spongiosa, fibrosa och ventrikulus (Conell *et al.*, 2012). Atrialis stora innehåll av elastin ger klaffarna en enorm möjlighet att kunna tänjas ut för att sedan dra ihop sig igen (Stephen *et al.*, 2008). Fibrosa är det tjockaste lagret och innehåller hårt packat kollagen som ger klaffarna deras stabilitet. I de andra tre lagren är kollagenet mjukare med högt innehåll av GAGs vars funktion är att klara kompressionen klaffarna utsätts för.

För att mitralisklaffarna ska fungera normalt är chordae tendineae viktiga komponenter (Conell *et al.*, 2012). De sitter fast i klaffarnas undersida samt i papillarmuskulerna som finns längs med den vänstra kammarväggen. Chordae tendineae hjälper klaffarna att hålla tätt vid stängning under systole. För att

chordae ska klara av den hårda utsträckningen består de av kollagenfibrer ordnade i samma längsriktning som de sträcks ut.

Myxomatös mitralisklaffdegeneration

Myxomatös mitralisklaffdegeneration är den vanligaste förvärvade hjärtsjukdomen hos hund (Fox, 2012; Häggström *et al.*, 2004; Borgarelli *et al.*, 2010). Även om degenerationen kan angripa alla klaffplan i hjärtat är mitralisklaffen den mest frekvent drabbade klaffen (Häggström *et al.*, 2004). Myxomatös mitralisklaffdegeneration står för 75 % av de hjärtrelaterade sjukdomarna hos hund (Borgarelli *et al.*, 2010).

Utveckling av MMVD är starkt associerat med ålder, storlek, ras och kön, även om alla hundar kan drabbas (Fox, 2012). Hundar med MMVD är oftast medelålders till äldre och sjukdomen drabbar vanligtvis små till medelstora raser. Cavalier King Charles spaniel (CKCS), tax, pudel, papillon och chihuahua är överrepresenterade (Egenvall *et al.*, 2006). Vid tio års ålder har över 90 % av hundarna av CKCS-rasen utvecklat sjukdom (Parker *et al.*, 2012). Hanhundar drabbas ofta tidigare och sjukdomen utvecklas generellt snabbare hos hundar av detta kön (Egenvall *et al.*, 2006; Häggström *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 1999).

Patogenes och patofysiologi

Etiologin kring MMVD är inte känd, trots att flera hypoteser kring sjukdomens uppkomst har lagts fram. Idag är den rådande teorin att genetiska faktorer spelar en stor roll i utvecklingen av MMVD då sjukdomen är vanligare hos vissa raser som exempelvis CKCS och tax (Olsen *et al.*, 1999; Swensson *et al.*, 1996). Hypotesen är att defekta gener leder till en dystrofisk process i klaffarna vilket genererar en degeneration i klaffarna. Nyligen påvisades två loci i genomet hos CKCS av Madsen *et al.*. Dessa loci visade sig vara starkt kopplade till tidig utveckling av MMVD.

MMVD karakteriseras av en progressiv myxomatös degeneration av mitralisklaffarna (Buchanan 1977; Kogure 1980; Häggström *et al.*, 2004). Klaffarna blir förtjockade och deformerade (Fox, 2012). Degenerationen ger upphov till ett läckage i mitralisklaffen, kallat mitralisregurgitation (MR) vilket leder till dilatation av vänster förmak och kammare på grund av volymöverbelastningen. Hur allvarlig regurgitationen är beror på hur pass påverkade klaffarna är (Olsen *et al.*, 1999). Progressionen av sjukdomen varierar mellan individer, men oftast kan de sjuka hundarna kompensera för MR över några år. Kompensationsmekanismerna inkluderar bland annat ökad kraft och hastighet i hjärtats kontraktion, högre hjärtfrekvens, ökat lymfdränage i lungor samt en neurohormonell reglering av det kardiovaskulära arbetet (Häggström, 2012). Så småningom orkar dock inte hjärtat kompensera för det ökade arbetstrycket längre. Mitralisregurgitationen leder till dilatation av vänster förmak och kammare (Høier Olsen *et al.*, 2010). Vänster kammare ökar fyllnadsgraden i slutdiastole vilket leder till eccentric hypertrofi, ett tillstånd där kammaren dilateras men bibehåller sin vägg tjocklek (Grossman *et al.*, 1975). Endokardiella skador (jet lesions) kan uppstå i vänster förmaksvägg och i allvarliga fall kan förmaket brista. När kompensationsmekanismerna tröttats ut blir resultatet en minskad

hjärtminutvolym med ett ökat venöst tryck (Häggeström, 2012). Följden blir lungödem (vänstersidig hjärtsvikt) eller ascites (högersidig hjärtsvikt). Hos en del hundar utvecklas även lunghypertension.

Förändringar i klaffarna

Histologiskt ses progressiva förändringar av mitralisklaffarna, beroende på hur långt framskriden sjukdomen är. Klaffarna förtjockas, främst distalt, genom en ökad mängd interstitiella celler i atrialislagret, ackumulering av mucopolysackarider och glykosaminoglykaner i spongiosalagret samt en oordning av kollagenfibrerna i fibrosalagret (Jiranantasak *et al.*, 2013; Hadien *et al.*, 2010; Hadien *et al.*, 2007). Ca 10 % - 20 % av kollagenet har visats vara reducerat i de områden av klaffarna som angripits av myxomatös degeneration (Hadien *et al.*, 2010). Då draghållfastheten hos kollagenet står i direkt proportion till dess mängd har det föreslagits att de påverkade områdena får en försämrad förmåga att klara av styrkan som krävs vid hjärtats systole just på grund av den minskade mängden kollagen (Hadien *et al.*, 2007). Proteolytiska enzymer som matrix metalloproteinaser (MMPs) kan vara involverade i degenerationen av bindvävens komponenter (Aupperle *et al.*, 2009b; Aupperle *et al.*, 2009c). Endotellagret som täcker klaffens yta är skadat och i vissa fall helt borta (Han *et al.*, 2013). Oftast ses de tydligaste skadorna på klaffarnas kanter. I de områden där endotelcellerna är helt borta blottläggs det underliggande basalmembranet och subendoteliala matrix (Corcoran *et al.*, 2004). När endotellagret skadas kommer de normala cellerna i klaffarnas interstitium att genomgå en omvandling från ett fibroblastutseende till ett myofibroblastutseende (Richards *et al.*, 2012). Alla dessa förändringar tillsammans med att klaffarna förtjockas och förlängs kan tillsammans resultera i en prolaps av mitralisklaffen eller att chorda tendineae rupturerar, vilket förvärrar MR (Pedersen *et al.*, 1996).

Förändringar i vänster kammarvägg

Struktur och sammansättning i både ECM och myocyter förändras hos hundar med MMVD (Weber *et al.*, 1992). Extracellulära matrix anpassar sig vid olika patologiska tillstånd vilket underlättar för remodelering. Varför förändringarna sker är inte helt klarlagt, men en teori är att ECM-remodellering sker vid volymöverbelastning av vänster hjärthalva vilket ger en onormal utsträckning av vävnaden (Woessner, 1991). En annan teori är att proteolytiska enzymer så som MMPs är involverade i processen. Kollagenet går sönder och ersätts av ett mer instabilt kollagen vilket medför att myocyterna inte får det strukturella stöd de behöver (Zheng *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 1995). Myocyterna utsätts samtidigt för en onormal tånjning, främst under diastole orsakat av ett ökat fyllnadstryck (Spinale, 2002). Följden blir en eccentric hypertrofi med replikation av sarkomerer och en ökad myocytlängd (Grossman *et al.*, 1975). Resultatet blir en vänstersidig kammarförstoring med fortsatt normal vägg tjocklek (Carabello, 2002). Remodellering av hjärtat leder till ändrad aktivitet och koncentration av olika proteiner, enzymer och hormoner i vävnad och blod, som exempelvis hjärtspecifikt troponin och MMPs. De sistnämnda är en grupp zink-beroende proteolytiska enzymer som bland annat medverkar i degeneration och remodelering av ECM (Woessner, 1991). Dessa proteolytiska enzyms aktivitet regleras av TIMPs, tissue inhibitors av MMPs, som blockerar tillgången till ECM. Bland annat myocyter och fibroblaster kan uttrycka och syntetisera MMPs (Hutchinson *et al.*, 2010). De utsöndras som inaktiva proenzymer (zymogener), även kallade proMMPs (Aupperle *et al.*, 2009a;

Aupperle *et al.*, 2009b). Efter utsöndring binder de till olika ECM-komponenter och förvaras där extracellulärt tills de stimuleras och aktiveras (Li *et al.*, 2000). När aktiviteten hos MMPs ökar sker en uppluckring av ECM vilket bidrar till utvecklande av hjärtdilatation. 2005 skrev Anne *et al.*, en artikel där det föreslogs att minskad aktivitet av MMPs ger en minskad degradering av ECM vilket skulle resultera i en ökad myokardiell fibrotisering. Progression av MMVD leder till myokardiell fibrotisering, med ackumulering av kollagenfibrer (Falk, 2008). Fibrosen kommer att påverka hjärtat mekaniskt och den systoliska funktionen minskar på grund av minskad elasticitet.

Förändringar i kärlen

Arterioskleros innebär en förhårdnad av artärer med minskad elasticitet och trängre kärllumen orsakat av proliferativa samt degenerativa förändringar i kärlväggen (Falk, 2008). Arterioskleros med samtidiga små myokardiella infarkter är ett vanligt fynd hos både äldre hundar samt hos hundar med MMVD (Jonsson, 1972; Falk *et al.*, 2006). Oftast är kärlförträngingarna lokaliserade subendokardiellt, även om lokaliseringen varierar mellan olika individer (Falk *et al.*, 2006). Kärlen får en förtjockad intima och det är inte ovanligt med hyalint innehåll i kärllumen.

Patogenesen kring kärlförändringarna är i dagsläget inte känd. Det har dock föreslagits att dessa förändringar ger upphov till ischemiska rubbningar i hjärtat vilket skulle kunna vara en bidragande orsak till den myokardiella fibrosen.

Kliniska fynd

De kliniska sjukdomstecknen hos en patient med MMVD kan variera alltifrån endast blåsljud till livshotande lungödem med andningssvårigheter (Borgarelli *et al.*, 2010). Alla patienter har en lång subklinisk sjukdomsperiod. Det viktigaste kliniska fyndet hos en patient med MMVD är ett systoliskt blåsljud över hjärtats apex på vänster sida (Häggström *et al.*, 1995). Blåsljudet kan vara intermittent eller höras vid varje hjärtslag (Häggström *et al.*, 2004). Ju svårare grad av sjukdom desto högre hjärtfrekvens (HR) och blåsljud har hunden (Rasmussen *et al.*, 2012). Den ökade hjärtfrekvensen är ett resultat av den minskade hjärtminutvolymen. Kardiomegali kan ge ett tryck på en av huvudbronkerna och orsaka hosta (Häggström, 2012). Om MMVD utvecklats till kongestiv hjärtsvikt ses sjukdomstecken som hosta, tachypné, letargi, anorexi, minskad motionsintolerans och ibland viktminskning. Ascites ses de gånger patienten utvecklar en högersidig kongestiv hjärtsvikt. MMVD kan även orsaka plötsliga dödsfall orsakat av kammararrytmier, ruptur av chordae tendineae eller hjärttamponad på grund av förmaksväggsruptur (Olsen *et al.*, 2010).

Diagnos

Vid den kliniska undersökningen av hundar med MMVD hörs ett systoliskt blåsljud över mitralisområdet (Ljungvall *et al.*, 2009). Röntgen av thorax visar ett förstorat vänster förmak och en förstorat vänster kammare (Atkins *et al.*, 2009). För att verifiera diagnosen är en ultraljudsundersökning nödvändig. Här ses förtjockning av den ena eller båda mitralisklaffarna samt eventuell mitralisprolaps samt MR. Vid ultraljudsundersökningen kan även en uppskattning av graden av vänstersidig hjärtförstoring göras, vilket är kopplat till sjukdomens allvarlighetsgrad. Dessutom visar undersökningen ifall det föreligger en systolisk eller diastolisk dysfunktion.

Behandling

I dagsläget finns inte någon medicinsk behandling som bromsar eller förebygger klaffdegenerationen (Häggström *et al.*, 2009). I och med detta är rekommendationen att endast behandla patienter som utvecklat tecken på kongestiv hjärtsvikt (Atkins *et al.*, 2009). Behandlingen ska syfta till att ge hunden en bättre livskvalitet och förlänga överlevnadstiden (Häggström *et al.*, 2004). Den behandling som idag rekommenderas är furosemid, pimobendan, ACE- hämmare och spironolakton (Borgarelli *et al.*, 2010).

MATERIAL OCH METODER

Det här är en deskriptiv studie som godkänts i etisk prövning. Djurägaren accepterade att låta hunden delta i projektet genom att skriva under ett djurägarsamtycke.

Inklusionskriterier

Hundar med diagnosticerad MMVD samt friska kontrollhundar deltog i studien. Hundarna med diagnosticerad sjukdom visade alla kliniska tecken på MMVD. Några av patienterna hade kliniska tecken på kongestiv hjärtsvikt samt stod på behandling för detta. Hundar med medfödda hjärtfel, andra hjärtfel än MMVD samt systemiska sjukdomar exkluderades.

Inga av hundarna avlivades på grund av studien.

Datainsamling

Hundarna dokumenterades med avseende på ras, kön, vikt, ålder, klinisk status, eventuell behandling, förekomst av andra sjukdomar samt ultraljudsundersökning.

Ekokardiografi

Alla, utom 7 kontrollhundar, ultraljudsundersöktes av hjärtspecialist vid universitetdjursjukhuset i Uppsala. Hundarna var osederade och undersöktes från sin högra och sin vänstra sida av bröstkorget vid undersökningstillfället.

Med hjälp av ultraljud diagnosticerades samt graderades den myxomatösa klaffdegenerationen. Diagnosen ställdes utifrån karakteristiska förändringar på mitralisklaffarna så som förtjockning, prolaps in i vänster förmak samt signifikant MR.

Förberedelse av histologiska snitt

Hjärtat plockades ut inom 30 minuter efter avlivning. Hjärtat skars upp enligt ett protokoll och undersöktes makroskopiskt med avseende på karakteristiska förändringar av klaffarna samt myokardiets utseende.

Nio snitt togs från varje hjärta; tre från främre papillen, tre från vänster kammarvägg och tre från bakre papillen varav ett snitt från vardera ställe ingick i den här studien. Bearbetning och undersökning av snitten utfördes på SLU-patologen i Uppsala.

Mikroskopisk undersökning

Snitten från främre papill, vänster kammarvägg och bakre papill undersöktes i mikroskop. Ett snitt från varje område färgades med hematoxylin- eosin- färgning (HE) och ett snitt från varje område färgades med masson trichrome (MTC).

Fett- och fibrosmängd

Mängden fett och mängd fibros graderades enligt följande skala: 0 = ingenting, 1 = lindrigt, 2 = måttligt, 3 = kraftigt och 4 = mycket kraftigt. Mängduppskattningen graderades i varje preparat (främre papill, vänster laterala kammarvägg, bakre papill) samt på tre områden (perivaskulärt, interstitiellt, subepikardiellt) i varje preparat. Ett medelvärde räknades ut för varje preparat.

Myocytutseende

Myocyternas utseende studerades. Myocyternas striering, eventuell degeneration eller vakuolisering och homogenicitet noterades. Kärleens utseende och regelbundenhet likaså. Eventuella avvikelser,

exempelvis inflammatoriska celler eller avläkta infarkter (fibroblaster och fibrotisering), dokumenterades.

Fibertjocklek

Myocyternas tjocklek mättes i programmet NIS – Elements BR 3.2. Bilderna togs med Nikon digital camera DXM1200. Kameran var kopplad till mikroskopet Nikon eclipse E600. Bilder togs på tvärskurna myocyter i X20 förstoring.

Sammanlagt mättes 40 tvärsnittade fibrer i varje preparat. Diametern på varje tvärsnittad fiber fastställdes i mängden pixlar. Pixeldiametern räknades sedan om till mikrometer (μm).

Medelvärdet för diametern i mikrometer för varje snitt (främre papill, vänster kammarvägg och bakre papill) räknades ut. Detta gav tre medelvärden per patient.

Kärlutseende

Det mättes åtta kärl per snitt. Endast helt tvärsnittade kärl var med i mätningen. Snedskurna eller längdskurna kärl togs inte med i studien. Kärlens totala diameter samt lumens diameter i pixlar antecknades. Därefter räknades lumen/area ratio (LAR) ut enligt formeln lumen area delat med total kärlarea (Falk *et al.*, 2006).

Ett medelvärde i LAR togs fram för varje snitt (främre papill, vänster kammarvägg och bakre papill). Detta gav tre medelvärden per patient.

Statistiska metoder

I de statistiska analyserna användes ett medelvärde för varje hund som räknats fram från värden från alla preparat och från varje lokalisation. Effekterna av sjukdom och lokalisation i vänster kammare på

grad av fibros, fettinlagring, myocyttjocklek och LAR analyserades genom multipel regressionsanalys, där grad av fibros, fettinlagring, myocyttjocklek eller LAR undersöktes mot lokalisering samt sjukdomsgrupp (MMVD eller kontroll). Signifikansnivån sattes till $P < 0.05$. Programmet som användes för statistiska beräkningar var JMP 11.0.

RESULTAT

Totalt 25 hundar inkluderades i studien. Av dessa hade 14 diagnosticerats med MMVD baserat på kliniska sjukdomstecken och karakteristiska ultraljudsfynd. Det var åtta tikar, fyra hanhundar, och medianåldern var 9,5 år (Interquartile range, IQR, 9-16). Av de sjuka hundarna var elva av rasen CKCS och de tre återstående var en jack russel, en grand danois och en australisk kelpie (se tabell 1).

Kontrollhundarna var elva stycken och ingen av dessa hade kliniska tecken på systemisk sjukdom. Det var tre tikar och åtta hanhundar med en medianålder på 2 år (IQR 2-11). Kontrollhundarna utgjordes av sju beaglar, en grand danois, en lapsk vallhund, en CKCS och en dobermann.

Histologi

Myocyter hos MMVD- hundar

Sex av MMVD-hundarna uppvisade nedsatt striering i myocyterna (se tabell 1). Hund nr 2 och nr 4 hade nedsatt striering fokalt i alla tre preparaten (främre papill, vänster laterala kammarvägg och bakre papill). Hund nr 3 hade nedsatt striering i epikardiet medan nr 5 uppvisade fokala områden med minskad striering i vänster kammarvägg.

I de histologiska snitten från hund nr 15 och nr 16 fanns multifokal infiltration av inflammatoriska celler (neutrofiler och makrofager) i myokardvävnaden. Ingen av dessa visade, som tidigare nämnts, några kliniska tecken på systemisk sjukdom. Vid de inflammatoriska områdena sågs nedsatt striering i myocyterna, dock utan tecken på vakuolisering eller degeneration. Samtliga kärl på alla histologiska snitt från hund nr 7 var infiltrerade med inflammatoriska celler (neutrofiler och makrofager) både i väggen samt i kärllumen. Här sågs vakuolisering och degeneration perivaskulärt. Det gick inte att se någon kvantitativ skillnad i förändringar i myokardiet vid jämförelse av hundar med kraftig MMVD och lindrig MMVD.

Myocyter hos kontrollhundar

Kontrollhund nr 11, en CKCS-hane på 3 år, hade nedsatt striering multifokalt i samtliga preparat. Den lappska vallhunden, nr 28, hade tre fokala områden i den bakre papillen med nedsatt striering och nr 37 hade tre fokala områden i främre papill med samma fynd. I preparatet från den bakre papillen hos hund nr 22 sågs flera utläkta infarkter (fibroblaster och fibrös vävnad). Runt ärrvävnaden var

strieringen reducerad och myocyterna degenererade samt vakuoliserade. Kontrollhundarna nr 31 och nr 13 hade områden perivaskulärt med ett degenerativt utseende och vakuoliserade myocyter.

Tabell 1

*Sammanfattning av de histologiska fynden hos både sjuka och kontroller. CKCS= Cavalier King Charles spaniel; Ua= utan anmärkning; *=fynd som kan läsas i rutan "övrigt"; Vak/Deg= vakuolisering/degeneration*

Histologiska fynd									
ID	Status	Grad av sjukdom	Hjärtsvikt?	Ras	Kön	Ålder	Myocyter Striering	Vak/Deg	Övrigt
1	MMVD	Kraftig	Ja	Jack russel	Hane	10	Ua	-	-
2	MMVD	Lindrig	Nej	CKCS	Tik	8	*	-	*Fokalt x3
3	MMVD	Kraftig	Ja	Strävhairig tax	Hane	16	*	-	*Nedsatt i epikardiet
4	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Tik	12	*	-	*Fokalt x3
5	MMVD	Lindrig	Nej	CKCS	Tik	9	*	-	*Fokalt v. kammarvägg
6	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Tik	12	Ua	-	-
7	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Hane	11	Ua	Perivaskulärt	Inflammation alla kärl
9	MMVD	Kraftig	Ja	Australisk kelpie	Hane	8	Ua	-	-
14	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Hane	9	Ua	-	-
15	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Hane	8	*	-	*Nedsatt vid inflammation
16	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Tik	12	*	-	*Nedsatt vid inflammation
17	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Tik	9	Ua	-	-
21	MMVD	Kraftig	Ja	CKCS	Tik	9	Ua	-	-
24	MMVD	Lindrig	Nej	CKCS	Tik	11	Ua	-	-
11	Kontroll	-	-	CKCS	Hane	3	Nedsatt x3	-	-
13	Kontroll	-	-	Beagle	Hane	2	Ua	Perivaskulärt	-
22	Kontroll	-	-	Dobermann	Tik	8	*	-*	*Utläkt infarkt bakre papill
26	Kontroll	-	-	Grand danois	Hane	11	Ua	-	-
28	Kontroll	-	-	Lapsk vallhund	Hane	2	*	-*	*Fokalt x3 bakre papill
31	Kontroll	-	-	Beagle	Hane	2	Ua	Perivaskulärt	-
32	Kontroll	-	-	Beagle	Hane	2	Ua	-	-
33	Kontroll	-	-	Beagle	Hane	2	Ua	-	-
35	Kontroll	-	-	Beagle	Hane	2	Ua	-	-
36	Kontroll	-	-	Beagle	Tik	2	Ua	-	-
37	Kontroll	-	-	Beagle	Tik	2	*	-	*Fokalt x3 främre papill

Fibros

Ingen av hundarna, vare sig sjuka eller kontroller, fick den högsta fibrosuppskattningen 4 i något preparat (se tabell 2 och 3). I den multipla regressionsanalysen för fibros mellan sjuka hundar och kontroller var lokalisationen i vänster kammarvägg icke- signifikant, medan sjukdomsgrupp (MMVD eller kontroll) hade ett P-värde på 0,06, ett värde i gränzonen för statistisk signifikans.

Tabell 2

Visar de sjuka hundarnas medelvärde för fibros för varje lokalisering. Medelvärdet räknades fram genom att varje hund fick ett värde mellan 0-4 perivaskulärt, interstitiellt och subendokardiellt i varje preparat. Därefter adderades dessa värden och delades med tre för att ge varje hund ett värde per lokalisering. Hund nr 16 hade inga histologiska bilder färgat med masson trichrome (MTC) på den laterala kammarväggen eller bakre papillen vilket markerats med X.

ID	Fibrosmängd sjuka		
	Främre papill	Lateral kammarvägg	Bakre papill
1	1	1	0,33
2	2	2,33	2
3	0,67	1	1
4	0,67	1	1
5	1	1	1,67
6	1,67	1	1
7	1,33	1,33	2
9	0,67	0,67	1
14	2	2,33	2
15	2	2	1,67
16	1,67	X	X
17	2	2,33	2,33
21	0	0,33	0,33
24	1	1	1

Tabell 3

Visar kontrollhundarnas medelvärde för fibros för varje lokalisering. Medelvärdet räknades fram genom att varje hund fick ett värde mellan 0-4 perivaskulärt, interstitiellt och subendokardiellt för varje lokalisering. Därefter adderades dessa värden och delades med tre för att ge varje hund ett värde per preparat.

ID	Fibrosmängd kontroller		
	Främre papill	Lateral kammarvägg	Bakre papill
11	1	1	1
13	2	2,33	1
22	1	0,33	2
26	1,33	2	2,33
28	1	1,67	2,33
31	1	1	1
32	0,33	0,33	0,33
33	2	0,33	0,67
35	0,33	0,33	1

36	0,67	0,33	0,33
37	0,33	0,33	0,33

Fett

Inga signifikanta skillnader kunde detekteras mellan sjuka och kontroller när mängden fettinfiltration mättes i myokardiet. (se tabell 4 och 5). P-värde för fettinfiltrationen var 0,23 och var därför icke-signifikant.

Tabell 4

Visar de sjuka hundarnas medelvärde för fettmängd för varje lokalisation. Medelvärdet räknades fram genom att varje hund fick ett värde mellan 0-4 perivaskulärt, interstitiellt och subendokardiellt i varje preparat. Därefter adderades dessa värden och delades med tre.

ID	Fettmängd sjuka		
	Främre papill	Lateral kammarvägg	Bakre papill
1	1	1,33	1
2	2	2	0
3	2,33	2	1,33
4	1	1	1
5	0,67	1	1
6	0,67	0,67	1,67
7	1	1,33	1
9	1	1,33	1
14	1,33	1,67	1,67
15	1	2,33	1
16	1	1	1
17	1	0,67	1,67
21	1,33	0,33	0,33
24	0,33	1,33	1,33

Tabell 5

Visar kontrollhundarnas medelvärde för fettmängd för varje lokalisation. Medelvärdet räknades fram genom att varje hund fick ett värde mellan 0-4 perivaskulärt, interstitiellt och subendokardiellt i varje preparat. Därefter adderades dessa värden och delades med tre.

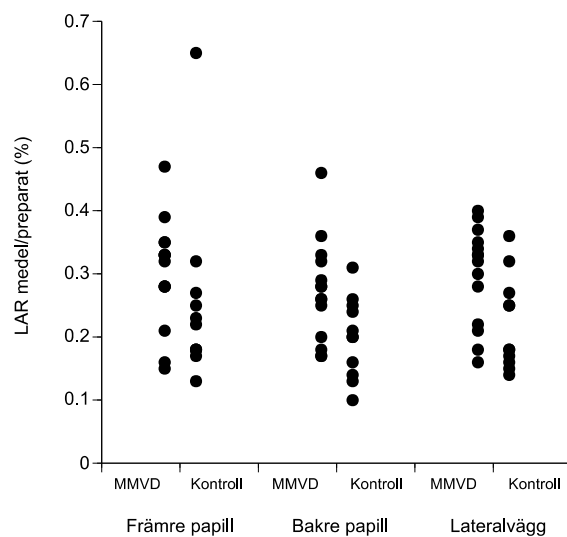
ID	Fettmängd kontroller		
	Främre papill	Lateral kammarvägg	Bakre papill
11	1	1	1
13	1,67	1,67	1,33
22	2,67	1,33	1,67
26	1	1	1
28	1	1	1,33
31	1	1	1
32	0,67	1,33	0,33
33	1,33	1,33	0,33
35	1	0,67	0

36	0,33	0,33	0,67
37	0,33	0	0

Lumen/area- ratio

Förändringar i kärlväggen jämfördes mellan de olika grupperna genom att räkna ut lumen/area- ratios medelvärde i främre papill, vänster kammarvägg och bakre papill (se figur 1). Siffrorna anges i procent.

Figur 1 Diagrammet visar skillnad mellan sjuka och kontroller avseende lumen/area-ratio (LAR) i procent.

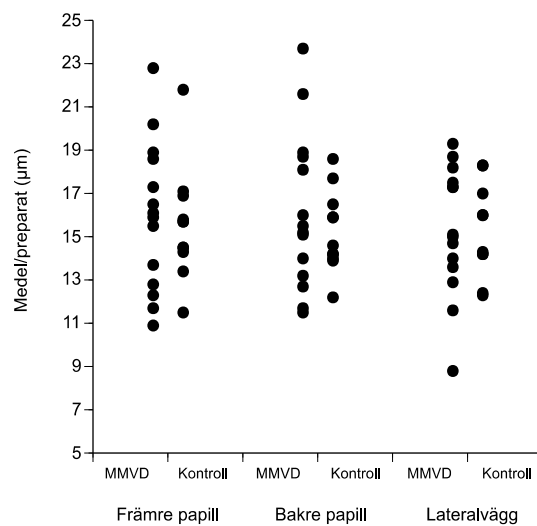


Det var en signifikant skillnad mellan sjuka och kontroller gällande LAR ($p=0,008$). Ingen signifikant skillnad påvisades dock gällande LAR och lokalisation inom samma grupp av hundar.

Fibertjocklek

Storleken på myocyternas bredd jämfördes mellan de två grupperna (se figur 2). Ingen signifikant skillnad mellan sjuka och kontrollhundar kunde påvisas ($P=0,85$).

Figur 2 Diagrammet visar jämförelse mellan sjuka och friska avseende myocytjtjocklek i mikrometer.



DISKUSSION

I denna studie har histologiska förändringar i vänster kammarvägg dokumenterats hos hundar diagnostiserade med MMVD och hos friska kontrollhundar.

Studien visade att det var ungefär lika vanligt med fokala områden med nedsatt striering i myokardiet hos både sjuka och friska hundar. Det var sju sjuka hundar som visade detta, jämfört med fyra kontrollhundar. Procentdelen med dessa fynd blir då 50 % (7/14) av de sjuka och 36 % (4/11) av kontrollerna. Intressant är att den hunden med mest utbredda områden med nedsatt striering var kontrollhund nr 11, en treårig CKCS. Han uppvisade multifokala områden med detta fynd i alla tre preparat, medan övriga hundar, både sjuka och friska, endast hade fokala områden med samma förekomst. Då denna hund inte var ultraljudsundersökt går det inte att uttala sig om ifall han hade patologiska förändringar på hjärtat som inte diagnosticerades när hunden fortfarande var i livet. En annan intressant iakttagelse är att det inte kunde ses någon större skillnad avseende myocyternas histopatologiska utseende vid jämförelse mellan de hundar (tre stycken) som diagnosticerats med lindrig MMVD och de som hade kraftig MMVD (elva stycken).

Endast en sjuk hund, nr 7, hade områden perivaskulärt med degenerativa myocyter. Alla kärl innehöll inflammatoriska celler hos denna hund och degenerationen torde vara en inflammationsrespons. Att inflammationen skulle vara ett resultat av MMVD är dock inte troligt. Det finns idag inga vetenskapliga bevis för att inflammation hittas i samband med MMVD (Buchanan, 1977; Whitney, 1967).

P-värdet för mängden fibros hamnade på 0,06 vilket är nära statistisk signifikans. Tidigare studier har visat på tydlig signifikant skillnad mellan sjuka och friska hundar (Falk *et al.*, 2006; Falk, 2008). I de studierna har de största förändringarna kunnat ses i papillerna och subendokardiellt. I denna studie sågs ingen signifikant skillnad vare sig mellan grupper (sjuka och kontroller) eller lokalisation i vänster kammare i preparaten. Myokardiell fibrotisering är ett karakteristiskt fynd hos hundar med MMVD och att det inte kunde konstateras någon skillnad vid mätning i denna studie kan eventuellt bero på att uppskattningen var subjektiv samt att mängden hundar var färre än i tidigare studier. Uppskattningen gjordes dessutom i fasta tal enligt en ordinal skala vilket försvårar statistiken genom att minska sannolikheten för statistisk signifikans då många hundar delar samma score. Eventuellt hade utfallet blivit statistiskt signifikant om mätningen hade gjorts med kontinuerliga tal istället, exempelvis i %. Detta går dock inte att uttala sig säkert om, men det hade varit intressant att göra mätningarna i % för att se resultatet.

Skillnad i fettinfiltration mellan grupperna var inte heller signifikant i denna studie. Ett resultat som är föga anmärkningsvärt då inga indikationer, i tidigare studier, visat att mängden fett i myokardiet skulle öka hos hundar med MMVD.

Fibertjockleken var ungefär lika mellan sjuka och kontroller. Hos hundar med MMVD ses ofta en eccentric hypertrofi. För att bedöma hypertrofin hade ett värde på hundarnas vikt jämfört med hjärtats vikt varit intressant. Tyvärr saknas hjärtvikten hos hundarna. Att fibrerna inte är tunnare kan bero på att myocyter hos hundar med MMVD snarare blir längre än tunnare, varför en studie av längden på myocyterna hade varit av intresse.

Det mest intressanta fyndet i denna studie var kärlförträngningarna var betydligt vanligare hos sjuka hundar jämfört med kontrollerna, P-värde på 0,008. Detta fynd överensstämmer med tidigare studier (Falk *et al.*, 2006; Falk, 2008). Det gick däremot inte att se någon utmärkande skillnad i lokaliseringen i vänster kammare inom samma grupp av hundar. Tidigare studier har visat på störst förändringar subendokardiellt och i papillerna (Jönsson, 1972; Detweiler, 1989). Varför hundar med MMVD får dessa förändringar i kärlen är fortfarande inte klarlagt. Det är dock känt att ökad mängd arterioskleros

är associerat med minskad systolisk funktion (Falk, 2008). Hundar med MMVD har nedsatt systolisk hjärtfunktion vid kraftigare stadier av sjukdomen. Arteriosklerosen tillsammans med ökad fibros, eccentric hypertrofi samt volymöverbelastning i hjärtat är sannolikt alla med och bidrar till dysfunktionen.

Kanske hade resultatet i denna studie sett annorlunda ut ifall hundarna i kontrollgruppen varit äldre. Medianåldern hos kontrollhundarna var 2 år och arterioskleros är ett vanligt fynd hos äldre hundar (Falk, 2008).

Det var 25 hundar som deltog i denna studie vilket kan anses vara relativt få. Det hade varit intressant att göra samma mätningar på en större grupp både sjuka och kontroller för att se om utfallet blivit lika.

Sammanfattningsvis visade undersökningen att, i jämförelse med kontrollhundar, hade MMVD hundar tjockare kärlväggar och de tenderade att ha mer fibros. Ingen skillnad förelåg i fettmängd, myocytfibertjocklek eller myocytstriering. Fler studier behövs som undersöker vävnadsförändringar i hjärtat på hundar med MMVD. Informationen vi får från vävnadsundersökningar kan vara av värde för andra hundar med MMVD, men också för människor. Att få klarhet i orsak till sjukdomens uppkomst och utveckling skulle gynna såväl veterinärmedicin som humanvård. Ytterligare kunskap om MMVD skulle vara av nytta då progressionen av sjukdomen kanske skulle kunna bromsas. Förhoppningen är att ökad kunskap leder till en mer optimerad behandling för drabbade individer.

TACK

Ingrid Ljungvall för fantastiskt handledarskap och inspirerande lärarroll. Dina synpunkter och åsikter har varit avgörande för att få ihop det här arbetet. Din omtanke för djur och människor kombinerat med ditt otroliga engagemang för veterinärmedicinen är oerhört inspirerande.

Biträdande handledare och inspirerande lärare **Jens Häggström** för all hjälp med statistik samt dina goda råd och kommentarer om arbetet. Din enorma kunskap och ditt ständigt goda humör är uppiggande. Det har varit en fröjd att få arbeta med dig!

Biträdande handledare och roliga lärare **Fredrik Södersten** för all ovärderlig hjälp med mikroskopering. Du har varit otroligt tålmodig med mina frågor. Din kunskap inom patologin är imponerande. Dessutom, ett stort tack för hundedagsplatsen åt, den inte längre så lilla, Melker.

Biträdande handledare och kompetente lärare **Katja Höglund** för alla goda råd och synpunkter i arbetet. Din positiva inställning och din otroliga kunskap inom området har varit till stor hjälp.

Examinator och mycket uppskattad lärare **Helene Hamlin** för att du tagit dig tid och läsa igenom arbetet och närvara på den muntliga redovisningen.

Personal på patologen SLU som hjälpt till med de histologiska snitten. Utan er hjälp hade denna studie aldrig kunnat genomföras.

Ninni, min vapendragare tillika goda vän. Nu är vi snart veterinärer!

Alexander Flodin för den fantastiska hjälpen med fibrosmätningen, det har varit oskattbart.

Min fina vän **Jenny Klarenfjord** för hjälp med tabeller och stöttning de gånger det verkligen behövts. Du är en klippa.

Min älskade familj. Mamma **Kerstin**, pappa **Lars** och bror **Magnus**, ni är bäst.

Kim Frandsen, mitt hjärta. Du är otrolig.

Melker för att du är det levande beviset på genuin skägglycka.

REFERENSER

- Anne, W., Willems, R., Roskams, T., Sergeant, P., Herijgers, P., Holemans, P., Ector, H. & Heidebuchel, H. (2005). Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 67(4), 655-66.
- Aupperle, H., März, I., Thielebein, J., Keifer, B., Kappe, A. & Schoon, H.A. (2009a). Immunohistochemical characterization of the extracellular matrix in normal mitral valves and in chronic valve disease (valvular endocardiosis) in dogs. *Res vet Sci* 87(2), 277-83.
- Aupperle, H., Thielebein, J., Keifer, B., März, I., Dinges, G. & Schoon, H.A. (2009b). An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *Vet J* 180(1), 88-94.
- Aupperle, H., Thielebein, J., Keifer, B., März, I., Dinges, G., Schoon, H.A. & Schubert, A. (2009c). Expression of genes encoding matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in normal and diseased canine mitral valves. *J Comp Pathol* 140(4), 271-7.
- Aupperle, H., Disatian, S. (2012). Pathology, protein expression and signaling in myxomatous mitral valve degeneration: Comparison of dogs and humans. *Journal of Veterinary Cardiology* (14), 59-71.
- Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Höggström, J., Hamlin, R., Keene, B., Luis-Fuentes, V. & Stepien, R. (2009) Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Canine Chronic Valvular Heart Disease (ACVIM Consensus statement). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23(6), 1142-1150. Review.
- Borgarelli, M. & Häggström, J. (2010) Canine Degenerative Myxomatous Mitral Valve Disease: Natural History, Clinical Presentation and Therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 40(4), 651-663.
- Buchanan, J.W. Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs. (1977) *Adv Vet Sci* 21, 57-106.
- Carabello, B.A. (2002). Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail* 8(6 Suppl), S258-63.
- Corcoran, B.M., Black, A., Anderson, H., McEwan, J.D., French, A., Smith, P. & Devine, C. (2004). Identification of surface morphologic changes in the mitral valve leaflets and chordae tendineae of dogs with myxomatous degeneration. *Am J Vet Res* 65(2), 198-206.
- Cornell, C., Kittleson, M., Della Torre, P., Häggström, J., Lombard, C., Pedersen, H., Vollmar, A. & Wey, A. (2004) Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18(3), 311-321.
- Conell, P.S., Han, R.I., Grande-Allen, J. (2012) Differentiating the aging of the mitral valve from human and canine myxomatous degeneration. *Journal of Veterinary Cardiology* 14, 31-45.
- Detweiler, DK. (1989). Spontaneous and induced arterial disease in the dog: pathology and pathogenesis. *Toxicol Pathol* 17, 94-108.
- Egenvall, A., Bonnett, B. & 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* 20(4), 894-903.
- Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (Red.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7ed, 1299-1319- St Louis: Elsevier Saunders.
- Falk, T., Jönsson, L., Olsen, L.H., Pedersen, H.D. (2006). Arteriosclerotic changes in the myocardium, lung, and kidney in dogs with chronic congestive heart failure and myxomatous mitral valve disease. *Cardiovascular Pathology* 15, 185-193.
- Falk, T. (2008) Canine arteriosclerosis Occurrence and importance in different heart diseases.
- Fox, P.R. (2012) Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. *Journal of Veterinary Cardiology* 14, 103-126.
- Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L.P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56(1), 56-64.
- Han, R.I., Black, A., Culshaw, G., French, A.T. & Corcoran, B.M. (2010). Structural and cellular changes in canine myxomatous mitral valve disease: an image analysis study. *J Heart Valve Dis* 19(1), 60-70.
- Hadian, M., Corcoran, B.M. & Bradshaw, J.P. (2010). Molecular changes in fibrillar collagen in myxomatous mitral valve disease. *Cardiovasc Pathol* 19(5), 141-8.
- Hadian, M., Corcoran, B.M., Han, R.I., Grossman, J.G & Bradshaw, J.P. (2007). Collagen organization in canine myxomatous mitral valve disease: an x-ray diffraction study. *Biophys J* 93(7), 2472-6.
- Hutchinson, K.R., Stewart, J.A., Jr & Lucchesi, P.A. (2010) Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48(3), 564-569. Review.
- Häggström, J. (2012) Myxomatous mitral valve disease. I: *BSAVA Manual of Canine and Feline cardiorespiratory Medicine*. 3ed, 186-194.
- Häggström, J., Pedersen, H.D. & Kvart, C. (2004) New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34(5), 1209-1226.
- Jonsson, L. (1972) Coronary arterial lesions and myocardial infarcts in the dog. A pathologic and microangiographic study. *Acta Vet Scand* (38), 1-80.
- Jiranantaskak, T., Rungsipipat, A., Surachetpong, S. (2013). Histopathological changes and apoptosis detection in canine myxomatous mitral valve disease using microarray technique. *Comp Clin Pathol*.
- Kato, S., Spinale, F.G., Tanaka, R., Johnson, W., Cooper, G.T. & Zile, M.R. (1995). Inhibition of collagen cross-linking: effects on fibrillar collagen and ventricular diastolic function. *Am J Physiol* 269(3 Pt2), H863-8.
- Katz, A.M. (2001) Muscle contraction: I: Katz A.M. Ed, *physiology of the heart* 3rd ed, s 135-137.

Kogure, K. (1980). Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. *Nippon Juigaku Zasshi* 42(3), 323-35.

Li, Y.Y., McTiernan, C.F. & Feldman, A.M. (2000) Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovascular Research* 46, 214-224. Review.

Ljungvall, I. (2011) The left ventricle in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease.

Ljungvall, I., Ahlstrom, C., Höglund, K., Hult, P., Kvarn, C., Borgarelli, M., Ask, P., Häggström, J. (2009) Use of signal analysis of heart sounds and murmurs to assess severity of mitral valve regurgitation attributable to myxomatous mitral valve disease in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 70:5, 604-615.

Madsen, M.B., Høier-Olsen, L., Häggström, J., Höglund, K., Ljungvall, I., Falk, T., Wess, G., Stephenson, H., Dukes-McEwan, J., Chetboul, V., Gouni, V., Friis-Proschowsky, H., Cirera, S., Karlskov-Mortensen, P. & Fredholm, M. (2001) Identification of 2 Loci Associated with Development of Myxomatous Mitral Valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *Journal of Heredity* 102(S1), S62-S67.

Olsen, L.H., Fredholm, M. & Pedersen, H.D. (1999). Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Daschunds. *J Vet Intern Med* 13(5), 448-56.

Olsen, L.H., Häggström, J. & Pedersen, H.D. (2010) Acquired valvular heart disease. I: Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (Red.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine* 14(5), 448-456.

Parker, G. H., Kilroy-Glynn, P., (2012) Myxomatous mitral valve disease in dogs: Does size matter? *Journal of Veterinary Cardiology* 14, 19-29.

Pedersen, H.D., Kristensen, B., Norby, B. & Lorentzen, K. (1996) Echocardiographic study of mitral valve prolapse in Dachshunds. *Zentralbl Veterinarmed A* 43(2), 103-10.

Pedersen, H.D., Häggström, J. (2000) Mitral valve prolaps in the dog: a model of mitral valve prolapse in man. *Cardiovascular Research* 47, 234-243.

Rasmussen, C.E., Falk, T., Zois, S.G., Moesgaard, J., Häggström, J., Pedersen, H.D., Åblad, B., Nilsen, H.Y., och Olsen, L.H. (2012) Heart Rate, Heart Rate Variability, and Arrhythmias in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. *J Vet Intern Med* (26), 76-84.

Richards, J.M., Farrar, E.J., Kornreich, B.J., Moise, N.S., Butcher, J.T. (2012) The mechanobiology of mitral valve function, degeneration, and repair. *J Vet Cardiol* 14(1), 47-58.

Spinale, F.G. (2002) Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circulation Research* 90(5), 520-530. Review.

Stephens, E.H., Chu, C.K., Grande-Allen, K.J.(2008) Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve. *Acta Biomater* 4(5), 1148-1160.

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. *J Am Vet Med Assoc* 208(12), 2009-12.

Toumanidis, S.T., Karapanos, N.T., Kottis, K., Kaladaridou, A., Bramos, D., Triikka, C.O., Vasiladiotis, N., Zakopoulos, N. & Mouloupoulos, S.D. (2011) Effect of Dobutamine Combined With Intra-Aortic Balloon Counterpulsation on Left Ventricular Function Early After Acute Myocardial Infarction: Experimental Study. *Artificial Organs* 35(9), 875-882.

Weber, K.T., Anversa, P., Armstrong, P.W., Brilla, C.G., Burnett, J.C., Jr., Cruickshank, J.M., Devereux, R.B., Giles, T.D., Korsgaard, N., Leier, C.V. & et al. (1992). Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 20(1), 3-16.

Whitney, J.C. Cardiovascular pathology. (1967). *J Small Anim Pract* 8, 459-65.

Woessner, J.F., Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* 5(8), 2145-54.

Zheng, J., Chen, Y., Pat, B., Dell'talia, L.A., Tillson, M., Dillon, A.R., Powell, P.C., Shi, K., Shah, N., Denney, T., Husain, A. & Dell'talia, L.J. (2009). Microarray identifies extensive downregulation of noncollagen extracellular matrix and profibrotic growth factor genes in chronic isolates mitral regurgitation in the dog. *Circulation* 119(15), 2086-95.