



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Serumaktivitet av matrix metalloproteinas-2, -9 och -14 hos hundar med myxomatös mitralisklaffdegeneration

Martin Uhrenfeldt

Uppsala

2013

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2013:51*

Serumaktivitet av matrix metalloproteinase-2, -9 och -14 hos hundar med myxomatös mitralisklaffdegeneration

Serum activity of matrix metalloproteinase-2, -9 and -14 in dogs with myxomatous mitral valve disease

Martin Uhrenfeldt

Handledare: Ingrid Ljungvall, Institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Anders Lundequist, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Biträdande handledare: Jens Häggström, Institutionen för kliniska vetenskaper

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

Examinator: Odd Höglund, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2013
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för boimedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0736, Nivå A2E, 30hp*

*Nyckelord: MMP-2, MMP-9, MMP-14, matrix metalloproteinase, myxomatös mitralisklaffdegeneration, hund, hjärta, serumaktivitet
Key words: MMP-2, MMP-9, MMP-14, matrix metalloproteinase, myxomatous mitral valve disease, MMVD, dog, heart, serum activity*

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2013:51

SAMMANFATTNING

Matrix metalloproteinaser (MMPs) är en grupp proteolytiska enzymer som degraderar komponenter i vävnaders extracellulära matrix (ECM). Dessa proteiner spelar en viktig roll i många fysiologiska och patologiska processer. Enzymerna anses vara delaktiga vid olika typer av hjärtsjukdomar där de genom att utöva sin effekt påverkar sammansättningen hos ECM. Aktiviteten hos MMPs hämmas av TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) som är enzymernas specifika inhibitorer. Balans mellan nedbrytning och uppbyggnad av ECM är nödvändigt för att bibehålla hjärtvävnadens normala struktur och funktion. Aktivitet hos vissa MMPs (exempelvis MMP-2, -9 och -14) har i olika studier beskrivits vara involverad i utvecklingen av hjärtsjukdomen myxomatös klaffdegeneration hos hund.

Myxomatös mitralisklaffdegeneration är den absolut vanligaste förvärvade hjärtsjukdomen hos vuxna hundar. Klaffarna genomgår degenerativa processer som förändrar klaffarnas arkitektur och rörelsemönster, vilket resulterar i prolaberering av klaffarna upp i förmaket samt mitralisinsufficiens. Många hundar lever med denna långsamt progredierande sjukdom utan att visa kliniska sjukdomstecken, medan andra hundar med tiden utvecklar tecken på icke-kompenserad hjärtsvikt.

Syftet med arbetet var att undersöka aktiviteten av MMP-2, -9 och -14 i serum hos hundar med olika stadier av myxomatös klaffdegeneration. I studien ingick totalt 66 hundar, varav 21 var friska kontroller. Inga statistiska samband sågs mellan aktivitet av någon av de olika MMPs som analyserades och grad av sjukdom. Resultaten som erhöles visade att aktiviteten av MMP-14 ökade med minskande systoliskt blodtryck ($P=0,031$) och att totalt MMP-9 (proMMP-9 + MMP-9) sjönk med ökande fractional shortening (FS) i vänster kammare ($P=0,027$). Detta kan tolkas som att MMP-14-aktiviteten ökar och MMP-9-aktiviteten sjunker vid nedsatt systolisk funktion. Att de båda enzymerna varierar under sjukdomsutvecklingen kan betyda att de är involverade i olika stadier av sjukdomsutvecklingen. Utifrån vår studie förefaller MMP-2 spela en mindre roll hos hundar med myxomatös mitralisklaffdegeneration.

SUMMARY

Matrix metalloproteinases (MMPs) is a group of proteolytic enzymes, which degrade components of the extracellular matrix (ECM) of different tissues. These proteins play an important role in different physiological and pathological processes. The enzymes are thought to be important in various kinds of heart disease because of their effect on the composition of ECM. The MMP activity is inhibited by TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) which are specific inhibitors of the enzymes. Balance between production and degradation of the ECM is crucial for maintaining normal structure and function of the heart parenchyma. The activity of certain MMPs (e.g. MMP-2, -9 and -14) has been described to have part in the development of myxomatous mitral valve disease in dogs.

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is the most common acquired heart disease in adult dogs. In MMVD, the mitral valve undergo degenerative changes leading to altered valve architecture, resulting in prolapse of the mitral valve into the atrium and mitral insufficiency. A large number of dogs live with the disease without showing clinical signs of disease, whilst others develop signs of non-compensated congestive heart failure.

The aim of this thesis was to investigate the activity of MMP-2, -9 and -14 in serum from dogs with different stages of MMVD. A total of 66 dogs was included in the study, of which 21 were classified as healthy. No overall significance was found between the activity levels of the different MMPs and the different stages of MMVD. The results showed that the activity of MMP-14 increased with decreasing systolic blood pressure ($P=0,031$) and that total MMP-9 (proMMP-9 + MMP-9) decreased with increasing fractional shortening (FS) of the left ventricle ($P=0,027$). These results can be interpreted as follows: The activity of MMP-14 increases and the activity of MMP-9 decreases when systolic function is impaired. Activity of both enzymes vary during pathogenesis which may implicate that they are involved in different stages of disease progression. This study suggests that MMP-2 play a minor role in dogs with MMVD.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

| | |
|---|----|
| INLEDNING | 1 |
| Syfte | 1 |
| LITTERATURÖVERSIKT | 2 |
| Myokardiell histologi | 2 |
| Myokardiell remodelering | 2 |
| Matrix metalloproteinaser | 2 |
| Myxomatös mitralisklaffdegeneration | 5 |
| Matrix metalloproteinaser och deras inhibitorer vid myxomatös klaffdegeneration | 7 |
| MATERIAL OCH METODER | 8 |
| Inklusionskriterier | 8 |
| Datainsamling | 8 |
| Analysmetoder | 9 |
| Statistisk analys | 11 |
| RESULTAT | 11 |
| Zymografi..... | 12 |
| Western blot | 12 |
| Statistiska analyser | 13 |
| DISKUSSION | 14 |
| STUDIENS SVAGHETER..... | 15 |
| SLUTSATS | 15 |
| LITTERATURFÖRTECKNING | 16 |

FÖRKORTNINGAR

Ao = Aorta

CKCS = Cavalier King Charles Spaniel

ECM = Extracellulärt matrix

FS = Fractional shortening (ett mått på vänster kammarens kontraktilitet)

HF = Hjärtfrekvens

LA = Vänster kammare

LVIDd = Vänster kammarens innerdiameter i slutdiastole

LVIDd_{inc} = Ökning av vänster kammarens interna dimension i slutdiastole

LVIDs = Vänster kammarens innerdiameter i slutsystole

LVIDs_{inc} = Ökning av vänster kammarens interna dimension i slutsystole

MMP = Matrix metalloproteinaser

MR = Mitralisregurgitation

MT-MMP = Membranbundet matrix metalloproteinaser

SAP = Systoliskt blodtryck

TIMP = Tissue inhibitor of metalloproteinases (MMP-hämmare)

INLEDNING

Matrix metalloproteinaser (MMPs) är en relativt nyupptäckt grupp enzymer som är involverade i både fysiologiska och patologiska processer (Visse & Nagase, 2003). MMPs har i tidigare studier visats vara delaktiga i patogenesen hos flera hjärtsjukdomar hos människa och hund. Mer forskning krävs för att öka förståelsen om MMPs betydelse i utvecklingen av myxomatös mitralisklaffdegeneration.

Syfte

Syftet med detta examensarbete var att undersöka aktiviteten av matrix metalloproteinaser-2, -9 och -14 i serum från hundar med olika stadier av myxomatös mitralisklaffdegeneration.

LITTERATURÖVERSIKT

Myokardiell histologi

Största delen av myokardiet utgörs av myocyter. Varje myocyt består av myofibrillbuntar som innehåller långsgående små enheter kallade sarkomerer. Sarkomererna, som är uppbyggda av myosin- och aktinfilament, är den fundamentala kontraherande kraften i myocyten (Katz, 2001). Myocyterna hålls i rätt position inuti myokardiet av vävnadens extracellulära matrix (ECM), som skänker stabilitet och styrka åt parenkymet (Spinale, 2002). ECM produceras av endoteliala och stromala celler i hjärtvävnaden. ECM är ett komplext sammansatt nätverk som består av bl a kollagen, elastin, fibronectin, laminin, proteoglykaner och glykosaminoglykaner (Aupperle & Disatian, 2012). Fördelningsmönstret av mitralisklaffarnas ECM-komponenter skänker dem elasticitet, stabilitet och flexibilitet (Aupperle & Disatian, 2012).

Myokardiell remodelering

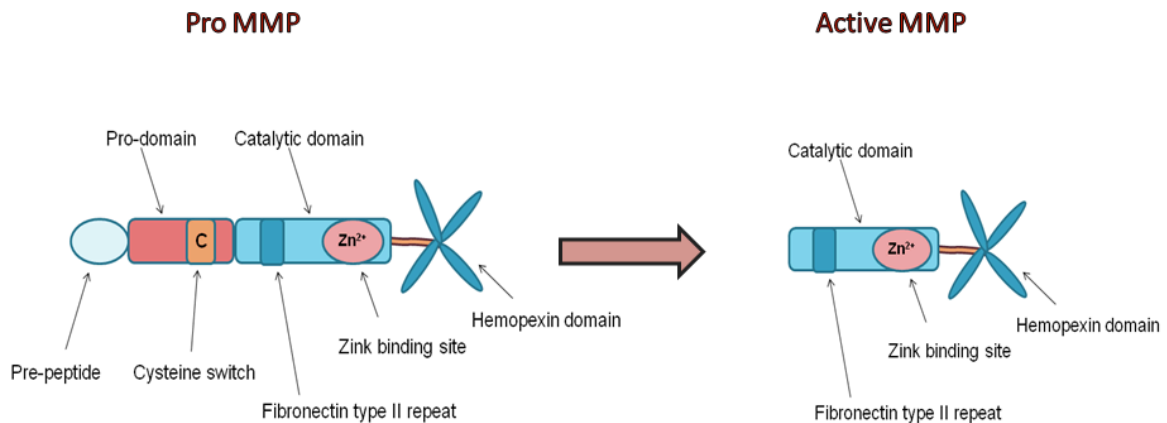
ECM är ingen statisk struktur utan ett dynamiskt nätverk som ständigt remodeleras, dvs strukturellt ändrar sammansättning och utseende (Aupperle & Disatian, 2012). Vid remodelering av hjärtvävnad kan även myocyterna ändra utseende och prestanda (Hutchinson *et al.*, 2010). Balans mellan syntes och degradering av ECM bibehåller hjärtparenkymets normala struktur och funktion (Aupperle & Disatian, 2012). Sammansättningen av ECM regleras på flera sätt. Fibroblasten är den vanligaste celltypen i ECM och producerar de flesta ECM-komponenterna på egen hand (Pelouch *et al.*, 1993). Fibroblasten kan också utsöndra enzymer som reglerar remodeleringen av ECM; såsom matrix metalloproteinaser (MMPs), MMPs inhibitorer samt andra proteolytiska enzymer (Hutchinson *et al.*, 2010). Det har föreslagits att ECM spelar en viktig roll i myokardiets anpassning till patologisk stress vid hjärtsjukdom. Denna anpassning underlättar hjärtats remodelering (Spinale, 2002).

Matrix metalloproteinaser

Matrix metalloproteinaser är en familj proteaser med liknande struktur och funktion som hydrolyserar och degraderar ECM-komponenter (Visse & Nagase, 2003). Dessa proteiner spelar en central roll i många biologiska processer som t ex embryogenes, sårhäkning, angiogenes samt vid normal ombildning av vävnad. MMPs är också involverade i många sjukdomstillstånd så som artrit, cancer och vävnadssår (Visse & Nagase, 2003). Enzymerna är kalcium- och zinkberoende och produceras och utsöndras som inaktiva proenzym (zymogener), även kallade proMMPs (Aupperle *et al.*, 2009a; Aupperle *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2000). Efter sekretionen binder proMMPs till olika ECM-komponenter beroende på MMP-typ. Bindningen fungerar som extracellulär förvaring tills proteaserna stimuleras, aktiveras och mobiliseras (Li *et al.*, 2000). Vissa av enzymerna stannar emellertid i cellen, förankrade i cellmembranet (Visse & Nagase, 2003).

Generellt består MMPs av en prodomän, en katalytisk domän, en "hinge region" och en hemopexindomän. I prodomänen finns en "cysteine switch" som håller proteinet i dess

inaktiva proMMP-form. Det finns en "zinc-binding site" i den katalytiska domänen som karaktäriserar proteinaserna i denna familj (Visse & Nagase, 2003).



Figur 1. Schematisk illustration över hur det inaktiva enzymet proMMP övergår till sin aktiva form där prodomänen klyvts bort. Med tillåtelse från Ingrid Ljungvall.

Matrix metalloproteinaser degraderar olika typer av ECM-komponenter och delas in i 6 huvudgrupper baserat på denna substratspecificitet. Dessa enzymgrupper är: kollagenaser, gelatinaser (bl a MMP-2 och MMP-9), stromelysiner, matrilysin, membranbundna MMPs (MT-MMPs, exempelvis MMP-14) samt övriga MMPs (Visse & Nagase, 2003).

En viktig funktion hos MMPs anses vara nedbrytning av ECM vid vävnadsresorbtion (Visse & Nagase, 2003) samt under vävnadsremodellering (Li *et al.*, 2000). Remodellering av myokardiets matrix bidrar till utvecklandet av hjärtdilatation och svikt (Li *et al.*, 2000). En ökning av MMP-aktivitet kan inducera en uppluckring av ECMs struktur vilket tillsammans med andra processer i myokardiet resulterar i dilatation av hjärtats hålrum. Det har även föreslagits att en minskad MMP-aktivitet minskar ECM-degraderingen vilket resulterar i ökad fibrotisering av hjärtvävnaden (Anné *et al.*, 2005). Eftersom ECM fungerar som reservoar för biologiskt aktiva molekyler (ex tillväxtfaktorer) kan degradering av det extracellulära matrixet leda till ändrat cellbeteende. Detta gör att dessa proteasers funktion involverar mer än bara degradering och att MMPs har en komplex roll i hälsa och sjukdom (Visse & Nagase, 2003).

Aktivering och hämning

Under normala förhållanden regleras MMP-nivåerna noga på flera plan: Via transkription, aktivering av proMMPs, interaktion med specifika ECM-komponenter samt via inhibition av endogena inhibitorer (Visse & Nagase, 2003). Matrix metalloproteinaser aktiveras bl a av andra MMPs, angiotensin II, endothelin-1, katekolaminer, noradrenalin, interleukin 1-beta (IL-1 β), tumour necrosis factor alfä (TNF- α), trypsin, urokinas och plasmin (Aupperle &

Disatian, 2012). Lågt pH och värmebehandling kan också leda till aktivering. (Visse & Nagase, 2003). Hämmningen regleras via substratinteraktion och via endogena, fysiologiska inhibitorer (Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)) (Li *et al.*, 2000). TIMPs är specifika MMP-inhibitorer som bidrar till kontrollen av den lokala MMP-aktiviteten i vävnader genom irreversibel komplexbildning (Aupperle *et al.*, 2009a). Förlorad kontroll över MMP-aktivitet kan resultera i sjukdomar som artrit, cancer, ateroskleros, aneurysmer, nefrit, vävnadssår och fibros (Visse & Nagase, 2003). Oxidativ och mekanisk stress kan eventuellt också påverka uttrycket av MMPs och TIMPs.

Samverkan mellan MMPs, TIMPs och deras regulatorer styr fibrotiseringshastigheten i hjärtvävnaden, och justering av denna process kan därför förändra hjärtats fibrotisering och därmed dess funktion (Li *et al.*, 2000). I kardiovaskulär vävnad deltar främst MMP-1, -2, -3, -9, -13 och -14 (Aupperle & Disatian, 2012; Polyakova *et al.*, 2004).

Matrix metalloproteinases-2 & -9

MMP-2 (gelatinas A) och MMP-9 (gelatinas B) ingår i gruppen gelatinaser och dessa enzym degraderar kollagen typ IV, V, VII, gelatin, fibronectin, laminin och elastin. MMP-9 är särskilt involverat i nedbrytningen av proteoglykaner (Aupperle *et al.*, 2009a). MMP-2, men inte MMP-9, kan bryta ner kollagen typ I, II och III (Visse & Nagase, 2003).

Matrix metalloproteinases-14

MMP-14 ingår i gruppen MT-MMPs (membranbundna MMPs) som är en grupp membranbundna matrix metalloproteinaser (Aupperle & Disatian, 2012). MT-MMPs aktiveras intracellulärt vilket gör att de, olikt andra MMPs, utsöndras proteolytiskt aktiva. Då dessa enzymer sitter förankrade i cellmembranet kan de endast utöva fokal proteolytisk aktivitet på ECM (Spinale, 2002). Ett antal celler i myokardiet uttrycker MT-MMPs, exempelvis fibroblaster, myocyter och vaskulära glatta muskelceller (Aupperle & Disatian, 2012). MMP-14 har kollagenolytiska egenskaper och kan degradera kollagen typ I, II och III (Visse & Nagase, 2003). Liket alla andra MT-MMPs (förutom MT4-MMP) kan MMP-14 degradera flera ECM-molekyler samt aktivera andra MMPs (Aupperle & Nagase, 2012). Enzymet spelar också en viktig roll i angiogenesen (Visse & Nagase, 2003). Det har visats att TIMPs inte effektivt kan binda in till MT-MMPs, varför det verkar som att MT-MMPs inte berörs av den lokala inhiberingen (Aupperle & Disatian, 2012).

Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)

Fyra TIMPs har identifierats hos ryggradsdjur. Vid patologiska tillstånd, associerade med obalans i MMP-aktivitet, anses förändringar i TIMP-nivåer vara viktiga på grund av deras direkta effekt på MMP-aktiviteten (Visse & Nagase, 2003). Grad av TIMP-aktivering kan även bestämma vilken funktion en TIMP har i vävnaden. Exempelvis stimulerar TIMP-2 i låga nivåer proMMP-2-aktivering medan höga nivåer av TIMP-2 inaktiverar MMP-2 och MMP-14 (Li *et al.*, 2000). Utöver att hämma MMPs har TIMPs andra biologiska funktioner, exempelvis potentierar TIMP-1 och -2 erytropoesen och stimulerar cellväxt. Ett överuttryck av TIMP-1, -2 och -3 har visats minska tumörtillväxt (Visse & Nagase, 2003).

Användande av TIMPs som terapeutiskt verktyg vid behandling av kardiovaskulär sjukdom och cancer där MMPs medverkat har stor potential. Forskningen står dock fortfarande i startgroparna på området och de kliniska försöken som utförts hittills har varit utan positiva resultat. Att behandla med brett agerande TIMPs kan dock hämma fler MMPs än önskat, vilket kan få negativa bieffekter. Önskvärt vore om specifika smalspektrum-TIMPs kunde framställas så det blir möjligt att hämma precis det MMP som är aktuellt (Visse & Nagase, 2003).

Myxomatös mitralisklaffdegeneration

Myxomatös degeneration av mitralisklaffarna är den absolut vanligaste förvärvade hjärtsjukdomen hos vuxna hundar (Häggström *et al.*, 2004; Fox, 2012; Black *et al.*, 2005; Borgarelli & Häggström, 2010; Richards *et al.*, 2012) och förorsakar flest hjärtrelaterade dödsfall hos hund (Fox, 2012). Myxomatös klaffdegeneration representerar 75% av alla kardiovaskulära sjukdomar hos hund (Borgarelli & Häggström, 2010). Sjukdomen kan drabba alla hundar men prevalensen varierar kraftigt mellan olika raser (Borgarelli & Häggström, 2010). Vanligast är tillståndet hos små-medelstora raser såsom Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), tax, pudel, papillon och chihuahua (Egenvall *et al.*, 2006). Sjukdomen är ovanlig hos unga hundar men är vanlig hos äldre individer. Hanhundar uppvisar en tidigare sjukdomsdebut jämfört med tikar (Häggström *et al.*, 2004; Egenvall *et al.*, 2004; Borgarelli & Häggström, 2010).

Patogenes och patofysiologi

Man har länge ansett att förändringarna vid myxomatös klaffdegeneration är sekundära till långvarigt slitage, men eftersom inte alla äldre hundar uppvisar sjukdomen måste även andra faktorer spela in. Flera teorier har presenterats för att försöka förklara uppkomsten av sjukdomen, men etiologin bakom myxomatös klaffdegeneration är ännu inte helt känd. Eftersom vissa raser drabbas oftare än andra har en genetisk bakgrund misstänkts under lång tid. Detta konfirmerades av två studier (Swenson *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1999) som visade på genetisk predisposition för sjukdomen hos CKCS och tax. Vidare identifierade Madsen *et al.* (2011) två loci i genomet hos CKCS, associerade med utvecklandet av myxomatös klaffdegeneration.

Myxomatös klaffdegeneration orsakas av en progressiv myxomatös degeneration av de atrioventrikulära klaffarna (Häggström *et al.*, 2004). Den myxomatösa degenerationen förvandlar de normalt tunna och genomskinliga klaffseglen till nodulärt förtjockade och deformerade strukturer (Fox, 2012) vilket resulterar i klaffinsufficiens. Förändringarna inkluderar en progressiv expansion av spongiosalagret och nedbrytning av fibrosalagret. Detta ses oftast först i området där klaffseglen möts under systole. Klaffsegelns spongiosalager blir förtjockat med ökad mängd ECM innehållande bl a glykosaminoglykaner (GAGs) och proteoglykaner. Fibrosalagret tappar sin normalt organiserade kollagenstruktur och minskar i storlek (Fox, 2012). Den förändrade klaffarkitekturen leder till förändrat rörelsemönster hos klaffarna som prolaberar in i förmaket, vilket resulterar i mitralisregurgitation. Prolaberingen tillsammans med mitralisregurgitationen ger ökad påfrestning på klaffen, vilket kan leda till

endotelskador med efterföljande aktivering av valvulära interstitiella celler. Aktiveringen ger subendotelial deponering av glykosaminoglykaner vilket ytterligare förvärrar sjukdomsförloppet och regurgitationen (Black *et al.*, 2005). Den kroniska mitralisregurgitationen leder till en vänstersidig volymsöverbelastning med efterföljande förmaks- och kammardilatation. Kammardilatationen i sig kan orsaka en dilatation av hjärtats mitralisannulus, vilket förvärrar regurgitationen ytterligare (sekundär mitralisregurgitation) (Ahmed *et al.*, 2009; Fox, 2012). Mitralisregurgitation kan förorsakas av förändrade klaffar, dilatation av mitralisannulus, ruptur av chordae tendineae eller felaktig kontraktion av papillarmuskulaturen. Flera av dessa faktorer kan vanligtvis identifieras vid myxomatös klaffdegeneration (Olsen *et al.*, 2010). I tidigt skede av sjukdomen påverkar en lindrig regurgitation över mitralis inte hjärtats funktion och storlek. Med progredierande sjukdom förvärras mitralisregurgitationen vilket ger dilatation av vänster förmak (Häggström *et al.*, 2004) och sent i sjukdomsförloppet även minskad hjärtminutvolym och sänkt blodtryck (Ljungvall *et al.*, 2011a). Kroppen kompenserar detta genom kardiovaskulära mekanismer för att bibehålla hjärtats minutslagvolym, exempelvis genom att öka blodvolymen. Vänster kammare kompenserar den minskade hjärtminutvolymen genom att öka den slutdiastoliska fyllnadsgraden (Olsen *et al.*, 2010). Detta leder till eccentric hypertrofi av kammarmuskulaturen vilket betyder att kammaren dilateras men vägg tjockleken förblir oförändrad (Grossman *et al.*, 1975). Hundar kan tolerera detta tillstånd i flera år, dock ger kronisk volymöverbelastning och den eccentrica hypertrofin gradvis en minskande kontraktionsförmåga hos myokardiet, även hos hundar med kompenserad hjärtsvikt (Olsen *et al.*, 2010). Samtidig myokardiell arterioskleros kan förvärra situationen ytterligare genom att ge upphov till mikroinfarkter i myokardiet vilket minskar kontraktiliteten samt ökar riskerna för hjärtsvikt eller plötslig död (Falk *et al.*, 2006).

Kliniska sjukdomstecken

Sjukdomen karaktäriseras av en lång preklinisk period vilket gör att många hundar dör av andra anledningar innan de hinner utveckla hjärtsvikt (Egenvall *et al.*, 2006). Därför varierar graden av kliniska sjukdomstecken hos patienterna med myxomatös klaffdegeneration också kraftigt. Vissa förblir asymptomatiska medan andra utvecklar lungödem vilket är ett livshotande tillstånd (Borgarelli *et al.*, 2012). Det viktigaste kliniska sjukdomstecknet är det systoliska blåsljud som hörs bäst över apex på vänster sida av thorax (Häggström *et al.*, 1995). Med progredierande sjukdom kan hunden drabbas av dyspné, letargi, anorexi, motionsintolerans, svimningar, viktneidgång och ascites (om högersidig hjärtsvikt utvecklats) (Häggström *et al.*, 2004). Hosta är också ett vanligt sjukdomstecken hos hundar med myxomatös klaffdegeneration. Hosta ses vid kardiogent lungödem eller när förstoring av vänster förmak orsakar kompression av huvudbronkerna (Borgarelli & Häggström, 2010). Sjukdomen kan även ge plötsliga dödsfall, då associerade med ruptur av chordae tendineae, kammararytmier eller hjärttamponad (Olsen *et al.*, 2010).

Diagnos

Hundar med myxomatös klaffdegeneration uppvisar ett systoliskt blåsljud som vid auskultation hörs bäst över mitralisområdet. Intensiteten på blåsljudet korrelerar med

sjukdomsgrad hos små raser inklusive CKCS (Ljungvall *et al.*, 2009, Häggström *et al.*, 1995). Vid sjukdomen ses, som tidigare beskrivet, ofta en dilatation av vänster förmak samt kammare vilket kan verifieras med röntgen. Då en hund med rätt signalement och ålder uppvisar ett systoliskt blåsljud samt ev förstorat hjärta på röntgen hamnar myxomatös klaffdegeneration högt på listan över möjliga differentialdiagnoser. Definitiv diagnos ställs med hjälp av ultraljudsundersökning av hjärtat där förtjockade och/eller prolaberande mitralisklaffar och mitralisregurgitation kan ses (Borgarelli & Häggström, 2010). Ultraljud ger även information om sjukdomens svårighetsgrad via mätning av vänster förmaks- och kammарstorlek och eventuell närvaro av systolisk/diastolisk dysfunktion (Ljungvall *et al.*, 2011a).

Behandling

Enligt aktuell publicerad data verkar det i dagsläget inte finnas någon tillgänglig behandling som senarelägger symptomdebuten vid förvärvad hjärtsvikt (Häggström *et al.*, 2009). Därför rekommenderas att endast hundar med tecken på hjärtsvikt behandlas (Atkins *et al.*, 2009). Den ideala behandlingen för svårt drabbade hundar vore sannolikt att kirurgiskt rekonstruera eller byta ut angripna klaffar. Tekniska, ekonomiska och etiska aspekter gör dock att dessa operationer är ovanliga på hund. Målet med den medicinska behandlingen av drabbade hundar blir därför att öka livskvalitén, minska de kliniska sjukdomstecknen samt förbättra överlevnadstiden (Häggström *et al.*, 2004). Resultat från flera kliniska studier tillsammans med klinisk erfarenhet föreslår en medicinsk behandling innehållande furosemid, pimobendan, ACE-hämmare och spironolakton (Borgarelli & Häggström, 2010).

Matrix metalloproteinaser och deras inhibitorer vid myxomatös klaffdegeneration

Aupperle *et al.* (2009a) utförde en studie där MMP-/TIMP-nivåer i mitralisklaffsvävnad, från friska hundar samt från hundar med olika grad av myxomatös klaffdegeneration, undersöktes med immunohistokemi. Hos de friska kontrollhundarna återfanns MMP-2 och -14 samt TIMP-2 normalt uttryckta i isolerade stromala celler. TIMP-3 fanns måttligt uttryckt intracellulärt och lindrigt extracellulärt. MMP-9 återfanns inte i klaffarnas stromala celler, dock i stora mängder i myocyterna. Med progredierande sjukdom sjönk uttrycket av MMP-2 samtidigt som antalet stromala celler uttryckandes MMP-14 ökade, speciellt i kanterna av de nodulära förändringarna. Uttrycket av TIMP-2 och -3 ökade både intra- och extracellulärt. MMP-9 kunde inte detekteras varken i frisk eller sjuk klaffvävnad.

Samma forskargrupp utförde samma år ytterligare en studie (Aupperle *et al.*, 2009b) som undersökte MMP-/TIMP-nivåer med hjälp av PCR. Även i denna studie ingick friska hundar samt hundar med olika grad av myxomatös klaffdegeneration. PCR utfördes på klaffvävnad från mitralis för att analysera förekomst av mRNA kodande för MMP-1, -2, -9, -14 och TIMP-2, -3 och -4. I klaffvävnad från hundar med sjukdomen sågs en signifikant ökning av mRNA kodande för MMP-1 och -14 samt TIMP-2, -3 och -4. Ingen stegring i MMP-2- eller MMP-9-mRNA kunde detekteras.

I en tredje studie (Ljungvall *et al.*, 2011b) mättes aktiviteten av proMMP-2, proMMP-9, MMP-2 och MMP-9 i serum från hundar med myxomatös klaffdegeneration av olika grad samt från friska kontroller. Inga signifikanta skillnader i MMP-aktivitet kunde detekteras mellan de olika graderna av sjukdomen. Aktivitet av proMMP-2 och proMMP-9 kunde detekteras i samtliga prover, aktivt MMP-9 återfanns hos 85 % av hundarna. Aktiviteten hos proMMP-9 minskade med minskande systoliskt blodtryck och var signifikant högre hos hanar jämfört med tikar. MMP-9-aktiviteten sjönk vid stigande LVID_{sinc} (ökning av kammarens inre dimension i slutsystole) samt vid minskande systoliskt blodtryck och troponinkoncentration. Inga signifikanta associationer kunde ses mellan proMMP-2-aktivitet och de undersökta variablerna. MMP-2 kunde inte detekteras hos de undersökta hundarna.

MATERIAL OCH METODER

Detta är en prospektiv studie som har blivit godkänd i etisk prövning. Djurägarnas samtycke erhöles skriftligt innan hundar inkluderades i studien.

Inklusionskriterier

Hundarna som ingick i studien var privatägda och vägde alla under 15 kg. Hundarna var antingen kliniska friska eller uppvisade tecken på myxomatös klaffdegeneration utan tecken på annan sjukdom. Hundar med medfödda hjärtfel, andra förvärvade hjärtfel eller systemiska sjukdomar exkluderades. Dräktiga tikar, hundar under behandling med glukokortikoider samt hundar med detekterbara tumörer exkluderades pga möjlig påverkan på MMP-nivåerna. Hundar som behandlades för hjärtsvikt sekundärt till myxomatös klaffdegeneration inkluderades i studien.

Datainsamling

Hundarna undersöktes vid Universitetsdjursjukhuset vid SLU i Uppsala under 2009-2010. Det skapades ett protokoll för varje hund där det ingick djurägarintervju, klinisk undersökning, blodtrycksmätning, EKG-upptagning, blodprovstagning och ultraljudsundersökning.

Ekokardiografi

Ultraljud utfördes för att diagnostisera och gradera myxomatös klaffdegeneration. Hundarna var osederade och fick ligga på höger och vänster sida på ett undersökningsbord. Ultraljudsundersökningarna utfördes och analyserades av en och samma veterinär (IL). Diagnos av sjukdomen baserades på närvaro av typiska förändringar på mitralisklaffarna (förtjockning och/eller prolaberings in i vänster förmak) med samtidig mitralisregurgitation (MR).

MR identifierades med hjälp av färg-Doppler-teknik och delades in i obefintlig/minimal (< 30%), måttlig (> 30 – 50%) och kraftig (> 50%) regurgitation. Som bas för gradering av myxomatös klaffdegeneration användes LA/Ao-kvoten och storleken på MR. LA/Ao-kvoten är ett mått på storleken hos vänster förmak, där LA är diametern på vänster förmak och Ao är diametern över aortabasen. Ju högre kvot, desto större förmak. Klassificeringen gjordes enligt

följande mall: Frisk ($LA/Ao < 1,5$, obefintlig/minimal MR), lindrig ($LA/Ao \leq 1,5$, $MR < 30\%$), måttlig ($LA/Ao < 1,8$, $MR < 50\%$) och kraftig ($LA/Ao \geq 1,8$, $MR \geq 50\%$).

Via M-mode-analys mättes vänster kammars innerdiameter i slutdiastole (LVIDd) och vänster kammars innerdiameter i slutsystole (LVIDs). Storleken på djurets vänstra kammare är relaterat till individens storlek och vikt. Den procentuella ökningen av LVIDd (LVIDd_{inc}) och LVIDs (LVIDs_{inc}) beräknades enligt följande: ((observerad diameter – förväntad normal diameter)/(förväntad diameter \times 100)). De förväntade normala diametrarna beräknades så här: LVIDd: (LVIDd = kroppsvikt(kg)^{0,294} \times 1,53) och LVIDs: (LVIDs = kroppsvikt(kg)^{0,315} \times 0,95) (Cornell *et al.*, 2004).

Via M-mode-analys mättes även vänster kammars kontraktilitet, som anges som fractional shortening (FS). FS anges i procent (%) och fås genom formeln (LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100 (Toumanidis *et al.*, 2011).

Blodtrycksmätning

Blodtrycket mättes med hjälp av en oscillometrisk blodtrycksapparat (Krutech VET 420A). Kuffen fästes runt svansroten och kuffdimensionen anpassades efter hundens storlek. När hunden aklimatiserat sig togs fem blodtrycksvärden varpå ett medelvärde räknades ut för det systoliska respektive diastoliska blodtrycket. Mätande veterinär bedömde även hundarnas stressnivå vid provtagningstillfället. Stressnivån graderades som: ingen, lindrig, måttlig eller kraftig stresspåverkan.

Hjärtfrekvens

Hjärtfrekvensen (HF) erhöles vid auskultation av hjärtat samt vid EKG-upptagning i samband med ultraljudsundersökningen.

Blodprover

Blodprov togs från samtliga hundar i anslutning till undersökningen. Blodet togs från vena jugularis och samlades i serumrör. Proverna centrifugerades, serum avskiljdes och förvarades i -80°C tills denna studies analys utfördes.

Analysmetoder

Två analyser för att mäta MMP-nivåerna i proverna genomfördes och redovisas nedan; zymografi och western blot. Ursprungligen fanns även intentionen att mäta TIMP-aktiviteten i respektive prov genom omvänd zymografi. Då denna analys inte resulterade i några värden avbröts vidare arbete med denna del av studien på ett tidigt stadium.

Zymografi

Zymografi är en teknik som används för att analysera enzymatisk aktivitet i biologiskt material, exempelvis MMP-aktivitet. Metoden ger inte exakta värden utan aktiviteten kan endast mätas ungefärligt för att sedan användas komparativt mot ett referensprov. Zymografi används för att mäta enzyms gelatinasaktivitet, vilket gör att gelen som används vid

elektroforesen innehåller gelatin. På grund av analysens utformning fungerar det således enbart att mäta MMPs med gelatinasaktivitet (bl a MMP-2 & 9). Analyserna utfördes enligt metodbeskrivning författad av Hawkes *et al.* (2010).

Metodbeskrivning

Serumproverna tinades och späddes (1:6,25) med oreducerad SDS-buffert. Referensprovet som användes (konditionerat medium från den humana cellstamen HT1080) späddes (1:1,25) med oreducerad SDS-buffert. Analysen inleddes med att denaturerade, ej reducerade, protein separerades via elektrofores (50 V per gel, 60 mA i 1,5 timme). Gelen som användes vid denna elektrofores var av polyakrylamid-typ (10 %) och innehöll gelatin (1 %). 5 µl av de spädda serumproven, referensprovet och en molekylviktsmarkör (Spectra multicolor) pipetterades ner i gelens brunnar. Efter elektroforesen överfördes gelen till en Tritonlösning (2,5 %) som renaturerade proteinerna (2 × 20 minuter på skakmaskin). Sedan inkuberades gelen över natt vid 37°C i en buffertlösning innehållande kalciumklorid (5 mM CaCl₂). Kalcium behövs för att aktivera de eventuella MMPs som finns i proverna. Väl aktiva börjar enzymerna bryta ner gelatinet i gelen.

Nästföljande dag hälldes aktiveringsbufferten av och ersattes med fixeringsbuffert. Sedan behandlades gelen i Coomassie-staining, som är blå till färgen och binder till proteinerna i gelen. Detta gjorde att gelen blev blå i de partier där gelatinet inte brutits ner. Slutprodukten blev således en gel med blå basfärg och vita band där enzymerna med gelatinasaktivitet (MMP-2 & 9) agerat. Gelerna scannades och i datorn inverterades bilderna vilket gjorde att de vita banden blev grå mot en vit bakgrund. MMP-aktiviteten mättes därefter som intensiteten hos de olika grå banden och jämfördes mot intensiteten hos en referens.

Western blot

Western blot har i denna studie använts för mätning av MMP-14-nivåer eftersom detta enzym ej har någon nämnvärd gelatinasaktivitet. Istället markeras proteinerna med primära och sekundära fluorescerande antikroppar, vilket betyder att närvaro av MMP-14 mäts som ljusintensitet. Ju högre ljusintensitet, desto högre koncentration MMP-14 i provmaterialet.

För att få korrekta värden bör resultaten relateras till det totala proteininnehållet i proverna. Görs inte detta kan exempelvis en dehydrerad individ få falskt höga värden på grund av mer koncentrerat blod. Istället för att pipettera en bestämd mängd prov per brunn (som i zymografianalysen) fastslogs en lämplig proteinmängd (5 µg) per brunn som testades fram genom en spädningsserie. Provernas proteinkoncentration mättes via spektrofotometri varpå ett individuellt volymschema upprättades för hundarna i studien.

Metodbeskrivning

Proverna tinades och späddes (1:62,5) med oreducerad SDS-buffert innehållande 1% β-mercaptoetanol. β-mercaptoetanol reducerar proverna vilket innebär att proteinernas disulfidbryggor bryts upp. En SDS-gel (10%) gjöts, genom vilken de denaturerade proteinerna i proverna separerades via elektrofores (100 V, 50 mA i 1,5 timme).

Serumproverna och referensprovet upphettades innan elektroforesen till 100 °C i 5 minuter. I varje gel kördes ett referensprov (HT1080 – en stam humana celler med känd MMP-14-aktivitet) samt en molekylviktsmarkör (Spectra multicolor) parallellt med serumproverna. Efter elektroforesen överfördes proteinerna i gelen till ett membran genom en ny elektrofores (100 mA per gel, 300 V i 1 timme). Innan elektroforesen behandlades membranet med etanol för att kunna motta proteinerna under elektroforesen. Efter proteinöverföringen lades membranet i blockeringsbuffert i 1 timme på skakmaskin. Sedan placerades membranet i en buffert innehållande de primära antikropparna, vilka binder in specifikt till MMP-14. Membranet inkuberades i denna buffert över natt på skakmaskin i kylrum.

Nästföljande dag tvättades membranet i TBS-T-lösning (3 × 10 minuter) samt TBS-lösning (1 × 10 minuter) på skakmaskin. Membranet inkuberades sedan 1 timme i en buffert med de sekundära antikropparna. De sekundära antikropparna är fluorescerande och därför ljuskänsliga, vilket gör att inkuberingen måste ske i mörker. Membranet tvättades sedan i TBS-T-lösning (3 × 10 minuter) samt TBS-lösning (1 × 10 minuter) på skakmaskin i mörker, varpå membranet scannades. Aktuella band identifierades, ljusstyrkan mättes och jämfördes mot referensprovet.

Statistisk analys

De statistiska analyserna utfördes med analysprogrammet JMP version 9.0.1. För att undersöka samband mellan de olika sjukdomsgrupperna av myxomatös klaffdegeneration och nivåerna av MMP-2, -9 & -14 användes Kruskal-Wallis test. Unilinjära regressionsanalyser genomfördes för att utvärdera samband mellan MMP-2, -9 & -14 och hundarnas signalement (ålder, kön, CKCS/ej CKCS, vikt), systoliskt blodtryck (SAP), och ultraljudsvariabler (LA/Ao, LVIDd, LVIDd_{inc}, LVIDs, LVIDs_{inc} och FS). Gruppvisa värden rapporteras som median samt interkvartil range (IQR). Statistisk signifikans sattes till $P < 0,05$.

RESULTAT

I studien inkluderades totalt 66 hundar (36 tikar och 30 hanar), med en medianålder på 7,9 år (interquartile range, IQR, 5,9-9,7 år) och en medianvikt på 9,6 kg (IQR 7,7-10,5 kg). 49 av hundarna var av rasen CKCS och resterande 16 hundar utgjordes av tax (6 st), blandras (3 st), jack russel (2 st) samt 1 hund vardera av följande raser: chinese crested powder puff, dvärgpudel, norfolkterrier, shetland sheepdog, tibetansk spaniel. 21 av hundarna klassades som friska, 21 hundar hade mild, 8 hundar hade måttlig och 16 av hundarna hade kraftig myxomatös klaffdegeneration. En sammanfattning av data grupperat efter grad av myxomatös klaffdegeneration ses i tabell 1.

Tabell 1. Sammanfattning av resultat, grupperat efter grad av myxomatös klaffdegeneration. Klassificeringen gjordes enligt följande mall: Frisk ($LA/Ao < 1,5$, obefintlig/minimal mitralisregurgitation (MR)), lindrig ($LA/Ao \leq 1,5$, $MR < 30\%$), måttlig ($LA/Ao < 1,8$, $MR < 50\%$) och kraftig ($LA/Ao \geq 1,8$, $MR \geq 50\%$). De numeriska värdena redovisas som medianvärde samt interquartile range (IQR) inom parentes. CKCS = Cavalier king charles spaniel; HF = hjärtfrekvens (slag per minut); SAP = systoliskt blodtryck (systolic arterial pressure); LA/Ao = mått på vänster förmak; LVIDd = vänster kammars innerdiameter i slutdiastole; LVID_{inc} = Den procentuella ökningen av LVIDd; LVIDs = vänster kammars innerdiameter i slutsystole; LVIDs_{inc} = Den procentuella ökningen av LVIDs; FS = fractional shortening, ett mått på vänster kammars kontraktilitet

| | Friska | Mild | Måttlig | Kraftig |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Antal | 21 | 21 | 8 | 16 |
| Kön (tik/hane) | 14/7 | 14/7 | 4/4 | 4/12 |
| CKCS (ja/nej) | 17/4 | 19/2 | 5/3 | 9/7 |
| Ålder (år) | 5,0 (3,0-6,4) | 7,2 (6,2-10,4) | 9,1 (7,2-10,2) | 9,3 (8,7-10,7) |
| Vikt (kg) | 8,1 (7,0-10,1) | 9,7 (8,4-10,7) | 10,0 (7,8-10,9) | 9,6 (7,7-12,0) |
| HF (slag/min) | 116 (106-127) | 106 (97-115) | 110 (104-126) | 130 (118-166) |
| SAP (mmHg) | 133 (121-138) | 139 (133-152) | 139 (127-147) | 123 (116-137) |
| 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 (cm) | 2,9 (2,7-3,4) | 3,5 (3,1-3,7) | 3,5 (3,4-4,5) | 4,4 (4,0-4,8) |
| LVIDd _{inc} (%) | 4,0 (-3,3- 13,9) | 13,6 (4,9 -24,0) | 23,6 (16,3-41,7) | 45,1 (40,5-59,3) |
| LVIDs (cm) | 2,0 (1,8-2,5) | 2,3 (2,1-2,7) | 2,3 (2,2-2,9) | 2,7 (2,5-3,2) |
| LVIDs _{inc} (%) | 6,4 (-0,2-27,8) | 21,5 (11,1-41,2) | 22,1 (16,7-41,8) | 42,8 (26,6-57,7) |
| FS (%) | 31,6 (26,8-33,8) | 28,8 (24,4-34,3) | 35,0 (32,5-37,2) | 36,6 (31,1-39,7) |

Zymografi

Zymografi av serumproverna visade gelatinasaktivitet vid samma regioner som hos de positiva kontrollerna (referensprovet). Band som överensstämde med proMMP-2, proMMP-9 och MMP-9 i referensprovet tolkades som hundformer av samma enzymer (Rajamäki *et al.*, 2002). ProMMP-2, proMMP-9 samt MMP-9 återfanns hos 97 % av hundarna (64/66). MMP-2 kunde inte detekteras i studiepopulationen.

Western blot

Vid den western blot som utfördes återfanns band med en molekylvikt på ca 48 kDa i samtliga prover. Då dessa band var synliga både vid användande av monoklonala och polyklonala antikroppar tolkades de som specifika för MMP-14. MMP-14 har i sin fulla längd en molekylvikt på ca 60-66 kDa (Evans *et al.*, 2012) och det band som återfanns tolkades som en avklyvningsprodukt, sannolikt det som återstår efter att prodomänen klyvts av. Band på 20 kDa och ca 60-66 kDa återfanns i merparten proverna vid användande av polyklonala

antikroppar. Då de inte kunde ses vid användning av monoklonala antikroppar kunde de inte fastslås som MMP-14-specifika.

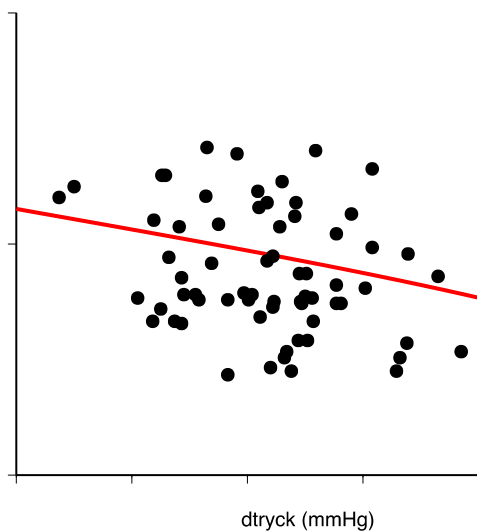
Statistiska analyser

Gruppvisa jämförelser

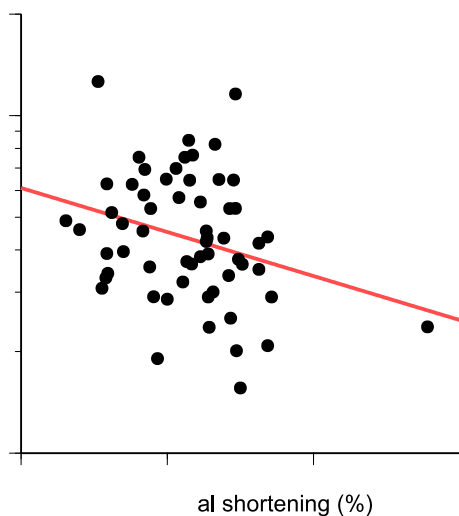
Inga signifikanta skillnader kunde detekteras mellan de fyra graderna av myxomatös klaffdegeneration för någon av de analyserade MMPs.

Unilinjära regressionsanalyser

Analyserna visade att MMP-14-aktivitet ökar med sjunkande blodtryck ($P = 0,031$) och att totalt MMP-9 (proMMP-9 + MMP-9) sjunker med ökande FS ($P=0,027$) (Fractional shortening, ett mått på vänster kammars kontraktilitet).



Figur 2. Serumkoncentrationen av MMP-14 i förhållande till systoliskt blodtryck.



Figur 3. Serumkoncentrationerna av totalt MMP-9 relaterat till fractional shortening (FS).

DISKUSSION

Såvitt författaren känner till är detta den första publicerade studie där förekomst av MMP-14 analyserats i serum från hundar med olika stadier av myxomatös klaffdegeneration. Serumaktivitet av MMP-2 & -9 hos hundar med myxomatös klaffdegeneration har tidigare undersökts (Ljungvall *et al.*, 2011b), på en annan grupp hundar. I vår studie detekterades närvaro av proMMP-9, MMP-9, proMMP2 samt MMP-14 hos den undersökta hundpopulationen, dock ej MMP-2. Aktiviteten hos MMP-14 ökade med minskande blodtryck och totalt MMP-9 sjönk med ökande FS. Utifrån vår studie förefaller MMP-2 spela en mindre roll hos hundar med myxomatös klaffdegeneration.

I denna studie ökade MMP-14-aktiviteten i proverna med minskande blodtryck. Ljungvall *et al.* (2011a) visade att blodtrycket sjunker sent i sjukdomsförloppet vilket skulle betyda att MMP-14-nivån ökar vid långt framskriden sjukdom. Vid myxomatös mitralisklaffdegeneration utvecklas, som tidigare beskrivet, mitralisregurgitation som blir värre med progredierande sjukdom. Kroppen kompenserar detta genom kardiovaskulära mekanismer. I sena stadier av sjukdomen kan hundar uppvisa regurgitationsflöden på över 75% av den totala slagvolymen (Kittleson & Brown, 2003), vilket kan överstiga kroppens kompensationskapacitet. Om detta inträffar minskar minutvolymen vilket resulterar i sänkt blodtryck. Att MMP-14 ökar med minskande blodtryck borde därför kunna tolkas som att MMP-14 ökar vid nedsatt systolisk funktion.

I studien sågs en minskande aktivitet av totalt MMP-9 med ökande FS % ($P=0,027$), FS är ett indirekt mått på vänster kammars kontraktionsförmåga. Vid förvärrad myxomatös mitralisklaffdegeneration ökar klaffläckaget och regurgitationen över mitralis. Trycket är mycket lägre i vänster förmak än i aorta. Detta gör det lättare för vänster kammare att kontrahera när blodet åker tillbaka in i förmaket istället för enbart ut i aorta. Med progredierande sjukdom ses därför en ökande sammandragning (FS %) av vänster kammare, kallat hyperkinesi. Hyperkinesi indikerar normalt god kontraktionskraft men kan hos hundar med måttlig till kraftig mitralisregurgitation maskera nedsatt systolisk funktion. Minskande aktivitet av totalt MMP-9 med ökande FS talar för att aktiviteten hos MMP-9 sjunker med progredierande sjukdom. Fynden stämmer väl överens med tidigare resultat (Ljungvall *et al.*, 2011b) där aktiviteten av proMMP-9 minskade med sjunkande systoliskt blodtryck och där aktiviteten av MMP-9 minskade med sjunkande systoliskt blodtryck samt ökande LVIDS_{inc}. LVIDS_{inc} är den procentuella ökningen av vänster kammars innerdiameter i slutsystole och har visats öka hos hundar med kraftigt utvecklad myxomatös klaffdegeneration (Borgarelli *et al.*, 2007). Mätning av vänster kammars slutsystoliska dimensioner har föreslagits återspegla nedsatt systolisk funktion (Borgarelli *et al.*, 2007; O’Gara *et al.*, 2008) då LVIDS_{inc} ökar med sjunkande systolisk funktion. Sammantaget skulle detta kunna betyda att MMP-9 är negativt associerat med nedsatt systolisk funktion.

MMP-9 är, som tidigare beskrivet, extra involverat i nedbrytningen av proteoglykaner (Aupperle *et al.*, 2009a) vilket är intressant eftersom aktiviteten hos MMP-9 sjunker med progredierande sjukdom. Detta öppnar upp en intressant frågeställning huruvida

nedregleringen av MMP-9 kan bidra till den proteoglykanansamling som ses vid myxomatös klaffdegeneration (Aupperle *et al.*, 2009a).

Vid mätning av MMP-aktivitet är det av stort värde att samtidigt undersöka TIMP-aktiviteten i samma provmaterial eftersom de har en direkt inverkan på MMP-aktiviteten. Intentionen var från början att mäta TIMP-nivåerna i samtliga serumprover för att kunna jämföra mellan prover och mot MMP-nivåerna. Dessa värden hade varit väldigt intressanta för studien, men fick exkluderas då dessa analyser inte gav mätbara resultat. Möjliga förklaringar till detta kan vara att analysen inte fungerade på hundblod eller att det helt enkelt inte fanns mätbara nivåer av TIMP i cirkulationen hos de undersökta hundarna. Den definitiva orsaken förblir oklar.

De analyser som i dagsläget finns tillgänglig för mätning av aktivitet hos MMP-2, -9 och -14 i hundserum är zymografi och western blot. Analyserna mäter aktivitet och inte mängd av ett specifikt protein vilket gör att exakta värden inte erhålls, utan resultaten måste uppskattas för att sedan användas komparativt mot aktiviteten i andra prover. Analyserna är tidskrävande och måste utföras av utbildad laboratoriepersonal vilket gör dem något svårtillgängliga. Önskvärt vore att PCR eller ELISA fanns tillgängligt för analys av olika MMPs, som finns på humansidan, vilket skulle underlätta hanteringen och analyseringen avsevärt.

STUDIENS SVAGHETER

De primära antikropparna som användes under western-blot-analysen var antikroppar framtagna för humant MMP-14. Detta kan göra att antikropparna binder in sämre till hundenzymerna vilket kan ge falskt låga värden, men eftersom aktivitetsnivåerna i proverna jämförs mot varandra spelar denna eventuellt nedsatta bindningsgrad inte in på resultatet. De band som i proverna identifierades som MMP-14-specifika var storleksmässigt lite mindre jämfört med de humana proteinerna i referensprovet, vilket sannolikt beror på artspecifika posttranslationella förändringar.

Resultaten grundar sig på relativa värden då dessa värden erhållits genom jämförelse mot prov med okänd mängd protein. För att kunna jämföra resultaten med andra studier är det önskvärt att använda absoluta mätvärden. Absoluta mätvärden kan fås genom att jämföra proverna mot kända koncentrationer (en standard), vilket används inom t.ex. ELISA.

SLUTSATS

Aktiviteten hos MMP-14 ökar med sjunkande blodtryck och aktiviteten hos totalt MMP-9 sjunker med ökande FS. Detta kan tolkas som att MMP-14-aktiviteten ökar och MMP-9-aktiviteten sjunker vid nedsatt systolisk funktion. Att de båda enzymerna varierar under sjukdomsutvecklingen kan betyda att de är involverade i olika stadier av sjukdomsutvecklingen. Utifrån vår studie förefaller MMP-2 spela en mindre roll hos hundar med myxomatös mitralisklaffdegeneration.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Ahmed, M.I., McGiffin, D.C., O'Rourke, R.A. & Dell'Italia, L.J. (2009) Mitral Regurgitation. *Current problems in cardiology* 34(3), 93-136. Review.
- Anné, W., Willems, R., Roskams, T., Sergeant, P., Herijgers, P., Holemans, P., Ector, H. & Heidbüchel, H. (2005) Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation. *Cardiovascular Research* 67, 655-666.
- Atkins, C., Bonagura, J., Ettinger, S., Fox, P., Gordon, S., Häggström, 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.
- 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(1), 59-71.
- Aupperle, H., Thielebein, J., Kiefer, B., März, I., Dinges, G. & Schoon, H.A. (2009a) An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *The Veterinary Journal* 180, 88-94.
- Aupperle, H., Thielebein, J., Kiefer, B., März, I., Dinges, G., Schoon, H.A. & Schubert, A. (2009b) Expression of Genes Encoding Matrix Metalloproteinases (MMPs) and their Tissue Inhibitors (TIMPs) in Normal and Diseased Canine Mitral Valves *Journal of Comparative Pathology* 140(4), 271-277.
- Black, A., French, A.T., Dukes-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* 66(8), 1408-1414.
- Borgarelli, M., Crosara, S., Lamb, K., Savarino, P., La Rosa, G., Tarducci, A. & Häggström, J. (2012) Survival Characteristics and Prognostic Variables of Dogs with Preclinical Chronic Degenerative Mitral Valve Disease Attributable to Myxomatous Degeneration. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26(1), 69-75.
- 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.
- Borgarelli, M., Tarducci, A., Zanatta, R., & Häggström, J. (2007) Decreased Systolic Function and Inadequate Hypertrophy in Large and Small Breed Dogs with Chronic Mitral Valve Insufficiency. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21(1), 61-67.
- 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.
- 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.
- Evans, B.R., Mosig, R.A., Lobl, M., Martignetti, C.R., Camacho, C., Grum-Tokars, V., Glucksman, M.J. & Martignetti, J.A. (2012) Mutation of Membrane Type-1 Metalloproteinase, MT1-MMP,

- Causes the Multicentric Osteolysis and Arthritis Disease Winchester Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 91(3), 572-576.
- Falk, T., Jönsson, L., Olsen, L.H. & Pedersen H.D. (2006) Arteriosclerotic changes in the myocardium, lung, and kidney in dogs with chronic heart failure and myxomatous mitral valve disease. *Cardiovascular Pathology* 15(4), 185-193.
- 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. *The Journal of Clinical Investigation* 56(1), 56-64.
- Hawkes, S.P., Li, H. & Taniguchi, G.T. (2010) Zymography and Reverse Zymography for Detecting MMPs and TIMPs. *Methods in Molecular Biology* 622, 257-269.
- 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., Höglund, K. & Borgarelli, M. (2009) An update on treatment and prognostic indicators in canine myxomatous mitral valve disease. *Journal of Small Animal Practice* 50(1), 25-33.
- Häggström, J., Kwart, C. & Hansson, K. (1995) Heart sounds and murmurs – changes related to severity of chronic valvular disease in the Cavalier King Charles Spaniel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 9(2), 75-85.
- Häggström, J., Pedersen, H.D. & Kwart, C. (2004) New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34(5), 1209-1226.
- Katz, A.M. (2001) Muscle contraction. I: Katz A. M. Ed, *Physiology of the heart* 3rd ed, s 135-137.
- Kittleson, M. & Brown, W. (2003) Regurgitant fraction measured by using the proximal isovelocity surface area method in dogs with chronic myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17(1), 84-88.
- 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., Ahlström, C., Höglund, K., Hult, P., Kwart, 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), 604-613.
- Ljungvall, I., Höglund, K., Carnabuci, C., Tidholm, A. & Häggström, J. (2011a) Assessment of global and regional left ventricular volumes and geometry using real-time three-dimensional echocardiography in dogs with myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25(3), 762-762.
- Ljungvall, I., Rajamäki, M.M., Crosara, S., Olsen, L.H., Kwart, C., Borgarelli, M., Höglund, K. & Häggström, J. (2011b) Evaluation of plasma activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in dogs with myxomatous mitral valve disease. *American Journal of Veterinary Research* 72(8), 1022-1028.

- Madsen, M.B., Olsen, L.H., Häggström, J., Höglund, K., Ljungvall, I., Falk, T., Wess, G., Stephenson, H., Dukes-McEwan, J., Chetboul, V., Gouni, V., Proschowsky, H.F., Cirera, S., Karlskov-Mortensen, P. & Fredholm, M. (2011) Identification of 2 loci associated with development of myxomatous mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *Journal of Heredity* 102(S1), S62-S67.
- O’Gara, P., Sugeng, L., Lang, R., Sarano, M., Hung, J., Raman, S., Fischer, G., Carabello, B., Adams, D. & Vannan, M. (2008) The Role of Imaging in Chronic Degenerative Mitral Regurgitation. *JACC: Cardiovascular Imaging* 1(2), 221-237.
- 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*. 7 ed, 1299-1319. St Louis: Elsevier Saunders.
- Olsen, L.H., Fredholm, M., Pedersen, H.D. (1999) Epidemiology and Inheritance of Mitral Valve Prolapse in Dachshunds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14(5), 448-456.
- Pelouch, V., Dixon, I.M., Golfman, L., Beamish, R.E. & Dhalla, N.S. (1993) Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Molecular and Cellular Biochemistry* 129(2), 101-120. Review.
- Polyakova V., Hein, S., Kostin, S., Ziegelhoeffer, T. & Schaper, J. (2004) Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Pressure-Overloaded Human Myocardium During Heart Failure Progression. *Journal of the American College of Cardiology* 44(8).
- Rajamäki, M.M., Järvinen, A.K., Sorsa, T. & Maisi, P. (2002) Clinical findings, bronchoalveolar lavage fluid cytology and matrix metalloproteinase-2 and-9 in canine pulmonary eosinophilia. *Veterinary Journal* 163(2), 168-181.
- Richards, J.M., Farrar, E.J., Kornreich, B.G., Moise, N.S. & Butcher, J.T (2012) The mechanobiology of mitral valve function, degeneration, and repair. *Journal of Veterinary Cardiology* 14, 47-58.
- Spinale, F.G. (2002) Matrix metalloproteinases: Regulation and Dysregulation in the Failing Heart. *Circulation Research* 90(5), 520-530. Review.
- Swenson, L., Häggström, J., Kvarn, 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* 208(12), 2009-12.
- Toumanidis, S.T., Karapanos, N.T., Kottis, K., Kaladaridou, A., Bramos, D., Trika, 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.
- Visse, R. & Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92(8), 827-839. Review.