



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för Kliniska vetenskaper

Plasmakoncentration av hjärtspecifikt troponin hos hundar med icke-purulent osteoartrit

Antonia Langenskiöld

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:13*

Plasmakoncentration av hjärtspecifikt troponin hos hundar med icke-purulent osteoartrit

Plasma concentration of cardiac-specific troponin in dogs with non-purulent osteoarthritis

Antonia Langenskiöld

Handledare: *Ingrid Bersås Ljungvall, institutionen för Kliniska vetenskaper*

Biträdande handledare: *Anna Hillström, institutionen för Kliniska vetenskaper*

Examinator: *Jens Häggström, institutionen för Kliniska vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:13

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: *hjärtspecifikt, troponin, cTnI, myocytskada, TNF- α , osteoartrit*

Key words: *cardiac, troponin, myocyte injury, cTnI, TNF- α , osteoarthritis*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Hjärtspecifikt troponin I (cTnI) är ett protein som ingår i troponinkomplexet. Det är involverat i myocyten kontraktion. cTnI är normalt bundet inuti myocyten men vid myocytskada läcker proteinet ut i blodcirkulationen och ökade koncentrationer kan då mätas i ett blodprov. En ökning av cTnI i blodet kan ske både vid primär hjärtmuskelskada och vid extrakardiella sjukdomsprocesser som sekundärt påverkar hjärtmuskulatur.

Ledsjukdom är vanligt hos hund och många olika ledsjukdomar kan orsaka en sekundär osteoartrit (OA). Tidigare studier har visat på förekomst av ökade koncentrationer av cytokiner, såsom TNF- α , i blodet vid OA. Andra studier har visat att TNF- α kan orsaka en sekundär hjärtpåverkan. Om en myocytskada föreligger sekundärt till ledsjukdom hos hund kan det bli aktuellt att införa generella försiktighetsåtgärder eller förändrade rutiner vid sjukgymnastik. Med anledning av denna bakgrund var det intressant att undersöka det potentiella sambandet mellan OA och hjärtpåverkan vidare. Syftet med den aktuella studien var att undersöka om hundar med icke-purulent ledsjukdom och sekundär OA får sekundär myocytskada och därmed en ökning av cTnI i blodet. Detta undersöktes genom att mäta cTnI från blodprov hos 31 hundar med icke-purulent ledsjukdom och jämföra resultaten med 17 friska kontrollhundar. Alla hundar rekryterades vid Universitetsdjursjukhuset (UDS) i Uppsala. Ledsjukdom diagnosticerades hos hundarna genom klinisk undersökning, bilddiagnostik, synoviaprov och i de flesta fall artroskopi/artrotomi. Vi kontrollerade även för eventuella samband mellan troponinkoncentration och ålder, kön, vikt, C-reaktivt protein (CRP) och lagringstid av blodproverna.

Troponinkoncentration analyserades i plasmaprov och analysen utfördes med en högsensitiv metod, Beckman Coulter Access 2. Det är en metod utvecklad för humant bruk men metoden är även validerad för hund.

Resultaten av studien visade att det inte förelåg någon skillnad i cTnI koncentrationer i plasma mellan hundar med OA och friska kontrollhundar. Utifrån detta resultat föreligger inte en sekundär hjärtmuskelpåverkan vid icke-purulent osteoartrit. Studien visade att både ålder och vikt hade ett positivt samband med cTnI koncentrationer i blodet, dock var uppmätta koncentrationer mycket låga hos samtliga hundar i studien.

SUMMARY

Cardiac troponin I (cTnI) is a subunit of the troponin complex. The troponin complex is involved in contraction of the myocyte. Normally cTnI is bound inside the myocyte but when a myocyte injury occurs, cTnI leaks from the myocyte into the circulation. An increase in cTnI concentration can be measured using a blood test. Increased circulating cTnI concentration can occur both as a result of a primary cardiac disease and in the event of an extracardiac pathological process that causes a secondary myocyte injury.

Joint disease is a common problem in our domestic dogs and several joint diseases can cause a secondary osteoarthritis (OA). Previous studies have shown presence of increased concentrations of cytokines such as TNF- α in the circulation in patients with OA. Other studies have shown that TNF- α can cause a secondary myocyte injury. If a myocyte injury is present secondary to joint disease in dogs this may be of interest to consider when starting a rehabilitation program. Based on this information, we found it interesting to further investigate a potential association between non-purulent OA and myocyte injury. The aim of this study was to investigate if dogs with joint disease and secondary OA might be affected by a secondary myocyte injury; and thereby a rise in circulating cTnI concentration. We analysed blood from 31 dogs with different non-purulent OA as well as 17 healthy controls. All dogs were recruited from the University Animal Hospital (UDS) in Uppsala. Joint diseases were diagnosed through clinical examination, imaging diagnostics, synovial fluid and in most cases arthroscopy/arthrotomy. A potential influence of age, weight, sex, C-reactive protein (CRP) and storage time of the blood samples on cTnI concentration was controlled for.

The cTnI concentrations in plasma was analysed using a high sensitive method; Beckman Coulter Access 2, which is a method developed for human purpose that has been validated for canine use.

No difference in plasma cTnI concentration could be found between dogs with OA and healthy control dogs. Hence, according to this study, no secondary myocyte injury is present in dogs with non-purulent OA. Associations between plasma cTnI concentration and age and weight were found, but the cTnI concentrations were very low in all included dogs.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Myocytens uppbyggnad och funktion.....	2
Troponin.....	2
Allmänt.....	2
Mätning av troponin i blodcirkulationen.....	3
Primär hjärtsjukdom som orsak till troponinstegring.....	4
Sekundär hjärtpåverkan som orsak till troponinstegring.....	4
Inflammation.....	5
Inflammation kopplad till myocytskada.....	6
Ledsjukdom.....	6
Material och metoder.....	8
Resultat.....	10
Diskussion.....	13
Tack.....	15
Referenser.....	16

Förkortningar

CRP	C-reaktivt protein
cTnI	Hjärtspecifikt troponin I
DCM	Dilaterad kardiomyopati
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCP	Fragmenterad processus coronoideus
GDV	Magsäcksomvridning
MMVD	Myxomatös mitralisklaffsdegeneration
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OA	Osteoartrit
OCD	Osteokondros

INLEDNING

Hjärtspecifikt troponin I (cTnI) är ett protein som ingår i troponinkomplexet. Detta komplex, som består av tre enheter; troponin C, troponin T samt troponin I, är en del av sarkomeren vilken spelar en viktig roll vid kontraktion av myocyten. Den största delen av cTnI är bunden inuti myocyten och endast en liten del finns fritt i cytosolen (Li *et al.*, 2005). cTnI kan användas som biomarkör för att mäta myocytskada. Vid en skada av myocyten läcker cTnI ut i cirkulationen vilket kan upptäckas via en blodprovsundersökning (Wells & Sleeper, 2008).

Inom veterinärmedicinen analyseras cTnI ofta vid extrakardiella sjukdomsprocesser i kroppen som sekundärt kan påverka hjärtat; såsom pyometra, magsäcksomvridning och vid huggormsbett, men cTnI kan även användas vid primära patologiska processer i hjärtat som till exempel myxomatös klaffdegeneration (MMVD) och dilaterad kardiomyopati (DCM) (Ljungvall *et al.*, 2010; Pelander *et al.*, 2008; Pelander *et al.*, 2010; Schober *et al.*, 2002; Spratt *et al.*, 2005).

Oss veterligen finns det ingen publicerad studie som undersökt om olika typer av ledsjukdom hos hund kan ge en ökning av cirkulerande cTnI vilket skulle indikera en myocytskada vid dessa tillstånd. Ledsjukdom, av både medfödd och förvärvad etiologi, är ett vanligt problem hos hund och många leder till en sekundär osteoartrit (OA). Många av dessa hundar genomgår någon gång ett träningsprogram anpassat för den aktuella ledsjukdomen. Det är okänt huruvida dessa tillstånd kan påverka hjärtmuskelvävnaden sekundärt. Studier visar att vid OA kan ökade nivåer av cytokinen TNF- α uppmätas i både synovia och serum (Daghestani & Kraus, 2015; Goldring & Otero, 2011). TNF- α har rapporterats ha en negativ effekt på myocytens kontraktionsförmåga och tillsammans med andra cytokiner inducera apoptos av myocyten (Ing *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1996). Med denna bakgrundsinformation skulle det kunna finnas en tänkbar förklaring till eventuell myocytskada vid ledsjukdom. Vi anser att det vore intressant att veta om hundar med ledsjukdom har ökade nivåer av cTnI i blodet. Om så är fallet kan det bli aktuellt att ta hänsyn till i träningsprocessen.

Målsättningen med den här studien var att jämföra cTnI koncentration hos hundar med icke-purulent ledsjukdom med koncentrationen hos 17 friska kontrollhundar. Ett 30-tal hundar av olika ras och ålder som besökt Universitetsdjursjukhuset i Uppsala och som genom klinisk undersökning, bilddiagnostik, artroskopi/artrotomi och synoviaprov har diagnosticerats med ledsjukdom av varierande etiologi inkluderades i studien. Vi kontrollerade även för eventuella samband mellan troponinkoncentration och ålder, kön, vikt, C-reaktivt protein (CRP) och lagringstid av blodproverna.

LITTERATURÖVERSIKT

Myocytenns uppbyggnad och funktion

Hjärtmuskulaturen är uppbyggd av hjärtmuskelceller, myocyter, vilka arbetar gemensamt för att blodcirkulationen ska fungera. Hjärtmuskulaturen är liksom skelettmuskulaturen en tvärstrimmig muskulatur men till skillnad från skelettmuskulaturen är den inte viljestyrd. Myocyterna är grenade och cylindriska celler. När myocyterna kontraherar ökar trycket i hjärtats hålrum vilket gör att blodet pumpas i rätt riktning. Myocyterna kontraherar i princip simultant tack vare att aktionspotentialen kan sprida sig genom ”gap junctions” mellan myocyterna (Sjaastad *et al.*, 2003).

Myocyten utgörs framför allt av myofibriller vilka i sin tur är uppbyggda av en stor mängd sarkomerer. Sarkomeren har en viktig roll i kontraktionen av myocyten då den består av myofilament som är de enheter som gör att myofibrillen kan förkortas och därmed en kontraktion ske. Myofilamenten i sig förkortas inte: det är genom bindning dem emellan som överlappningen mellan dem ökar och en förkortning av myofibrillen således sker. En sarkomer avgränsas på båda ändar av en så kallad Z-disk och inom dess gränser finns myofilamenten aktin och myosin. För att myosin ska kunna binda till aktin krävs att koncentrationen av kalcium ökar i cytosolen. Då cellen vilar, och det ej finns tillräckligt med kalcium, täcks myosinet bindningsyta på aktinet av ett protein som heter tropomyosin. Till tropomyosinet finns ett proteinkomplex kopplat som vid ökade kalciumnivåer ändrar sin konformation, vilket gör att tropomyosin frilägger bindningsytan på aktin. Detta proteinkomplex består av tre enheter; hjärtspecifikt troponin C (cTnC), troponin T (cTnT) och troponin I (cTnI). Troponinkomplexet är således delaktigt i kontraktionen genom att det binder kalcium, vilket gör att myosin kan binda till aktin och en glidning mellan dem kan ske (Li *et al.*, 2005; Sjaastad *et al.*, 2003).

Troponin

Allmänt

Troponinkomplexet är alltså delaktigt i kontraktionen av myocyten. cTnT binder till tropomyosin, cTnC binder till kalcium och cTnI verkar hämmande så länge kalciumnivåerna är låga. Troponinkomplexet finns förutom i myocyter även i skelettmuskulaturens sarkomerer men däremot inte i glatt muskulatur. De olika isoformerna av troponinheterna skiljer sig mellan hjärt- och skelettmuskulatur. De hjärtspecifika isoformerna benämns med ett ”c” för *cardiac* (Wells & Sleeper, 2008).

cTnI är normalt bundet till aktinfilamentet via cTnT men läcker ut till blodcirkulationen vid myocytskada vilket kan orsakas av exempelvis inflammation, toxiner, trauma eller ischemi (Smith *et al.*, 2016). En ökning av cTnI i blodet ses cirka två timmar efter myocytskada (Gaze & Collinson, 2008) och koncentrationen är som högst cirka 18-24 timmar efter skada (Babuin & Jaffe, 2005). När myocyten töms på cTnI minskar dess kontraktilitetsförmåga (van der Laarse, 2002).

Mätning av troponin i blodcirkulationen

När en myocytskada sker läcker cTnI ut från cellen till blodcirkulationen vilket gör det möjligt att analysera cTnI genom ett blodprov. Serum, plasma eller helblod kan användas beroende på vilken analysmetod som brukas (Wells & Sleeper, 2008). Halveringstiden av cTnI är under 70 minuter enligt Jaffe *et al.* (1996) vilket innebär att en ökad nivå av cTnI över tid tyder på en pågående myocytskada. Majoriteten av cTnI är normalt bundet i myocyten och kan inte läcka ut förutom om det föreligger en myocytskada. Dock finns cirka två till fyra procent av cellens totala cTnI fritt i cytosolen (Wells & Sleeper, 2008). Den del av cTnI som finns i cytosolen kan läcka ut från myocyten utan tecken på myocytskada och detta kan vara orsaken till att det ibland kan uppmätas låga nivåer av cTnI hos friska hundar (Adin *et al.*, 2005).

Både cTnI och cTnT är hjärtspecifika biomarkörer men cTnI är den mest sensitiva för att diagnosticera myocytskada (Burgener *et al.*, 2006; Langhorn, R., 2013). cTnI har rapporterats öka vid mindre omfattande myocytskada jämfört med cTnT (Burgener *et al.*, 2006; Langhorn, R., 2013). cTnI används ej som hjärtspecifik biomarkör då homologin mellan de två isoformerna i skelett- och hjärtmuskulatur är för stor (Wells & Sleeper, 2008).

För att analysera cTnI används olika typer av *immunoassays*. Studier har gjorts som visar att aminosyrasekvensen för cTnI är välbevarad mellan många däggdjursarter. Homologin för cTnI mellan människa och hund är 95 % vilket innebär att humana antikroppar fäster in även till hundens form av cTnI. Tack vare detta kan kommersiella humananalysmetoder användas för att mäta cTnI hos hund (Rishniw *et al.*, 2004). Eftersom de olika isoformerna av troponin har olika aminosyrasekvenser i skelett- och hjärtmuskulatur går det att skilja dessa åt. Det finns tre isoformer av TnI varav den ena endast finns i hjärtmuskulaturen vilket gör detta protein till en hjärtspecifik biomarkör (Wells & Sleeper, 2008).

Det är viktigt att som kliniker veta att det kan förekomma falskt positiva resultat med dagens analysmetoder. Detta medför att en population med låg sannolikhet för hjärtsjukdom eller avsaknad av kliniska sjukdomstecken inte ska analyseras för cTnI (Smith *et al.*, 2016). Det finns ingen standardiserad metod för mätning av cTnI och därmed kan tillverkare använda sig av olika antikroppar som binder till varierande delar av aminosyrasekvensen. Detta innebär att referensvärdena varierar mellan analysmetoder och även att värden från olika metoder inte ska jämföras (Wells & Sleeper, 2008).

De första metoderna för att mäta troponin i blodet utvecklades under 1980-talet och har sedan dess blivit allt mer sensitiva och kan därmed mäta lägre nivåer än tidigare (Apple *et al.*, 2012). Det är viktigt att ha vetskap om att första generationens analysmetoder och de nyare mera högsensitiva metoderna inbegriper olika kvaliteter och passar därför att användas vid olika typer av frågeställningar och situationer. I en humanstudie jämfördes högsensitiva och första generationens analysmetoder för cTnT hos en stor grupp människor med kronisk hjärtsvikt och där observerades mätbara nivåer hos 92 % av studiegruppen med den högsensitiva metoden respektive 10,4 % med första generationens analysmetod (Latini *et al.*, 2007). Det är viktigt att känna till vilken analysmetod som används för att veta hur resultatet ska tolkas. Absoluta värden bör ej jämföras emellan olika analysmetoder eftersom

referensvärden varierar (Adin *et al.*, 2006). De högsensitiva metoderna är användbara inom forskning samt för att mäta troponinkoncentration på hundar med primär kronisk hjärtsjukdom då även små avvikelser har betydelse (Ljungvall *et al.*, 2010). Ett exempel på högsensitiv metod är Beckman Coulter Access 2 som använts i denna studie. Begreppet högsensitiv har inte med troponinet i sig att göra utan baseras på karaktäristikan av analysmetoden, och vilka kriterier som ska uppfyllas (Apple *et al.*, 2012). Första generationens cTnI analysmetoder, exempelvis Immulite 2000 som används på Universitetsdjursjukhuset i Uppsala, kan ej mäta lika låga koncentrationer av cTnI men är användbara för att mäta hjärtpåverkan vid extrakardiella sjukdomar såsom pyometra och magsäcksomvridning där uppmätta koncentrationer kan var mycket höga (Pelander *et al.*, 2008; Schober *et al.*, 2002).

Primär hjärtsjukdom som orsak till troponinstegring

Hjärtspecifikt troponin I ökar hos hundar som lider av såväl primär som sekundär hjärtskada (Wells & Sleeper, 2008). Primära hjärtsjukdomar kan delas upp i kongenitala och förvärvade sjukdomar. Oyama och Sisson (2004) fann genom att använda en högsensitiv analysmetod att subvalvulär aortastenosis gav en ökning av cTnI. I en annan studie sågs däremot inte en ökning av cTnI vid kongenitala sjukdomar (Spratt *et al.*, 2005). I den sistnämnda studien användes en första generationens analysmetod som ej kan detektera lika låga nivåer som en högsensitiv metod vilket kan vara förklaringen till skillnaden i resultaten. Exempel på förvärvade hjärtsjukdomar hos hund som ger ökade nivåer av cTnI är myxomatös klaffdegeneration (MMVD), dilaterad kardiomyopati (DCM) och hemangiosarkomorsakad perikardiell effusion (Hezzell *et al.*, 2012; Ljungvall *et al.*, 2010; Oyama & Sisson, 2004; Shaw *et al.*, 2004).

Graden av ökning av cTnI vid MMVD är ett tecken på hur allvarlig sjukdomen är och kan associeras med överlevnadstid (Hezzell *et al.*, 2012; Ljungvall *et al.*, 2010). Även för DCM har cTnI rapporterats att fungera som biomarkör för grad av sjukdom samt för prognos (Oyama & Sisson, 2004). I ytterligare en studie undersöktes hundar med olika hjärtsjukdomar och även där rapporterades att cTnI ökar med ökande grad av hjärtsjukdom hos hund och därmed är cTnI en möjlig prognostisk biomarkör (Fonfara *et al.*, 2010). Samma författare menar att uppföljande prover är bra för att följa utvecklingen av sjukdomen samt att en persisterat ökad koncentration utgör ett negativt prognostiskt tecken (Fonfara *et al.*, 2010).

Sekundär hjärtpåverkan som orsak till troponinstegring

Inom humanmedicin analyseras cTnI koncentrationen i blod primärt vid misstanke om att det föreligger en primär hjärtsjukdom (såsom akut ischemisk infarkt (Thygesen *et al.*, 2012)), medan cTnI inom veterinärmedicin ofta analyseras vid misstanke om att extrakardiella sjukdomsprocesser kan ha gett upphov till hjärtmuskelskada sekundärt.

Ökade koncentrationer av cTnI indikerar myocytskada men säger ingenting om dess orsak (Wells & Sleeper, 2008). Flera studier visar att vid en ökad ålder ökar även cTnI

koncentrationen i blodet. Det starka sambandet mellan ålder och ökande koncentrationer av cTnI indikerar en förändring av hjärtmuskulaturen vid åldrande (Hezzell *et al.*, 2012; Ljungvall *et al.*, 2010; Oyama & Sisson, 2004).

De finns många sjukdomsprocesser som sekundärt leder till myocytskada och därmed en troponinstegring i blodet och några exempel på dessa är huggormsbett (Langhorn *et al.*, 2014) (Pelander *et al.*, 2010), magsäcksomvridning (GDV) (Burgener *et al.*, 2006; Schober *et al.*, 2002), pyometra (Pelander *et al.*, 2008), sepsis (Ammann *et al.*, 2001), babesios (Lobetti *et al.*, 2002) och trauma mot bröstorg (Schober *et al.*, 1999). För patienter som diagnosticerats med GDV har studier visat att analys av cTnI kan hjälpa veterinären att bedöma vilka som kräver mer intensiv vård samt att cTnI kan fungera som en prognostisk markör (Wells & Sleeper, 2008). Vid babesios samt GDV sågs cTnI öka mer desto allvarligare sjukdomen var (Lobetti *et al.*, 2002; Schober *et al.*, 2002).

Förmodligen finns det många fler sjukdomsprocesser än de studerade som leder till myokardskada och det kan antas att veterinärer påverkas av de resultat som finns publicerade och provtar just inom de patientkategorierna. Det har rapporterats att systemisk inflammation kan orsaka myocytskada och det spekuleras om vilka mekanismer som ligger bakom detta. Exempel på föreslagna mekanismer är bland annat hemodynamiska förändringar och mikrotromber (Langhorn *et al.*, 2014; Wells & Sleeper, 2008) samt cytokinpåverkan (Kumar *et al.*, 1996). Troligtvis har vi inom både veterinär- och humanmedicin mycket kvar att upptäcka inom detta område.

Inflammation

Inflammation är en välutvecklad och komplex kaskad av händelser. Detta stycke ger en kortfattad överblick över dessa händelser. Celler som får olika typer av stimuli såsom mekaniskt trauma, vävnadsnekros, tumöromvandling eller infektiösa mikrober triggas till en inflammation. Vid vävnadsskada kommer arterioler och kapillärer att dilatera genom kemiska mediatorer som prostaglandin, leukotriener och kväveoxid. Neutrofiler anses ofta vara den första leukocyten på plats vid akut inflammation och de attraheras till platsen genom kemokiner (Mc Gavin & Zachary, 2007). Cytokiner, som också är en viktig del i inflammation, är små proteiner som frisätts från olika typer av celler och de kan vara antingen proinflammatoriska eller antiinflammatoriska (Daghestani & Kraus, 2015). Den proinflammatoriska cytokinen TNF- α kan öka frisättningen av neutrofiler från benmärgen samt öka produktionen av dem. Neutrofilernas syfte är bland annat att fagocytera mikrober samt främmande material och oskadliggöra dessa. Efter fagocytosen lyserar fagosomen med en lysosom inuti neutrofilen vilket leder till att mikrober dödas och främmande material degraderas. Neutrofilen innehåller granula som vid utsöndring leder till ökad inflammatorisk respons (Mc Gavin & Zachary, 2007).

Inflammatoriska förändringar i vävnaden inkluderar ansamling av vätska, elektrolyter, plasmaproteiner samt leukocyter. Detta resulterar i de fem kardinalsymptomen; värme, svullnad, rodnad, smärta och nedsatt funktion. Inflammation är i grunden nödvändig för att vi

ska överleva och bekämpa mikrober från omgivningen likväl som främmande kroppar och trauman. Inflammation kan delas upp i akut process, som pågår i några timmar till dagar, och i en kronisk process, som sträcker sig över veckor till månader. Närvaro av inflammation kan mätas i blodet genom exempelvis CRP som är ett akutfasprotein som produceras i levern. Syntesen av CRP ökar vid stimuli av inflammatoriska mediatorer. CRP är en inflammationsmarkör som kan öka vid olika tillstånd såsom infektion, immunmedierad inflammation samt neoplasi (Cray *et al.*, 2009).

Inflammation kopplad till myocytskada

Etiologin bakom hjärtpåverkan vid kraftig inflammation är ej helt klarlagd men att cytokiner spelar en viktig roll finns det starka misstankar om (Langhorn, 2013). TNF- α , som är en polypeptid producerad av monocyter och makrofager, är en viktig mediator av negativ kardiovaskulär påverkan vid septisk chock (Parrillo, 1993). Det är vanligt att vid sepsis uppmäta ökade nivåer av cTnI samt att se nedsatt hjärtfunktion (Wells & Sleeper, 2008).

I en studie rapporterades att cytokininducerad produktion av kväveoxid var cytotoxisk för myocyten samt att det ledde till minskad kontraktilitet hos myocyten (Ing *et al.*, 1999). TNF- α , IFN- γ och IL-1 β var de cytokiner som undersöktes i studien och en kombination av dessa tre sågs ge en tidsberoende ökning av apoptos hos myocyterna. IL-1 β kunde utöver detta ensamt aktivera apoptos (Ing *et al.*, 1999). I en annan studie rapporterades att TNF- α och IL-1 β var för sig kunde orsaka koncentrationsberoende försämring av myocyten kontraktionsförmåga. De hade en synergistisk effekt, så vid närvaro av varandra kunde de vid lägre koncentrationer än om de var ensamma påverka myocyten och detta vid koncentrationer som är rimliga hos en patient med sepsis (Kumar *et al.*, 1996). I studien sågs inga direkta negativa effekter av endotoxiner på myocyten.

Ledsjukdom

Ledsjukdomar är en stor grupp sjukdomsprocesser och innefattar ett flertal olika etiologier som kan vara både akuta och kroniska. Olika uppkomstmekanismer till ledsjukdom kan vara till exempel traumatiska, neoplastiska, infektiösa, immunmedierade och utvecklingsorsakade (Mc Gavin & Zachary, 2007). Trots olika uppkomstmekanismer kan de leda till en sekundär inflammationsprocess i leden: så kallad OA (Mc Gavin & Zachary, 2007). OA karaktäriseras av degeneration av ledbrosk, hypertrofi av ledkapseln, intraartikulär inflammation inklusive synovit och förändringar i subkondralt ben (Goldring & Goldring, 2007; Loeser *et al.*, 2012). Vid OA ses en skada på ledbrosket samt inflammation av synovialmembranet till skillnad från vid synovit som endast innebär en inflammation av synovian (McGavin & Zachary, 2007). OA inbegriper en låggradig inflammation men anses inte vara en klassisk inflammation på grund av avsaknaden av neutrofiler i ledvätskan (Goldring & Goldring, 2007). Den låggradiga inflammationen har en negativ påverkan på ledbrosket, vilket kan leda till försämring av OA (Daghestani & Kraus, 2015).

Flera proinflammatoriska mediatorer är involverade vid OA. Exempel på inflammatoriska mediatorer som kan medverka i skada vid olika inflammatoriska processer i en led innefattar prostaglandiner, cytokiner, leukotriener, lysosomala enzymer, fria radikaler, kväveoxid och neuropeptider i synovian (McGavin & Zachary, 2007). Kondrocyter i ledbrösket kan både producera och svara på ett flertal cytokiner såsom TNF- α och IL-1 β (Goldring & Goldring, 2007). Produktionen av dem är som störst tidigt och sent i sjukdomsprocessen av OA (Goldring & Otero, 2011). Cytokinerna modulerar det inflammatoriska och katabola tillståndet i leden (Loeser *et al.*, 2012). Cytokiner och kemokiner är mätbara i ledvätskan vid OA (Goldring & Otero, 2011) och studier har visat att koncentrationen av exempelvis TNF- α kan associeras med allvarlighetsgrad av OA (Daghestani & Kraus, 2015). Även i serum har TNF- α uppmäts vilket har kunnat associeras med förändringar vid OA (Daghestani & Kraus, 2015). Koncentrationen av lösliga TNF- α receptorer i blodet har visats vara lägre hos patienter med OA jämfört med hos friska individer (Daghestani & Kraus, 2015).

Vid OA ses sjukdomstecken delvis orsakade av inflammation såsom smärta, svullnad och stelhet (Goldring & Goldring, 2007). En patient med ledsjukdom har ofta en anamnes med hålda eller onormalt rörelsemönster. Det finns ett flertal olika diagnostiska metoder vid utredning av dessa tillstånd. Dessa innefattar förutom klinisk undersökning och palpation av rörelseapparaten även bilddiagnostik, artroskopi, synoviaprov samt serologiska och immunologiska tester. Synoviaprov är ett diagnostiskt hjälpmedel för att skilja purulent från icke-purulent ledsjukdom (Nelson & Couto).

Vid OA är sjukgymnastik en viktig del i behandlingsschemat för att bygga upp muskulaturen (Rychel, 2010). På Universitetsdjursjukhuset i Uppsala läggs stor vikt direkt efter operation (för hundarna i denna studie artroskopi/artrotomi) på att informera djurägare så att de under de två första veckorna hemma själva kan ta ansvar för att kyla den aktuella leden, göra rörlighetsträning samt noggrant övervaka så att inte hunden gör olämpliga rörelser. Själva sjukgymnastiken startar vanligtvis cirka två veckor efter operation. För de patienter som bedöms vara hjälpta av avlastande träning väljs ofta vattentrask. Initialt sker sjukgymnastik vanligen två gånger i veckan i tre veckor för att sedan följas upp en gång i veckan i cirka fyra veckor till. Dock är träningsupplägget alltid individanpassat. Detta ungefärliga program gäller för många diagnoser postoperativt inklusive fragmenterad processus coronoideus (FCP), osteokondros (OCD) och korsbandsskada (Pettersson, K., UDS, pers. medd. 2015).

MATERIAL OCH METODER

Studien har etiskt tillstånd från Uppsala Djurförsöksetiska nämnd (C362/11). Hundarna i studien rekryterades prospektivt vid Universitetsdjursjukhuset (UDS) i Uppsala mellan januari 2012 och januari 2014. För att inkluderas i studien skulle alla hundar vara utredda för rörelsestörning och de skulle ha diagnosticerats med ledsjukdom och sekundär icke-purulent OA av varierande etiologi. De diagnosticerades av olika veterinärer på UDS genom klinisk undersökning, bilddiagnostik (röntgen och/eller datortomografi) och synoviaprov. Önskvärt var även att artroskopi/artrotomi utfördes. Synovian analyserades med avseende på antal kärnförande celler och andel neutrofiler. Hundar med ett synoviaprov innehållande >3000/ μ l kärnförande celler och >10% neutrofiler (purulent inflammation) exkluderades från studien. Blodprover för analys av cTnI och CRP togs innan några andra undersökningar gjordes. Innan hundarna inkluderades i studien skulle alla djurägare ha givit sitt medgivande till detta.

Inget specifikt inkluderingskrav användes för hundarna rörande kön, ras, vikt och ålder. Hundar som hade tecken på annan sjukdomsprocess, som skulle kunna påverka troponinresultatet, exkluderades från studien. Friska hundar rekryterades för att användas som kontrollhundar till övriga rekryterade hundar i studien. Dessa hundar besökte Universitetsdjursjukhuset i Uppsala mellan september 2014 och juni 2015 för att delta som kontroller till en annan studie som utfördes här. Hundarna fick genomgå en noggrann undersökning vid besöket som bestod av blodtrycksmätning, ultraljud av hjärta och buk, scintigrafi av njurar, urinprov samt analys av flertalet blodprovsvariabler. Resultaten för dessa undersökningar skulle inte uppvisa några tecken på närvaro av sjukdomsprocess i kroppen.

Från alla hundar inklusive kontrollhundarna togs blodprover i EDTA-rör och hos hundarna med ledsjukdom togs även blodprov i serumrör inför CRP-analysen. Om några av hundarna hade blodprov tagna från flera tillfällen togs ett beslut att enbart använda resultaten från det första provtagningstillfället. Majoriteten av proverna blev efter centrifugering direkt nedfrysade i -80 grader (cTnI har rapporterats vara stabilt då det lagras i -80 grader celcius (Beck *et al.*, 1997)) men några av prover förvarades först i -20 grader i några dagar. Proverna förvarades sedan i fryst tillstånd fram tills att de analyserades.

Troponinanalysen utfördes genom användning av en tvåsidig enzymimmunoanalysmetod (ELISA-liknande metod), Beckman Coulter Access 2. Detta är en högsensitiv metod utvecklad för humant bruk men som är validerad för hund (Oyama & Sisson, 2004). Lägsta mätbara värde för metoden var 0,01 ng/mL. Analys för samtliga prover utfördes i duplikat vid samma tillfälle och samma batchserie användes för alla prover. Ett medelvärde för de två duplikaten räknades ut. Om båda värdena var lägre än 0,01 ng/mL sattes ett värde på 0,005 ng/mL men om det ena värdet var 0,01 ng/mL och det andra <0,01 ng/mL sattes ett värde på 0,01 ng/mL. För hundarna med ledsjukdom har även CRP analyserats. En högsensitiv metod, Gentian hsCRP, användes med ett referensintervall på <3,9 mg/L. Proverna analyserades i duplikat vid samma tillfälle och med samma batchserie. Lägsta mätbara koncentration för denna metod var 0,5 mg/L och för resultat under detta sattes ett värde på 0,25 mg/L.

En databas utfördes för varje enskild hund med variablerna ras, ålder, kön, vikt, eventuell övrig sjukdom, eventuell NSAID-behandling, eventuell indikation på hjärtsjukdom enligt

förekomst av blåsljud alternativt avvikande fynd på hjärtultraljud, lagringstid för blodproverna, troponinresultat och CRP-resultat.

För den statistiska analysen användes ett kommersiellt tillgängligt program; JMP® 11.0.0. Alla värden rapporteras som median samt interkvartil range (IQR). Statistisk signifikans sattes till $P < 0,05$. Då troponinkoncentrationerna för hundarna i studien inte var normalfördelade användes icke-parametrisk analys.

För att undersöka eventuella skillnader i cTnI koncentration mellan 1) hundar med OA och friska kontrollhundar och mellan 2) hundar med olika ortopediska diagnoser (fragmenterad processus coronoideus (FCP), korsbandsskada, osteokondros (OCD) och friska kontrollhundar) användes Kruskal-Wallis test. Diagnosgrupper med < 6 hundar (OA utan fastställd etiologi) ingick inte i den sistnämnda undersökningen. Potentiella samband mellan cTnI koncentration och hundarnas signalement (ålder, kön, vikt), CRP koncentration, NSAID-behandling och lagringstid av blodprov i frysen undersöktes med Spearmans rank correlation test.

RESULTAT

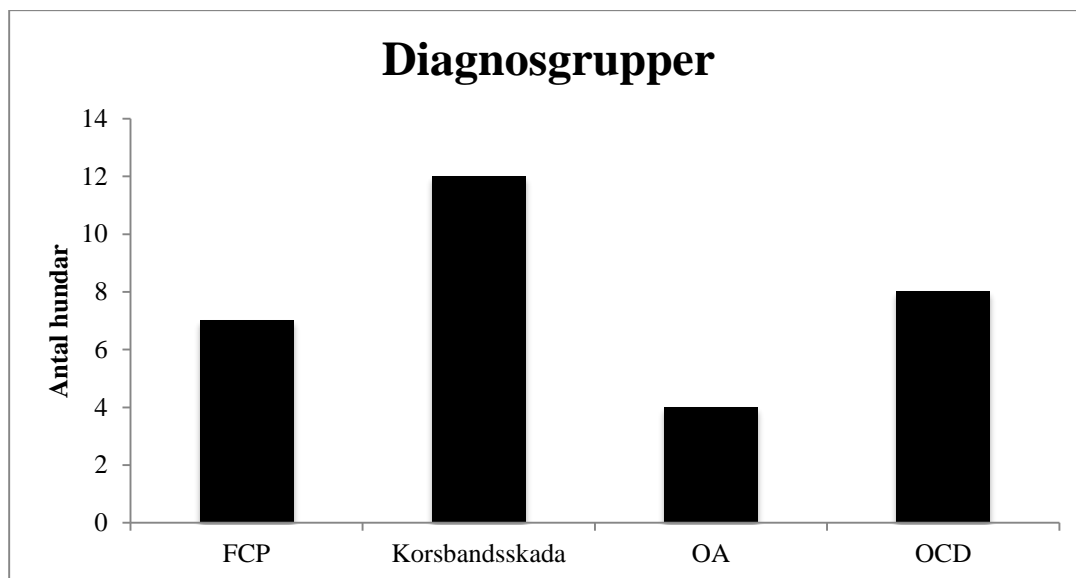
Totalt sex av de undersökta hundarna med ledsjukdom exkluderades från studien innan statistisk bearbetning av data utfördes: en hund hade degenerativ menisk utan tecken på OA (enligt både synovia- och artroskopifynd), en hund hade purulent inflammation enligt synoviaprov och två hundar uppvisade smärta från led(-er) utan att diagnos hade kunnat fastställas. Två hundar exkluderades pga annan patologisk process som ansågs kunna påverka troponinkoncentrationen i blodet: en hund hade nyligen haft ett trauma mot bröstkorgen och en hund hade nyligen diagnosticerats med en urinvägsinfektion. Alla hundar med ledsjukdom förutom fyra stycken genomgick artrotomi/artroskopi. Inom gruppen med friska kontrollhundar exkluderades två hundar på grund av OA.

Sammanlagt inkluderades 48 hundar i studien. De vanligaste raserna inom studiegruppen var blandras (n=8), labrador (n=6), golden retriever (n=4), border collie (n=3), rottweiler (n=3), schäfer (n=3), amerikansk staffordshire terrier (n=2), berner sennenhund (n=2), grand danois (n=2), korthårig collie (n=2), norfolkterrier (n=2) och storpudel (n=2). Nio andra raser var representerade i studien med en hund inom varje ras. Hundarna hade en medianålder på 3,8 (IQR 1,5-7) år och en medianvikt på 25,7 (IQR 19,5-35,5) kg. Av de 48 hundarna var 28 tikar och 20 hanar. En sammanställning av studiepopulationen ses i tabell 1.

Tabell 1. Värdena rapporteras som median och interkvartiler.

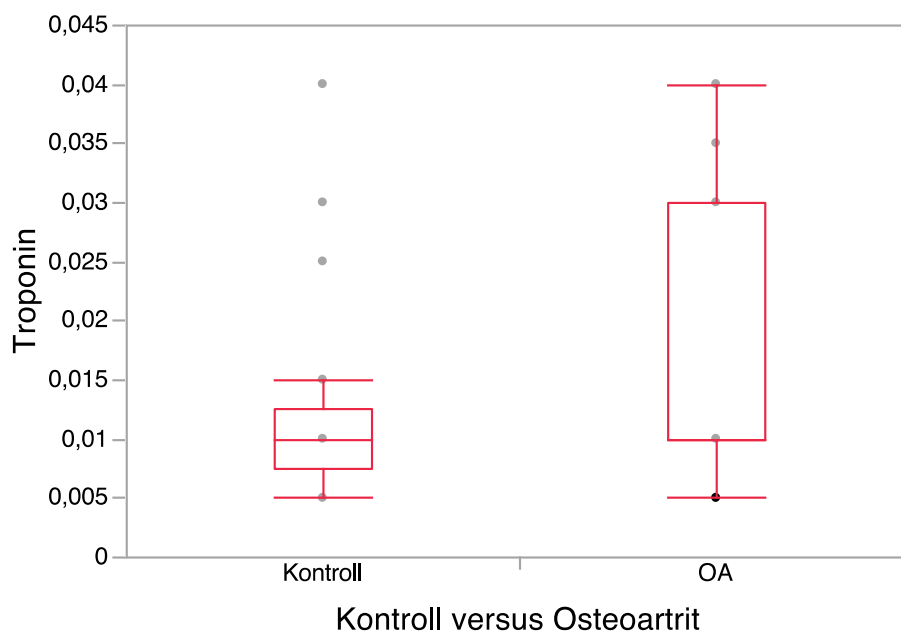
	Ledsjukdom	Kontrollhundar
Antal	31	17
Kön (tik/hane)	15/16	13/4
Ålder (år)	2,65 (0,94-6,70)	5,34 (2,88-7,81)
Vikt (kg)	32 (24,3-38,4)	19,3 (12,5-22,4)
Blåsljud/avvikande fynd vid hjärtultraljud	1	0
Antal hundar med NSAID-behandling	19/31	0
Lagringstid (år)	1,76 (1,51-2,32)	0,30 (0,09-0,36)
CRP (mg/L)	0,71 (<0,5-2,08)	<i>Ej analyserat</i>
cTnI (ng/mL)	0,01 (0,01-0,03)	0,01 (0,008-0,013)

Hundarna med OA grupperades i olika grupper baserat på etiologisk bakgrund. De fyra grupperna var fragmenterad processus coronoideus (FCP), korsbandsskada, OA utan känd bakgrund och osteokondros (OCD) (figur 1). Alla hundar med ledsjukdom placerades i en gemensam grupp eftersom att de sekundärt drabbas av OA trots olika bakomliggande etiologi för att kunna jämföra hundar med ledsjukdom mot friska kontrollhundar.



Figur 1. Antal hundar inom varje diagnosgrupp. Fragmenterad processus coronoideus (FCP), osteoartrit (OA), osteokondros (OCD).

Ingen statistisk signifikant skillnad i cTnI koncentration kunde upptäckas vid jämförande analys mellan de olika diagnosgrupperna (fragmenterad processus coronoideus (FCP), korsbandsskada, osteokondros (OCD)). Statistiskt signifikant skillnad i cTnI koncentration kunde heller inte upptäckas mellan alla hundar med OA och friska kontrollhundar ($P=0,3953$). Resultat presenteras i figur 2.



Figur 2. Box plot av cTnI koncentrationerna hos friska kontrollhundar och hundar med OA. Troponin på y-axeln mäts i ng/mL. Den övre, nedre och mittersta linjen genom boxen överensstämmer med 75e procentilen (övre kvartilen), 25e procentilen (nedre kvartilen) respektive 50e procentilen (medianen). Den översta och nedersta linjen representerar 90e respektive 10e procentilen. Hundarna med OA hade samma värde av median- och nedre kvartil (0,01 ng/mL) och därför ses endast 2 linjer i boxen.

Vi undersökte om troponinkoncentrationen som beroende variabel påverkades av de oberoende variablerna kön, ålder, vikt, NSAID-behandling, lagringstid och CRP. Resultaten för dessa analyser visade att ålder och vikt hade ett positivt samband med cTnI dvs med ökande ålder ($R^2 = 0.1$, $P = 0.0302$) respektive vikt ($R^2 = 0.09$, $P = 0.0367$) ökade även cTnI.

DISKUSSION

Resultaten från studien visade att plasmakoncentrationer av cTnI inte var högre hos hundar med icke-purulent OA i jämförelse med koncentrationer uppmätta hos friska kontrollhundar. Både ålder och vikt var associerade med cTnI koncentration i blodet.

Oss veterligen finns det ingen publicerad studie inom varken veterinär- eller humanmedicin som undersöker om ledsjukdom och sekundär OA kan ge en koncentrationsökning av cTnI i blodet. Studier har visat att en ökning av TNF- α kan ses i blodet vid OA (Daghestani & Kraus, 2015) vilket kan ge en sekundär myocytskada (Ing *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1996). Med anledning av denna bakgrund var det av värde att undersöka det potentiella sambandet mellan OA och myocytskada vidare. Enligt resultaten i vår studie skedde dock ingen sekundär hjärtmuskelskada hos hundar med OA. Till studien rekryterades endast hundar med icke-purulent OA och resultaten gäller därför enbart hundar som har den typen av ledsjukdom. Vi kan därför inte dra några slutsatser för eventuell hjärtmuskelskada vid purulent artrit, t ex septisk eller immunmedierad artrit.

Sambandet mellan cTnI koncentration och ålder i denna studie bekräftar fynd vid tidigare studier att ålder påverkar koncentrationen av cTnI hos hund (Hezzell *et al.*, 2012; Ljungvall *et al.*, 2010; Oyama & Sisson, 2004). Trots en ökning av cTnI i den aktuella studien var koncentrationerna fortfarande mycket låga, och sannolikt hade inga sådana samband hittats om första generationens analysmetoder hade använts för cTnI analys. Det är dock viktigt att ta hänsyn till sambandet mellan cTnI och ålder vid studier som rör cTnI koncentrationer hos hund om högsensitiva analysmetoder används. Orsaken till att cTnI ökar med stigande ålder är ej klarlagd men det kan tolkas som att en förändring av myocyten sker vid åldrande. Det har visats att det hos normala åldrande hundar sker en intramural arteriosklerosbildning vilket kan leda till försämrad syresättning och därmed myocytskada (Detweiler & Patterson, 1965; Whitney, 1976). Studier hos både hund och människa har visat att koncentrationen av cTnI föreligger vara ökad vid myokardiell fibros (Falk *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2010). Vid åldrande sker en fibrotisering av hjärtat hos djurslag som råttor och människa (Lakhan & Harle, 2008; Thomas *et al.*, 2000; Villari *et al.*, 1997) och ett samband mellan ålder och fibros har även rapporterats hos hund (Falk *et al.*, 2013). Det ska dock förtydligas att trots det positiva sambandet mellan ålder och koncentration av cTnI i studien så var sambandet svagt ($R^2 = 0,1$). Sambandet mellan ålder och troponinkoncentration ses i den aktuella studien även då de inkluderade hundarna var relativt unga jämfört med åldersspannet i andra studier (Hezzell *et al.*, 2012; Ljungvall *et al.*, 2010; Oyama & Sisson, 2004).

En ny upptäckt i denna studie var ett samband mellan kroppsvikt och cTnI koncentration i blodet. Med ökande vikt ökade även cTnI koncentrationen. Även detta var dock ett svagt samband likt förhållandet mellan ålder och cTnI ($R^2 = 0,09$). Eftersom *body condition score* ej undersöktes för alla inkluderade hundar vet vi ej om en del av dem var överviktiga och om detta i så fall kan ha påverkat cTnI koncentrationerna. Det har rapporterats att fetma kan ge ökade koncentrationer av TNF- α i blodet hos hund (Gayet *et al.*, 2004) och som tidigare beskrivet i texten kan denna cytokin ge upphov till myocytskada (Ing *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1996). Detta kan vara en tänkbar patofysiologi till att övervikt skulle kunna ge ökade cTnI koncentrationer. Oss veterligen finns ingen tidigare rapport om att cTnI ökar vid ökad vikt

inom varken veterinär- eller humanmedicin. En teori kan vara att hos en tyngre individ så har hjärtat en större volym än hos en lättare individ. Trots avsaknad av myocytskada utsöndras en låg nivå av cTnI till blodet (Adin *et al.*, 2005). Det är tänkbart att det utsöndras mer cTnI ju större hjärta individen har även hos friska individer vilket skulle ge en ökad koncentration av cTnI. Dock har större individer även en större blodvolym vilket borde späda ut cTnI och detta gör rimligen hypotesen mindre trovärdig. De flesta blodprovsvariabler påverkas inte av vikt så att det har klinisk relevans. Det finns dock rapporterat små skillnader i koncentration av vissa variabler såsom albumin, total protein och alkaliskt fosfat (ALP) (Misbach *et al.*, 2014). Dessa skillnader är dock så små att ingen särskild hänsyn behöver tas i kliniken. Även kreatinin i plasma har rapporterats ha ett positivt samband med vikt (Craig *et al.*, 2006; Misbach *et al.*, 2014). En annan teori varför mindre hundar skulle ha lägre koncentration av cTnI i blodet är att de metaboliserar och utsöndrar proteinet snabbare och mer effektivt än vad större hundar gör. Det ska förtydligas att det huvudsakliga syftet med studien var att undersöka samband mellan OA och cTnI. Studien var därför inte primärt upplagd för att undersöka samband mellan cTnI och ålder respektive vikt. För vikt gäller såsom för ålder att trots en ökning av cTnI i den aktuella studien var koncentrationerna fortfarande mycket låga (och inom vad som bör räknas som normalvariation), och sannolikt hade inga sådana samband hittats om första generationens analysmetoder hade använts för cTnI analys.

Det fanns några begränsningar i vår studie. Det var olika veterinärer som undersökte och diagnosticerade hundarna så genomförandet var inte helt standardiserat. Fyra av de 31 hundarna med ledsjukdom undersöktes inte med artroskopi/artrotomi. För hundarna med ledsjukdom finns information om hjärtauskultation men inget hjärtultraljud utfördes. Dock har denna begränsning inte någon större betydelse då båda grupperna hade låga koncentrationer av cTnI i blodet och det förelåg inte någon skillnad grupperna emellan.

Vi har fått information för alla hundar om de har medicinerats med NSAID eller inte men tyvärr vet vi varken i vilken dos eller hur länge medicineringen har skett. Dock visade den statistiska undersökningen ingen skillnad i cTnI koncentration mellan NSAID-behandlade och icke-behandlade hundar. Ytterligare en begränsning med studien var att inte alla prover direkt blev nedfrysta till -80° utan att en del först förvarades några dagar i -20° .

Det vore intressant med uppföljande studier som undersöker hur cTnI koncentrationerna är hos hundar med septiska och immunmedierade artriter. Dessa hundar förmodas ha en kraftigare inflammation än de flesta hundar i vår studiepopulation vilket kan tänkas bidra till sekundär hjärtmuskelskada. Resultatet att vikt och cTnI har ett positivt samband är det första i sitt slag och det behövs fler studier för att verifiera sambandet.

Sammanfattningsvis så skiljer sig inte cTnI koncentrationerna för hundar med icke-purulent OA och friska kontrollhundar och därmed verkar inte icke-purulent OA ge upphov till en sekundär myocytskada. Det kan vara värdefull information för kliniskt praktiserande veterinärer att veta att de inte behöver provta cTnI på denna typ av patienter. Studien visade att både ålder och vikt hade ett samband med cTnI koncentrationer (analyserade med högsensitiv metod) i blodet, dock var uppmätta koncentrationer mycket låga hos samtliga hundar i studien.

TACK

Ingrid Ljungvall som min handledare. Du har varit ett fantastiskt stöd som alltid varit generös med din tid för att hjälpa, diskutera och svara på mina frågor. Jag har tack vare dig haft väldigt roligt under arbetsprocessen. Du är en stor inspirationskälla och en förebild på många sätt. Jag är oerhört tacksam för all tid du lagt ner på mitt arbete och för att du alltid är så välkomnande på kliniken. Jag har fått en ny vän. Jag hade inte på något sätt kunnat ha en bättre handledare.

Anna Hillström som min biträdande handledare. Du har lagt ner ett enormt arbete på att samla in information om patienterna i studien och jag är tacksam för att du så generöst låtit mig ta del av detta. Tack för din hjälpsamhet och för bra synpunkter under skrivandets gång.

Lena Pelander för att du delade med dig av dina kontrollhundar. Tack också för att du orkade med att svara på ett stort antal mail. Jag är även mycket tacksam för att jag fått följa med dig på kliniken för att få en inblick i samt diskutera urinvägarnas intressanta värld.

Jens Häggström och **Katja Höglund** för att jag har fått spendera så många timmar med er på hjärtmottagningen. Det har varit oerhört roligt och lärorikt och gett mersmak för ämnet kardiologi. Ni är båda två mycket inspirerande lärare. Och ett extra tack till dig Jens som kommit med kloka åsikter som min examinator till arbetet.

Annika Bergström för att du tog dig tid för att hjälpa mig att reda ut en del funderingar angående patienterna i studien.

Stina Ekman för att du hjälpte mig att reda ut begreppen inom osteoartrit samt gav tips till intressanta artiklar inom ämnet.

Kjerstin Pettersson för att du väckte idén till detta arbete, utan din nyfikenhet hade det troligtvis inte kommit till. Tack även för att du delade med dig av din kunskap gällande sjukgymnastik och för att jag fick ta med en del av detta i mitt arbete.

REFERENSER

- Adin, D. B., Milner, R. J., Berger, K. D., Engel, C. & Salute, M. (2005). Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer. *Journal of Veterinary Cardiology*, 7(1), pp 27–32.
- Adin, D. B., Oyama, M. A., Sleeper, M. M. & Milner, R. J. (2006). Comparison of Canine Cardiac Troponin I Concentrations as Determined by 3 Analyzers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(5), pp 1136–1142.
- Ammann, P., Fehr, T., Minder, E., Günter, C. & Bertel, O. (2001). Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. *Intensive Care Medicine*, 27(6), pp 965–969.
- Apple, F. S., Collinson, P. O. & Biomarkers, for the I. T. F. on C. A. of C. (2012). Analytical Characteristics of High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays. *Clinical Chemistry*, 58(1), pp 54–61.
- Babuín, L. & Jaffe, A. S. (2005). Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *Canadian Medical Association Journal*, 173(10), pp 1191–1202.
- Burgener, I. A., Kovacevic, Ai., Mauldin, G. N. & Lombard, C. W. (2006). Cardiac Troponins as Indicators of Acute Myocardial Damage in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), pp 277–283.
- Cray, C., Zaias, J. & Altman, N. H. (2009). Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59(6), pp 517–526.
- Daghestani, H. N. & Kraus, V. B. (2015). Inflammatory biomarkers in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(11), pp 1890–1896 (Special Issue: Inflammation in Osteoarthritis).
- Detweiler, D. K. & Patterson, D. F. (1965). The Prevalence and Types of Cardiovascular Disease in Dogs*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 127(1), pp 481–516.
- Falk, T., Ljungvall, I., Zois, N. e., Höglund, K., Olsen, L. h., Pedersen, H. D. & Häggström, J. (2013). Cardiac Troponin-I Concentration, Myocardial Arteriosclerosis, and Fibrosis in Dogs with Congestive Heart Failure because of Myxomatous Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(3), pp 500–506.
- Fonfara, S., Loureiro, J., Swift, S., James, R., Cripps, P. & Dukes-McEwan, J. (2010). Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *The Veterinary Journal*, 184(3), pp 334–339.
- Gayet, C., Bailhache, E., Dumon, H., Martin, L., Siliart, B. & Nguyen, P. (2004). Insulin resistance and changes in plasma concentration of TNF α , IGF1, and NEFA in dogs during weight gain and obesity. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88(3-4), pp 157–165.
- Gaze, D. C. & Collinson, P. O. (2008). Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance. *Annals of Clinical Biochemistry*, 45(4), pp 349–355.
- Goldring, M. B. & Goldring, S. R. (2007). Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3), pp 626–634.

- Goldring, M. B. & Otero, M. (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, 23(5), pp 471–478.
- Hezzell, M. J., Boswood, A., Chang, Y.-M., Moonarmart, W., Souttar, K. & Elliott, J. (2012). The Combined Prognostic Potential of Serum High-Sensitivity Cardiac Troponin I and N-Terminal pro-B-Type Natriuretic Peptide Concentrations in Dogs with Degenerative Mitral Valve Disease. *Journal of veterinary internal medicine*, 26(2), pp 302–311.
- Ing, D. J., Zang, J., Dzau, V. J., Webster, K. A. & Bishopric, N. H. (1999). Modulation of Cytokine-Induced Cardiac Myocyte Apoptosis by Nitric Oxide, Bak, and Bcl-x. *Circulation Research*, 84(1), pp 21–33.
- Kumar, A., Thota, V., Dee, L., Olson, J., Uretz, E. & Parrillo, J. E. (1996). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(3), pp 949–958.
- Van der Laarse, A. (2002). Hypothesis: troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. *Cardiovascular Research*, 56(1), pp 8–14.
- Lakhan, S. E. & Harle, L. (2008). Cardiac fibrosis in the elderly, normotensive athlete: case report and review of the literature. *Diagnostic Pathology*, 3, p 12.
- Langhorn, R., Persson, F., Åblad, B., Goddard, A., Schoeman, J. P., Willesen, J. L., Tarnow, I. & Kjelgaard-Hansen, M. (2014). Myocardial injury in dogs with snake envenomation and its relation to systemic inflammation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(2), pp 174–181.
- Latini, R., Masson, S., Anand, I. S., Missov, E., Carlson, M., Vago, T., Angelici, L., Barlera, S., Parrinello, G., Maggioni, A. P., Tognoni, G., Cohn, J. N. & Investigators, for the V.-H. (2007). Prognostic Value of Very Low Plasma Concentrations of Troponin T in Patients With Stable Chronic Heart Failure. *Circulation*, 116(11), pp 1242–1249.
- Li, M. X., Wang, X. & Sykes, B. D. (2005). Structural based insights into the role of troponin in cardiac muscle pathophysiology. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 25(7), pp 559–579.
- Ljungvall, I., Höglund, K., Tidholm, A., Olsen, L. h., Borgarelli, M., Venge, P. & Häggström, J. (2010). Cardiac Troponin I Is Associated with Severity of Myxomatous Mitral Valve Disease, Age, and C-Reactive Protein in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(1), pp 153–159.
- Lobetti, R., Dvir, E. & Pearson, J. (2002). Cardiac Troponins in Canine Babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1), pp 63–68.
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis and Rheumatism*, 64(6), pp 1697–1707.
- Misbach, C., Chetboul, V., Concordet, D., Médaille, C., Gruet, P., Speranza, C., Hoffmann, A.-C., Rocha, A., Balouka, D., Petit, A. M. P., Trehiou-Sechi, E., Pouchelon, J.-L. & Lefebvre, H. P. (2014). Basal plasma concentrations of routine variables and packed cell volume in clinically healthy adult small-sized dogs: effect of breed, body weight, age, and

- gender, and establishment of reference intervals. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(3), pp 371–380.
- Moreno, V., Hernández-Romero, D., Vilchez, J. A., García-Honrubia, A., Cambronero, F., Casas, T., González, J., Martínez, P., Climent, V., de la Morena, G., Valdés, M. & Marín, F. (2010). Serum Levels of High-Sensitivity Troponin T: A Novel Marker for Cardiac Remodeling in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*, 16(12), pp 950–956.
- Oyama, M. A. & Sisson, D. D. (2004). Cardiac Troponin-I Concentration in Dogs with Cardiac Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(6), pp 831–839.
- Parrillo, J. E. (1993). Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock. *New England Journal of Medicine*, 328(20), pp 1471–1477.
- Pelander, L., Hagman, R. & Häggström, J. (2008). Concentrations of cardiac Troponin I before and after ovariohysterectomy in 46 female dogs with pyometra. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(1), p 35.
- Pelander, L., Ljungvall, I. & Häggström, J. (2010). Myocardial cell damage in 24 dogs bitten by the common European viper (*Vipera berus*). *Veterinary Record*, 166(22), pp 687–690.
- Rishniw, M., Barr, S. C., Simpson, K. W., Winand, N. J. & Wootton, J. A. M. (2004). Cloning and sequencing of the canine and feline cardiac troponin I genes. *American Journal of Veterinary Research*, 65(1), pp 53–58.
- Rychel, J. K. (2010). Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(1), pp 20–25 (Chronic Pain).
- Schober, K. E., Cornand, C., Kirbach, B., Aupperle, H. & Oechtering, G. (2002). Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(3), pp 381–388.
- Schober, K. E., Kirbach, B. & Oechtering, G. (1999). Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *Journal of Veterinary Cardiology*, 1(2), pp 17–25.
- Shaw, S. P., Rozanski, E. A. & Rush, J. E. (2004). Cardiac Troponins I and T in Dogs with Pericardial Effusion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(3), pp 322–324.
- Spratt, D. P., Mellanby, R. J., Drury, N. & Archer, J. (2005). Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 46(3), pp 139–145.
- Thomas, D. P., Zimmerman, S. D., Hansen, T. R., Martin, D. T. & McCormick, R. J. (2000). Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training. *Journal of Applied Physiology*, 89(4), pp 1462–1468.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., White, H. D., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., Katus, H. A., Apple, F. S., Lindahl, B., Morrow, D. A., Clemmensen, P. M., Johanson, P., Hod, H., Underwood, R., Bax, J. J., Bonow, R. O., Pinto, F., Gibbons, R. J., Fox, K. A., Atar, D., Newby, L. K., Galvani, M., Hamm, C. W., Uretsky, B. F., Steg, P. G., Wijns, W., Bassand, J.-P., Menasche, P., Ravkilde, J., Ohman, E. M., Antman, E. M., Wallentin, L. C., Armstrong, P. W., Januzzi, J. L., Niemenen, M. S., Gheorghide, M., Filippatos, G., Luepker,

R. V., Fortmann, S. P., Rosamond, W. D., Levy, D., Wood, D., Smith, S. C., Hu, D., Lopez-Sendon, J.-L., Robertson, R. M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A. A., Parkhomenko, A. N., Vasilieva, E. J. & Mendis, S. (2012). Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(16), pp 1581–1598.

Villari, B., Vassalli, G., Schneider, J., Chiariello, M. & Hess, O. M. (1997). Age Dependency of Left Ventricular Diastolic Function in Pressure Overload Hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology*, 29(1), pp 181–186.

Wells, S. M. & Sleeper, M. (2008). Cardiac troponins. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(3), pp 235–245.

Whitney, J. (1976). Some Aspects of Pathogenesis of Canine Arteriosclerosis. *Journal of Small Animal Practice*, 17(2), pp 87–97.