

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina

UDK 636.7.09:616.1:543.637:577.11/.16(043.3)

Barbara Verk, dr. vet. med.

**POKAZATELJI OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA
PRI PSIH S SPONTANIMI KARDIOVASKULARNIMI
OBOLENJI**

Doktorska disertacija

**MARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND
INFLAMMATION IN DOGS WITH SPONTANEOUS
CARDIOVASCULAR DISEASES**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2018

Barbara Verk

Pokazatelji oksidativnega stresa in vnetja pri psih s spontanimi kardiovaskularnimi obolenji

Delo je bilo opravljeno na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, na Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, na Inštitutu za predklinične vede, Enote za fiziologijo in patološko fiziologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za zootehniko, Katedre za prehrano na Biotehnični fakulteti Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen: _____

Mentorica: izr. prof. dr. Aleksandra Domanjko Petrič

Somentorica: izr. prof. dr. Alenka Nemec Svete

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: izr. prof. dr. Martina Klinkon Ogrinec

Član: prof. dr. Vito Starc

Članica: doc. dr. Alenka Seliškar

POKAZATELJI OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA PRI PSIH S SPONTANIMI KARDIOVASKULARNIMI BOLENJI

Izvleček

Ključne besede: pes, bolezni; kardiovaskularne bolezni; srčno popuščanje – patofiziologija; vnetje – terapija z zdravili; oksidativni stres — fiziologija; E vitamin – kri; malondialdehid – kri; glutathion peroksidaza – kri; kri, kemične analize; faktor tumorske nekroze-alfa; C-reaktivna beljakovina; psi

Z določanjem pokazateljev oksidativnega stresa in vnetja smo v krvi psov z miksomatozno degeneracijo zaklopk (MDZ) in dilatacijsko kardiomiopatijo (DKM) v različnih stopnjah bolezni želeli ugotoviti prisotnost oksidativnega stresa in vnetja. Zanimal nas je tudi vpliv zdravljenja srčnega popuščanja na parametre oksidativnega stresa in vnetja ter morebitne povezave med pokazatelji vnetja, oksidativnega stresa ter napreduječnosti bolezni. Oksidativni stres smo ovrednotili z določanjem pokazatelja lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA), antioksidanta vitamina E, ki je močan lovilec prostih radikalov, ter enega izmed glavnih intracelularnih antioksidantnih encimov, glutathion peroksidaze (GPX). Vnetje smo ovrednotili na podlagi določanja proinflammatoryh citokinov (interlevkin-6 (IL-6), tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)) in C-reaktivnega proteina (CRP), glavnega proteina akutne faze vnetja pri psih. Za kvantitativno oceno napreduječnosti bolezni smo pri psih določili koncentracijo N-terminalnega fragmenta natriuretičnega pro-peptida tipa B. V raziskavo smo vključili 37 psov, 21 psov z MDZ, 16 psov z DKM in 10 zdravih psov. Ugotovili smo, da se plazemska koncentracija MDA in vitamina E, aktivnost GPX ter serumske koncentracije proinflammatoryh citokinov značilno ne spreminjajo s stopnjo srčnega popuščanja in se značilno ne razlikujejo v primerjavi z zdravimi psi. Ugotovili pa smo, da v patogenezi srčnega popuščanja pride do vnetja, saj smo ugotovili značilno višje koncentracije CRP v najvišji stopnji srčnega popuščanja v primerjavi z zdravimi psi. Prisotnost vnetja potrjujejo tudi značilno povišano skupno število levkocitov in nevtrofilnih granulocitov v tej stopnji popuščanja srca v primerjavi z zdravimi psi. Ugotovili smo pozitivno povezavo med TNF- α in MDA pri psih v najvišji stopnji srčnega popuščanja, negativno povezavo med TNF- α in GPX v skupini nezdravljenih psov ter pozitivno povezavo med TNF- α in vitaminom E v skupini zdravljenih psov, kar kaže na povezavo oksidativnega stresa in vnetja pri psih z napredujočim srčnim popuščanjem. Zdravljenje srčnega popuščanja ni vplivalo na parametre oksidativnega stresa in vnetja.

MARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN DOGS WITH SPONTANEOUS CARDIOVASCULAR DISEASES

Abstract

Key words: Dog diseases; cardiovascular diseases; heart failure — physiopathology; inflammation — drug therapy; oxidative stress — physiology; E vitamin — blood; malondialdehyde — blood; glutathione peroxidase — blood; blood chemical analysis; tumor necrosis factor- α ; C-reactive protein; Dogs

The purpose of our study was to investigate whether oxidative stress and inflammation are present in dogs with different stages of cardiovascular diseases (myxomatous valve disease (MVD), dilated cardiomyopathy (DCM)) by means of evaluating markers of oxidative stress and inflammation. Additionally, we investigated the effect of cardiac therapy on oxidative stress and inflammatory parameters and correlations between disease severity and parameters of oxidative stress and inflammation. Oxidative stress was evaluated by measuring values of lipid peroxidation product, malondialdehyde (MDA), antioxidant vitamin E, which is a potent free radical scavenger, and one of the major intracellular antioxidant enzyme, glutathione peroxidase (GPX). Inflammation was evaluated by measuring values of proinflammatory cytokines (interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)), and C-reactive protein (CRP), major acute phase protein in dogs. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide was determined to serve as the quantitative marker of disease severity. Thirty-seven dogs, 21 with MVD, 16 with DCM and 10 healthy controls were included in the study. Our study demonstrated that plasma MDA and vitamin E concentrations, activity of GPX and serum concentration of proinflammatory cytokines did not change significantly with the stage of heart disease and that these parameters did not differ significantly in comparison to healthy controls. However, we found out that inflammation is present in the pathogenesis of heart failure, as evident from significantly higher CRP concentration found in the highest stage of heart failure in comparison to healthy dogs. The presence of inflammation is also supported by significantly higher leukocyte and neutrophil counts in this stage of the heart failure in comparison to healthy dogs. A positive correlation between MDA and TNF- α in dogs in the highest stage of heart failure, a negative correlation between TNF- α and GPX in group of non-treated patients and positive correlation between TNF- α and vitamin E in treated patients indicate the association of oxidative stress and inflammation in dogs with advanced stage of heart failure. Cardiac treatment did not affect oxidative stress and inflammatory parameters.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	15
1.1	NAMEN RAZISKAVE	19
1.2	HIPOTEZE	19
2	PREGLED LITERATURE	20
2.1	KARDIOVASKULARNE BOLEZNI IN POPUŠČANJE SRCA PRI PSIH	20
2.2	NATRIURETIČNI PEPTID TIPA B	22
2.3	REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI (ROS)	24
2.4	OKSIDATIVNI STRES	28
2.4.1	Lipidna peroksidacija in malondialdehid (MDA)	29
2.5	ANTIOKSIDANTNI SISTEM	30
2.5.1	Vitamin E	31
2.5.2	Glutation peroksidaza (GPX)	32
2.6	VNETJE IN KARDIOVASKULARNE BOLEZNI	33
2.6.1	C–reaktivni protein (CRP)	36
2.6.2	Proinflammatory citokini	37
2.6.2.1	Interleukin–6 (IL–6)	37
2.6.2.2	Tumor nekrotizirajoči faktor– α (TNF– α)	38
2.7	POVEZAVA OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA PRI POPUŠČANJU SRCA	39
2.8	RAZISKAVE OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA PRI KARDIOVASKULARNIH BOLEZNIH	40
2.8.1	Študije oksidativnega stresa pri ljudeh in psih	40
2.8.2	Študije vnetja pri ljudeh in psih	47
3	MATERIALI IN METODE	53
3.1	IZBOR PSOV	53
3.1.1	Ehokardiografija	54
3.2	ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV	55
3.3	ANALITIČNE METODE	57
3.3.1	Hematološke in biokemijske preiskave	57

3.3.2	Antioksidantni parametri	57
3.3.2.1	Vitamin E.....	57
3.3.2.2	Glutation peroksidaza (GPX)	58
3.3.3	Pokazatelj oksidativnega stresa – malondialdehid (MDA).....	59
3.3.4	Pokazatelji vnetja – C–reaktivni protein, interleukin–6 in tumor nekrotizirajoči faktor–α	59
3.3.5	Pokazatelj popuščanja srca (NT–proBNP)	59
3.4	STATISTIČNA ANALIZA.....	60
4	REZULTATI	61
4.1	OPISNI PODATKI PSOV	61
4.2	KARDIOVASKULARNE BOLEZNI V POSAMEZNIH SKUPINAH PSOV IN ŠTEVILO ZDRAVLJENIH TER NEZDRAVLJENIH PSOV	63
4.3	N-TERMINALNI FRAGMENT NATRIURETIČNEGA PRO-PEPTIDA TIPA B (NT–proBNP)	64
4.4	POKAZATELJI OKSIDATIVNEGA STRESA	66
4.4.1	Malondaldehid (MDA).....	66
4.4.2	Glutation peroksidaza (GPX).....	66
4.4.3	Vitamin E in lipidno standardiziran vitamin E (LS–VE).....	66
4.5	POKAZATELJI VNETJA PRI PSIH V ISACHC SKUPINAH IN ZDRAVIH PSIH TER PRI ZDRAVLJENIH IN NEZDRAVLJENIH PSIH	68
4.5.1	Tumor nekrotizirajoči faktor–α (TNF–α).....	68
4.5.2	Interleukin–6 (IL–6)	68
4.5.3	C–reaktivni protein (CRP)	68
4.6	BELA KRVNA SLIKA.....	70
4.7	PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA TER NT–proBNP PRI PSIH, OBOLELIMI ZA MDZ ALI DKM V STOPNJI ISACHC III	72
4.8	MEDSEBOJNE POVEZAVE VSEH IZMERJENIH PARAMETROV V POSAMEZNIH ISACHC SKUPINAH IN SKUPINAH ZDRAVLJENIH IN NEZDRAVLJENIH PSOV	75
5	RAZPRAVA	80
5.1	N-TERMINALNI FRAGMENT NATRIURETIČNEGA PRO-PEPTIDA TIPA B	81

5.2	POKAZATELJI OKSIDATIVNEGA STRESA	82
5.3	ANTIOKSIDANTNI PARAMETRI	84
5.3.1	Glutation peroksidaza (GPX)	84
5.3.2	Vitamin E in LS–VE	85
5.4	PARAMETRI VNETJA	87
5.4.1	C–reaktivni protein (CRP)	87
5.4.2	Tumor nekrotizirajoči faktor–α (TNF–α)	88
5.4.3	Interlevkin–6 (IL–6)	90
5.4.4	Bela krvna slika	90
5.5	POVEZAVE MED PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA, VNETJA IN EHOKARDIOGRAFSKIMI PARAMETRI	91
6	SKLEPI	97
7	POVZETEK	98
8	SUMMARY	101
9	ZAHVALE	104
10	LITERATURA	106
11	PRILOGE	124
11.1	PRILOGA ŠT. 1	124
11.2	PRILOGA ŠT. 2	125
11.3	PRILOGA ŠT. 3	126
11.3	PRILOGA ŠT. 4	128
11.4	PRILOGA ŠT. 5	129
11.5	PRILOGA ŠT. 6	130
11.6	ČLANEK (VERK IN SOD., 2017)	131

Kazalo tabel

Tabela 1: Najpogostejši in najpomembnejši predstavniki ROS, ki nastajajo v organizmu (Dhalla in sod., 2000; Kohen in Nyska, 2002; Giordano, 2005)	
Table 1: The most important ROS in living organism (Dhalla et al., 2000; Kohen and Nyska, 2002; Giordano, 2005).....	25
Tabela 2: Opisni podatki psov, vključenih v raziskavo	
Table 2: Descriptive data of dogs included in the study.....	62
Tabela 3: Opisni podatki zdravljenih in nezdravljenih psov (ISACHC II in III)	
Table 3: Descriptive data of treated and non-treated dogs (ISACHC II and III)	62
Tabela 4: Opisni podatki psov z DKM in MDZ v stopnji ISACHC III	
Table 4: Descriptive data of dogs with DCM and MVD in ISACHC III	63
Tabela 5: Psi z MDZ in DKM v različnih ISACHC skupinah ter zdravljeni in nezdravljeni psi	
Table 5: Number of dogs with MVD and DCM in different ISACHC groups and number of treated and non-treated dogs.....	63
Tabela 6: Kardiološka zdravila, ki so jih prejeli zdravljeni psi s kardiovaskularnim obolenjem v ISACHC II in III stopnji	
Table 6: List of cardiac medications given to treated dogs in ISACHC II and III	64
Tabela 7: Plazemska koncentracija NT-proBNP pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih	
Table 7: Plasma concentrations of NT-proBNP of dogs in different stages of heart failure and healthy dogs.....	65
Tabela 8: Plazemska koncentracija NT-proBNP pri zdravljenih in nezdravljenih psih	
Table 8: Plasma concentrations of NT-proBNP in treated and non-treated dogs.....	65
Tabela 9: Parametri oksidativnega stresa pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih	
Table 9: Parameters of oxidative stress in dogs at different stages of heart failure and healthy dogs	67
Tabela 10: Parametri oksidativnega stresa pri zdravljenih in nezdravljenih psih	
Table 10: Parameters of oxidative stress in treated and non-treated dogs	67
Tabela 11: Parametri vnetja pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih	
Table 11: Parameters of inflammation in dogs at different stages of heart failure and healthy dogs	69
Tabela 12: Parametri vnetja pri zdravljenih in nezdravljenih psih	
Table 12: Parameters of inflammation in treated and non-treated dogs.....	69
Tabela 13: Bela krvna slika pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih	
Table 13: Total white blood cell count (WBC) and differential WBC in dogs in different stages of heart failure and healthy dogs	71
Tabela 14: Bela krvna slika pri zdravljenih in nezdravljenih psih	
Table 14: Total white blood cell count (WBC) and differential WBC in treated and non-treated dogs	72
Tabela 15: Parametri oksidativnega stresa in vnetja ter NT-proBNP pri psih z MDZ ali DKM V ISACHC III	

Table 15: Oxidative stress, inflammatory parameters and NT-proBNP in dogs with DCM or MVD in ISACHC III	73
Tabela 16: Bela krvna slika pri psih, obolelih za MDZ ali DKM v ISACHC III skupini	
Table 16: Total white blood cell count (WBC) and differential WBC in dogs with MVD or DCM in ISACHC III	74
Tabela 17: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri skupini psov v stopnji ISACHC I	
Table 17: Significant correlations between all parameters in group of dogs in ISACHC I.....	75
Tabela 18: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri skupini psov v stopnji ISACHC II	
Table 18: Significant correlations between all parameters in group of dogs in ISACHC II.....	76
Tabela 19: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri skupini psov v stopnji ISACHC III	
Table 19: Significant correlations between all parameters in group of dogs in ISACHC III	77
Tabela 20: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri nezdravljenih psih	
Table 20: Significant correlations between all parameters in non-treated dogs.....	78
Tabela 21: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri zdravljenih psih	
Table 21: Significant correlations between all parameters in treated dog	79
Tabela 22: Ocena telesne kondicije pri psih (Baldwin in sod., 2010)	
Table 22: Body Condition Score in dogs (Baldwin et al., 2010).....	124
Tabela 23: Izbrani hematološki parametri pri psih, ki so bili vključeni v raziskavo	
Table 23: Selected haematological parameters of dogs included in the study.....	128
Tabela 24: Izbrani biokemijski parametri pri psih, ki so bili vključeni v raziskavo	
Table 24: Selected biochemical parameters of dogs included in the study	129
Tabela 25: Izbrani ehokardiografski parametri psih s kardiovaskularnim obolenjem, ki so bili vključeni v raziskavo	
Table 25: Selected echocardiographic parameters of dogs with cardiovascular disease included in the study ...	130

Seznam okrajšav

ACE	encim angiotenzin konvertaza; angl. Angiotensin Converting Enzyme
ALT	alanin–aminotrasferaza
ANP	atrijski natriuretični peptid
Ao	premer aorte
AP	alkalna fosfataza; angl. Alkaline Phosphatase
ATP	adenozintrifosfat; angl. Adenosine Triphosphate
BCS	ocena telesne kondicije; angl. Body Condition Score
BNP	natriuretični peptid tipa B; angl. Brain Natriuretic Peptide
Ca ²⁺	kalcijevi ioni
CHF	kongestivno popuščanje srca; angl. Congestive Heart Failure
CoQ ₁₀	koencim Q ₁₀ ; angl. Coenzyme Q ₁₀
CRP	C–reaktivni protein; angl. C–Reactive Protein
DKM	dilatacijska kardiomiopatija; angl. Dilated Cardiomyopathy, DCM
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E/Ar	razmerje med valom E in A mitralnega priliva
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ELISA	encimsko imunski test; angl. Enzyme–Linked Immunosorbent Assay
ESR	elektronska spinska resonančna spektroskopija
EDVtz	volumen ob koncu diastole po Teicholz formuli; angl. End Diastolic Volume of left ventricle calculated by Teicholz formula (mL)
ESVtz	volumen ob koncu sistole po Teicholz formuli; angl. End Systolic Volume of left ventricle calculated by Teicholz formula (mL)
Fe ²⁺	železovi ioni
FS	sistolično skrajšanje levega prekata; angl. Fractional Shortening
G–CSF	granulocitne kolonije stimulirajoči faktor; angl. Granulocyte–Colony Stimulating Factor
GM–CSF	granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajoči faktor; angl. Granulocyte Macrophage Colony–Stimulating Factor
GPX	glutation peroksidaza; angl. Glutathione Peroxidase

GSH	glutation; angl. Glutathione
GSSG	reducirana oblika glutathiona
Hb	hemoglobin
HKM	hipertrofna kardiomiopatija
4-HNE	4-hidroksinonenal
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HO ₂ •	hidroperoksilni radikal
HOCl	hipoklorna kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; angl. High Performance Liquid Chromatography
hsCRP	visoko občutljivi C-reaktivni protein; angl. High Sensitivity C-Reactive Protein
IL-1	interlevkin-1
IL-6	interlevkin-6
IL-6R	receptor za IL-6
iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida; angl. Inducible Nitric Oxide Synthase
ISACHC	mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali; angl. International Small Animal Cardiac Health Council
IU	mednarodne enote; angl. International Unit
IVSd	medprekatni pretin v diastoli; angl. Interventricular Septum Dimension in Diastole (mm)
IVSs	medprekatni pretin v sistoli; angl. Interventricular Septum Dimension in Systole (mm)
LAD	premer levega preddvora; angl. Left Atrial Diameter
LAD/Ao	razmerje med premerom levega preddvora in aorte
LS-VE	lipidno standardizirana koncentracija vitamina E
LVDd	premer levega prekata v diastoli; angl. Left Ventricular Diastolic Dimension
LVDs	premer levega prekata v sistoli; angl. Left Ventricular Systolic Dimension
LVEF	iztisni delež levega prekata; angl. Left Ventricular Ejection Fraction

LVmass	masa levega prekata; angl. Left Ventricular mass (g)
LVPWd	prosta stena levega prekata v diastoli; angl. Left Ventricular Posterior Wall Thickness in Diastole (mm)
LVPWs	prosta stena levega prekata v sistoli; angl. Left Ventricular Posterior Wall Thickness in Systole (mm)
MDA	malondialdehid; angl. Malondialdehyde
MDZ	miksomatozna degeneracija zaklopk; angl. Myxomatous Valvular Degeneration, MVD
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
NF- κ B	jedrni faktor kapa aktiviranih celic B; angl. Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells
NO	dušikov oksid
NO ₂ [•]	radikal dušikovega dioksida
NOS	sintaza dušikovega oksida; angl. Nitric Oxide Synthase
NT-proBNP	N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B; angl. N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide
NYHA	klasifikacija srčnega popuščanja; angl. New York Heart Association
¹ O ₂	singletni kisik
O ₂ ^{•-}	superoksidni ion
•OH	hidroksilni radikal
oxLDL	oksidiran lipoprotein nizke gostote; angl. Oxidized Low-Density Lipoprotein
PDA	perzistentni duktus arteriosus
PDGF	trombocitni rastni faktor; angl. Platelet-Derived Growth Factor
ROO [•]	prosti lipidni radikal
ROS	reaktivne kisikove zvrsti; angl. Reactive Oxygen Species
SOD	superoksidna dismutaza; angl. Superoxide Dismutase
TAC	celokupna antioksidantna kapaciteta; angl. Total Antioxidant Capacity
TBARS	s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine; angl. Thiobarbituric Acid Reacting Substances

TGF- β	transformirajoči rastni faktor β ; angl. Transforming Growth Factor beta
TLR	Tollu podoben receptor; angl. Toll-Like Receptor
TNF- α	tumor nekrotizirajoči faktor- α ; angl. Tumor Necrosis Factor- α
TNFR	receptor za tumor nekrotizirajoči faktor; angl. Tumor Necrosis Factor Receptor
TRp	trikuspidalni gradient (mmHg)
SD	standardni odklon; angl. Standard Deviation
sIL-6R	topni receptor IL-6; angl. Soluble IL-6 Receptor
sTNFRF	topni receptor za tumor nekrotizirajoči faktor; angl. Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor
val A	pozni mitralni priliv (m/s)
val E	zgodnji mitralni priliv (m/s)
WBC	bela krvna slika; angl. White Blood Cell Count

1 UVOD

Popuščanje srca je eden glavnih vzrokov umrljivosti pri ljudeh (National Center for Health Statistics, 2017). Prav tako kot pri ljudeh se tudi pri psih pojavnost umrljivosti zaradi popuščanja srca povečuje (Atkins in sod., 2009). Vzrok za to gre pripisati podaljšanju pričakovane življenjske dobe pri psih, genetskim nepravilnostim zaradi selekcijske vzreje psov kot tudi dejavnikom okolja. Raziskave patogeneze popuščanja srca poročajo o prekomernem samouravnalnem nevrohormonalnem delovanju na kardiovaskularni sistem. Srčno popuščanje nastane kot posledica prekomernega izločanja biološko aktivnih substanc (kateholamini, natriuretični peptidi, pro- in antiinflamatorni citokini, adrenomedulin, endotelin, arginin–vazopresin in mnogi drugi), ki škodljivo delujejo na celice kardiovaskularnega sistema (Gullestad in sod., 2012; Scollan in Sisson, 2017).

Mnogi raziskovalci na področju tako humane kot tudi veterinarske medicine želijo dobiti še jasnejši vpogled v patofiziološke mehanizme nastanka razvoja srčnega popuščanja in najti ustrezne pokazatelje (biomarkerje) popuščanja srca, ki bi dovolj zgodaj in zanesljivo nakazovali na prisotnost kardiovaskularnih bolezni ter stopnjo napredovalosti popuščanja srca. Raziskave pri ljudeh kažejo, da bi v diagnostiki kardiovaskularnih obolenj kombinirana uporaba pokazateljev srčnega popuščanja, kot so atrijski natriuretični peptid (ANP), natriuretični peptid tipa B (angl. Brain Natriuretic Peptide, BNP), N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B (angl. N–Terminal Pro–B–Type Natriuretic Peptide, NT–proBNP), troponina I in pokazateljev oksidativnega stresa, malondialdehid (angl. Malondialdehyde, MDA), izoprostani, aktivnost ali koncentracija mieloperoksidaze ter pokazateljev vnetja, kot so tumor nekrotizirajoči faktor– α (TNF– α), interleukin (IL)–1, IL–6 in C–reaktivni protein (angl. C–Reactive Protein, CRP), lahko izboljšala zgodnjo diagnostiko popuščanja srca pri bolnikih (Collinson, 2005; Ng in sod., 2006; Smith in sod., 2010; Ho in sod., 2013; Szczurek in Szyguła–Jurkiewicz, 2015).

Pri ljudeh s kardiovaskularnimi boleznimi je dokazano porušeno ravnotežje med antioksidativnimi in prooksidativnimi procesi, kar vodi v stanje oksidativnega stresa (Mak in Newton, 2001; Halliwell in Gutteridge, 2007; Siti in sod., 2015). Številne študije, pri katerih so ugotavljali povezavo med oksidativnim stresom in različnimi kardiovaskularnimi

boleznimi pri ljudeh in psih, so potrdile, da imajo bolniki s kardiovaskularnimi boleznimi spremenjene vrednosti pokazateljev oksidativnega stresa. Pri ljudeh so ugotovili zvišanje pokazateljev oksidativnih poškodb biomolekul, kot so MDA (Díaz-Velez in sod., 1996; Ghatak in sod., 1996; Keith in sod., 1998; Serdar in sod., 2001; Polidori in sod., 2002; White in sod., 2006; Jawalekar in sod., 2010; Bhat in sod., 2012; Wojciechowska in sod., 2014), F2–izoprostan (Polidori in sod., 2004; White in sod., 2006), proteinski karbonili (Jawalekar in sod., 2010) in oksidirani lipoprotein nizke gostote (angl. Oxidized Low-Density Lipoprotein, oxLDL) (Faviou in sod., 2005). Pri obširnem pregledu literature smo našli le eno objavo rezultatov klinične raziskave pri psih, kjer so ugotovili značilno zvišanje parametrov oksidativnega stresa, ki dokazujejo oksidativne poškodbe biomolekul, to je F2–izoprostanov (pokazatelj oksidativnih poškodb lipidov) pri psih z boleznimi srca (Freeman in sod., 2005). Večina drugih raziskav ni ugotovila zvišanja pokazateljev oksidativnih poškodb lipidov, MDA (Freeman in sod., 1999; Freeman in sod., 2005; Reimann in sod., 2017; Verk in sod., 2017) ali oxLDL (Reimann in sod., 2017) oziroma oksidativnih poškodb proteinov, to je proteinskih karbonilov (Freeman in sod., 2005) pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi.

Ugotovljeno je, da so pri ljudeh s kardiovaskularnimi boleznimi vrednosti antioksidantnega statusa, kot so aktivnost glutation peroksidaze (angl. Glutathione Peroxidase, GPX) (Polidori in sod., 2004; Castro in sod., 2002), aktivnost superoksidne dismutaze (angl. Superoxide Dismutase, SOD) (Ghatak in sod., 1996), koncentracije vitamina E (Polidori in sod., 2002; Cavalca in sod., 2013) in koencima Q₁₀ (angl. Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀) (Senes in sod., 2008; Kumar in sod., 2009) znižane v primerjavi z zdravimi ljudmi. Študija pri psih z dilatacijsko kardiomiopatijo (DKM) potrjuje rezultatom humanih študij, saj so ugotovili znižane koncentracije vitamina E (Freeman in sod., 2005) v primerjavi z zdravimi psi. Kljub raziskavam, ki so potrdile zgoraj navedene trditve, rezultati nekaterih drugih raziskav teh ugotovitev pri psih niso uspeli potrditi; na primer sprememb v koncentraciji vitamina E (Freeman in sod., 1998a; Freeman in sod., 1999; Reimann in sod., 2017; Verk in sod., 2017), aktivnosti GPX (Svete in sod., 2017; Verk in sod., 2017), aktivnosti SOD (Verk, 2010; Svete in sod., 2017) in CoQ₁₀ (Svete in sod., 2017). So pa ugotovili povečano aktivnost GPX pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi v primerjavi z zdravimi psi (Freeman in sod., 1998a; Freeman in sod., 1999; Verk, 2010).

Pri ljudeh so že dokazali, da spremenjene vrednosti pokazateljev oksidativnega stresa, in sicer povišana koncentracija MDA, izoprostanov ter proteinskih karbonilov in znižana aktivnost antioksidantnih encimov nakazujejo na poslabšanje kliničnega stanja popuščanja srca (Díaz-Velez in sod., 1996; Amir in sod., 2009; Flores-Mateo in sod., 2009). Zdravljenje srčnega popuščanja bi lahko usmerili tudi proti škodljivemu delovanju ROS z dodajanjem antioksidantov, kot so vitamin E, ki prepreči nastanek miokardialnih infarktov pri ljudeh z angino pectoris in koronarno aterosklerozo (Stephens in sod., 1996), vitamin C, ki zmanjša obseg apoptoze endotelijskih celic pri bolnikih s kongestivnim popuščanjem srca (angl. Congestive Heart Failure, CHF) (Rössig in sod., 2001), in kombinacija obeh, kar upočasni razvoj ateroskleroze pri ljudeh s hiperholesterolemijo (Salonen in sod., 2003), ter CoQ₁₀, ki izboljša krčljivost levega prekata pri bolnikih s popuščanjem srca in izboljša funkcijo endotelija brez neželenih učinkov (Belardinelli in sod., 2005; Kumar in sod., 2009).

Pri ljudeh s srčnim popuščanjem so ugotovili, da zdravljenje srčnega popuščanja s selektivnimi blokatorji α in β adrenergičnih receptorjev, zaviralci angiotenzin konvertaze (ACE inhibitorji; angl. Angiotensin Converting Enzyme) in zaviralci kalcijevih kanalčkov vpliva na pokazatelje oksidativnega stresa, kar posledično lahko nakazuje na antioksidantno delovanje določenih kardioloških zdravil (Weglicki in sod., 1990; Weglicki in sod., 1999; Hornig in sod., 2001; Napoli in sod., 2004; Nakamura in sod., 2011). Določena kardiološka zdravila (selektivni blokatorji α in β adrenergičnih receptorjev, ACE inhibitorji) naj bi zmanjševala obseg lipidne peroksidacije, kar se je pokazalo v zmanjšanju koncentracije MDA (Napoli in sod., 2004; Castro in sod., 2005), s tiobarbiturno kislino reagirajočih spojin (angl. Thiobarbituric Acid Reacting Substances, TBARS) (Kukin in sod., 1999) in lipidnih hidroperoksidov v krvi (Chin in sod., 2003) pri ljudeh s popuščanjem srca.

Klinične raziskave pri ljudeh in eksperimentalne študije na živalskih modelih potrjujejo, da je tudi vnetje povezano s patogenezo različnih kardiovaskularnih bolezni, ki vodijo v popuščanje srca (Hirschfield in Pepys, 2003; Yndestad in sod., 2007; Gullestad in sod., 2012). Pri ljudeh z različnimi kardiovaskularnimi boleznimi (koronarna bolezen, DKM, bolezni zaklopke in druge bolezni srca) so ugotovili povišane vrednosti pokazateljev vnetja v serumu ali plazmi, kot so CRP (Elster in sod., 1956; Huang in sod., 2004; Anand in sod., 2005; White in sod., 2006; Senes in sod., 2008; Ansari in sod., 2012; Wojciechowska in sod., 2014; Ostrowska in sod., 2017), IL-1, IL-6 in TNF- α (Levine in sod., 1990; Torre-Amione in sod., 1996; White

in sod., 2006; Ansari in sod., 2012; Chen in sod., 2014). Rezultati kliničnih študij kažejo, da so povišane vrednosti proinflammatoryh citokinov (IL-6, TNF- α , IL-1) (Rauchhaus in sod., 2000; Su in sod., 2013) in CRP (Blankenberg in sod., 2003; Huang in sod., 2004; Anand in sod., 2005; Ostrowska in sod., 2017) v krvi pri ljudeh s kardiovaskularnim obolenjem značilno povezane z večjo smrtnostjo in slabšo možnostjo preživetja.

Pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi je povezava med pokazatelji vnetja in napredovalostjo srčnega popuščanja dokaj slabo raziskana, saj je bilo do sedaj narejeno zelo malo kliničnih študij, ki so preučevale to tematiko. Nekaj študij je dokazalo povečano serumsko ali plazemsko koncentracijo CRP pri psih z boleznimi srca, kot sta miksomatozna degeneracija zaklopk (MDZ) in DKM (Rush in sod., 2006; Cunningham in sod., 2012; Lukman, 2012; Reimann in sod., 2016) v primerjavi z zdravimi psi, drugi pa povečanja koncentracije CRP v krvi niso uspeli dokazati (Ljungvall in sod., 2010). Koncentracija CRP v plazmi se zvišuje z napredovanjem srčnega popuščanja pri psih (Lukman, 2012; Polizopoulou in sod., 2015), določene študije pa tega niso potrdile (Rush in sod., 2006). Z maloštevilnimi kliničnimi študijami pri psih so določali koncentracije proinflammatoryh citokinov pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi. Niso ugotovili značilnih sprememb med koncentracijami interleukinov pri psih obolelimi za MDZ (Zois in sod., 2012) ali DKM (Freeman in sod., 1998b) in zdravimi psi.

Zdravljenje srčnega popuščanja vpliva na znižanje koncentracij TNF- α , IL-6 in CRP v krvi pri ljudeh s popuščanjem srca (Sato in sod., 1999; Tsutamoto in sod., 2000; Kurum in sod., 2007; Bozkurt in sod., 2010).

Novejše raziskave potrjujejo tesno povezavo med oksidativnim stresom in vnetjem v patogenezi srčnih bolezni. Povečana koncentracija reaktivnih kisikovih zvrsti (angl. Reactive Oxygen Species, ROS) povzroči nastajanje proinflammatoryh citokinov v srčnem tkivu (Yndestad in sod., 2007). Prav tako predpostavljajo, da lahko vnetje povzroči povečan nastanek ROS srčno-žilnem sistemu (Yndestad in sod., 2007; Amir in sod., 2009; Bouras in sod., 2014; Szczurek in Szygula-Jurkiewicz, 2015).

1.1 NAMEN RAZISKAVE

Namen raziskave je bil ugotoviti vrednosti pokazateljev oksidativnega stresa in vnetja ter njihove medsebojne povezave pri psih z MDZ in DKM v različnih stopnjah popuščanja srca ter pri zdravljenih in nezdravljenih psih v srčnem popuščanju.

1.2 HIPOTEZE

Z raziskavo smo želeli potrditi naslednje hipoteze:

1. Plazemska koncentracija MDA je višja pri psih z MDZ in DKM v primerjavi z zdravimi psi in se zvišuje s stopnjo srčnega popuščanja.
2. Plazemska koncentracija vitamina E in aktivnost GPX v krvi sta nižji pri psih z MDZ in DKM v primerjavi z zdravimi psi in se znižujeta s stopnjo srčnega popuščanja.
3. Zdravljeni psi s srčnim popuščanjem imajo nižjo plazemsko koncentracijo MDA in višjo plazemsko koncentracijo vitamina E ter višjo aktivnost GPX v krvi v primerjavi z nezdravljenimi psi s srčnim popuščanjem.
4. Serumske koncentracije IL-6, TNF- α in CRP so višje pri psih z MDZ in DKM v primerjavi z zdravimi psi in se zvišujejo s stopnjo srčnega popuščanja.
5. Psi z MDZ in DKM ter s povišano plazemsko koncentracijo MDA imajo sočasno tudi povišane serumske koncentracije pokazateljev vnetja (IL-6, TNF- α in CRP).

2 PREGLED LITERATURE

2.1 KARDIOVASKULARNE BOLEZNI IN POPUŠČANJE SRCA PRI PSIH

V veterinarski medicini se srečujemo s porastom kardiovaskularnih obolenj pri psih. Kar 10 % vseh bolezni, ki se pojavijo pri psih, predstavljajo kardiovaskularna obolenja in s starostjo živali se ta odstotek lahko poveča na kar 75 % (Atkins in sod., 2009).

Najpogostejši pridobljeni bolezni srca pri psih sta MDZ in DKM (Scollan in Sisson, 2017).

V literaturi se pojavlja več poimenovanj MDZ; bolezen poimenujejo tudi kronična valvularna bolezen, kronična degenerativna valvularna bolezen, kronična valvularna fibroza in endokardioza. Bolezen se najpogosteje pojavlja pri malih pasmah psov, kot so pasme king charles španjel, kavalir king charles španjel, koder, ši-cu in mnoge druge. Na začetku razvoja bolezni pride do majhnih vozličastih zadebelitev, ki se ob napredovanju bolezni povečajo in združijo ter povzročijo uvijanje zaklopke ter posledično slabo tesnjenje robov, kar vodi v regurgitacijo krvi (Markby in sod., 2017). Z analizo spremenjenih zaklopk so ugotovili akumulacijo glikozaminoglikanov, predvsem hialuronske kisline v ekstracelularnem matriksu, najpogosteje mitralne zaklopke, redkeje v trikuspidalni in aortni zaklopki. Pogosto najdemo pri psih tudi mikroskopsko majhne intramuralne miokardialne infarkte, poznane kot koronarna arterijska arterioskleroza majhnih žil (Seki in sod., 1998; Markby in sod., 2017).

Dilatacijska kardiomiopatija je bolezen srčne mišice, ki se najpogosteje pojavlja pri velikih in srednjih pasmah psov (doberman, nemška doga, irski volčji hrt, koker španjel, novofundlandec). Za bolezen je značilna razširitev miokarda in slabša sposobnost krčljivosti levega ali obeh srčnih prekatov. Nastanek DKM pri psih je rezultat mnogih dejavnikov, kot so virusni, nutritivski, toksični in genetski dejavniki. Genetska predispozicija naj bi imela veliko vlogo pri nastanku in razvoju te bolezni pri psih (Stern in Meurs, 2017).

Popuščanje srca pri psih je večinoma končni rezultat primarnega prirojenega ali pridobljenega obolenja srca in/ali ožilja. Pri popuščanju srca gre za patofiziološko stanje kardiovaskularnega sistema, ki nastane, ko srce ne zmore več zadostiti zadostne oskrbe tkiv s krvjo, ki prinaša

kisik (O_2), hranila in elektrolite ter odnaša ogljikov dioksid (CO_2) in presnovke, ali pa to zmore le ob povišanju krvnega tlaka (Strickland, 2008; Scollan in Sisson, 2017). Do popuščanja srca lahko pride po daljšem času, ko govorimo o kroničnem popuščanju srca ali zelo hitro, kar označujemo kot akutno popuščanje srca (Knight, 1995; Strickland, 2008). Najnovejše študije patogeneze popuščanja srca pri ljudeh govorijo o prekomernem nevrohormonalnem delovanju na kardiovaskularni sistem (Johnson, 2014). Do podobnih dognanj so prišli tudi z raziskovanjem patogeneze srčnega popuščanja pri psih in mačkah (Scollan in Sisson, 2017). Srčno popuščanje nastane kot posledica prekomernega izločanja biološko aktivnih substanc, ki škodljivo delujejo na celice kardiovaskularnega sistema, sem spadajo:

- Povečanje aktivnosti adrenergične stimulacije, ki poveča srčno frekvenco, krčljivost miokarda in povzroči vazokonstrikcijo (Scollan in Sisson, 2017).
- Aktivacija renin–angiotenzin–aldosteron osi. Povečan nastanek in izločanje angiotenzina II vzpodbudi adrenalni žlezi, da izločata aldosteron in kateholamine. Kateholamini delujejo na jukstaglomerularne celice v ledvicah, ki izločajo renin. Renin cepi angiotenzinogen do angiotenzina I, iz katerega po delovanju encima angiotenzin konvertaze (ACE) nastane angiotenzin II, ki je najmočnejši vazokonstriktor v organizmu. V končni fazi renin poveča izločanje antiduretičnega hormona, ki poveča prepustnost celic ledvičnih cevok za vodo in sečnino, ter aldosterona, ki poveča absorpcijo natrijevih ionov in bikarbonata, kar se odraža v nastanku kongestije in edemov (Johnson, 2014).
- Povečano izločanje ANP in BNP iz srčnih preddvorov in prekatov (Johnson, 2014; Scollan in Sisson, 2017).
- Sinteza in izločanje adrenomedulina, endotelina ter arginin–vazopresina (Johnson, 2014; Scollan in Sisson, 2017).
- Povečan nastanek ROS v kardiovaskularnem tkivu (Lee in sod., 2011).
- Neuravnoteženo izločanje antiinflamatornih citokinov (IL–10) in proinflamatornih citokinov, kot so $TNF-\alpha$, IL–1, IL–2 in IL–6. Proinflamatorni citokini spremenijo miokardialno funkcijo z več mehanizmi, vključno s stimulacijo hipertrofije in fibroze miokardiocitov ter fibroblastov, zmanjšajo krčljivost miokarda z neposrednim delovanjem na kalcijeve kanalčke in adrenergične receptorje, pospešijo apoptozo in stimulirajo gene, ki so udeleženi v preoblikovanju miokarda. Vloga antiinflamatornih citokinov je zaviranje

delovanja $\text{TNF-}\alpha$, zmanjšanje aktivacije jedrnega faktorja- κB (angl. Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells, $\text{NF-}\kappa\text{B}$) in zadrževanje razvoja makrofagov (Lee in sod., 2011; Gullestad in sod., 2012; Chen in sod., 2014).

Živali z obolenji srca razvrščamo po različnih klasifikacijah. V času naše študije je bila aktualna klasifikacija mednarodnega konzilija za srčna obolenja malih živali (angl. International Small Animal Cardiac Health Council, ISACHC), ki razdeli bolne živali v tri stopnje. V prvo stopnjo ISACHC I spadajo psi s potrjeno boleznijo srca brez znakov srčnega popuščanja. ISACHC I ima še 2 podstopnji: ISACHC I/A in ISACHC I/B. V I/A so psi, pri katerih še niso nastopili kompenzatorni mehanizmi, kot sta hipertrofija sten prekatov ali dilatacija votlin, v I/B pa že nastopijo kompenzatorne spremembe. V drugo stopnjo ISACHC II spadajo živali s potrjeno kardiovaskularno boleznijo in blagimi do zmernimi znaki srčnega popuščanja v mirovanju ali pri manjšem telesnem naporu. Pri tej stopnji se že pojavljajo znaki srčnega popuščanja z zastojem tekočin v tkivih. V tretjo stopnjo ISACHC III, ki ima prav tako 2 podstopnji, ISACHC III/A in ISACHC III/B, spadajo živali z znaki hudega srčnega popuščanja, kardiogenim šokom ter znaki dekompenzacije (Fox in sod., 1999).

Zdravljenje srčnega popuščanja je odvisno od patofiziologije in napredovalosti popuščanja srca. Uporabljamo diuretike (furosemid, torasemid, spironolakton), ACE inhibitorje (ramipril, enalapril, benazepril), inodilatatorje (pimobendan) in v primeru sočasnih aritmij tudi digoksin, blokatorje kalcijevih kanalčkov (diltiazem) ali selektivne blokatorje β adrenergičnih receptorjev (atenolol, sotalol, propranolol, karvedilol) (Strickland, 2008).

2.2 NATRIURETIČNI PEPTID TIP A

Natriuretični peptid tipa B sestavlja 32 aminokislin. Pri človeku nastaja v srčnih prekatih, manjšo koncentracijo pa so ugotovili tudi v srčnih preddvorih in možganih (Levin in sod., 1998). Hormon se v prekatih ne shranjuje, temveč se v večjih koncentracijah izloča iz hipertrofiranih prekatov, in sicer ob disfunkciji prekatov in ob drugih patofizioloških stanjih, ki povečajo pritisk na steno prekatov (Collinson, 2005). Natriuretični peptid tipa B v organizmu deluje na natriurezo, diurezo in uravnavanje krvnega tlaka (predvsem z vazodilatacijo arterij).

Izločanje hormona vzpodbujajo tudi drugi hormoni in nevrottransmitorji, kot so endotelin, arginin–vazopresin in kateholamini. Antagonizira učinke renin–angiotenzin–aldosteron osi in simpatično živčevje perifernega ter centralnega živčnega sistema (Levin in sod., 1998; Collinson, 2005; Mair, 2008). V krvožilju krožita BNP, ki je biološko aktiven in ni vezan na prenašalni plazemski protein, ter neaktiven NT–proBNP, v razmerju 1:1. Za laboratorijsko diagnostiko je primernejši NT–proBNP, saj je v plazmi "*in vitro*" dlje časa obstojen (razpolovna doba 60 minut) v primerjavi z BNP (razpolovna doba 20 minut). Zaradi teh lastnosti in patofiziološkega nastajanja ter izločanja je NT–proBNP zanesljiv pokazatelj popuščanja srca (Collinson, 2005; Mair, 2008; Potter, 2011). Razpolovna doba BNP psa je krajša in znaša približno 90 sekund (Boswood in sod., 2008). V urgentni humani medicini je koncentracija NT–proBNP v krvi dober pokazatelj, ali je vzrok akutne dispneje kardiovaskularna bolezen ali bolezen respiratornega sistema. Pri dispneji zaradi respiratornih bolezni je koncentracija NT–proBNP večinoma v mejah normalnih vrednosti, pri popuščanju srca pa se koncentracija v krvi znatno poviša (Thygesen in sod., 2012). Določanje koncentracije BNP ali NT–proBNP lahko uporabimo pri diferencialni diagnostiki kašlja in akutne dispneje tudi pri psih. Psi z boleznijo respiratornega sistema imajo normalno koncentracijo BNP (DeFrancesco in sod., 2007) ali NT–proBNP (Boswood in sod., 2008) v krvi v primerjavi s psi, ki obolijo za kardiovaskularno boleznijo.

DeFrancesco s sodelavci (2007) je ugotovila, da imajo psi z MDZ značilno nižjo plazemsko koncentracijo BNP v primerjavi s psi, obolelimi z DKM. Ugotovili so tudi, da se plazemska koncentracija BNP značilno povečuje s stopnjo popuščanja srca po ISACHC klasifikaciji. Oyama s sodelavci (2008) je proučeval, ali je serumska koncentracija NT–proBNP povečana pri psih z MDZ in DKM ter ali se koncentracija NT–proBNP povečuje s stopnjo napredovalosti bolezni. Ugotovili so, da imajo psi s kardiovaskularno boleznijo značilno povišano koncentracijo NT–proBNP v krvi v primerjavi z zdravimi psi in da je koncentracija NT–proBNP povečana pri psih, uvrščenih v ISACHC II in III stopnjo. Ugotovili so tudi, da koncentracija NT–proBNP višja od 445 pmol/L v serumu s 83 % občutljivostjo in 90 % specifičnostjo determinira bolezen srca pri psih. Zdravi psi so imeli mediano serumsko koncentracijo NT–proBNP 290 pmol/L. Psi z MDZ so imeli nižjo serumsko koncentracijo NT–proBNP (mediana 1188 pmol/L) v primerjavi s psi z DKM (mediana 1748 pmol/L), vendar

razlika ni bila značilna. Psi v prvi stopnji popuščanja srca so imeli mediano koncentracijo NT-proBNP 618 pmol/L, v drugi stopnji 2252 pmol/L in v tretji stopnji 2279 pmol/L.

Serres s sodelavci (2009) je ugotovil, da se plazemska koncentracija NT-proBNP povečuje s stopnjo napredovalosti MDZ in da je višja koncentracija NT-proBNP v krvi skupaj s klinično sliko in ehokardiografskimi meritvami napovednik slabšega izida srčnega obolenja pri psih. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Moesgaard s sodelavci (2011) ter Verk s sodelavci (2017), ki so ugotovili značilno višjo plazemsko koncentracijo NT-proBNP pri psih s popuščanjem srca in zviševanje koncentracije z napredovanjem srčnega popuščanja. Koncentracija NT-proBNP v krvi pri zdravih psih se ne razlikuje glede na starost, spol, reprodukcijski status in telesno maso (Boswood in sod., 2008; Oyama in sod., 2008), kot se je to izkazalo pri ljudeh (Passino in sod., 2008). Ugotovili so, da imajo zdravi psi čistokrvnih pasem (nemška doga ($n = 4$), zlati prinašalec ($n = 4$) ter 13 drugih pasem) značilno višje koncentracije NT-proBNP v primerjavi z zdravimi mešanci ($n = 13$) (Oyama in sod., 2008).

Visoki koncentraciji sečnine in kreatinina so v povezavi z visoko koncentracijo NT-proBNP v krvi tako pri ljudeh (Passino in sod., 2008) kot psih (Boswood in sod., 2008), tako da je delovanje ledvic pomemben dejavnik v interpretaciji koncentracije NT-proBNP.

Ugotovljena je tudi močno značilna povezava med visokimi koncentracijami BNP, TNF- α ter IL-6 pri ljudeh s popuščanjem srca zaradi kardiomiopatij, kar nakazuje na tesno povezavo med endokrino aktivnostjo srca in vnetnimi procesi v miokardu (Emdin in sod., 2004).

2.3 REAKTIVNE KISI KOVE ZVRSTI (ROS)

V sredini dvajsetega stoletja so kemiki in raziskovalci prepoznali majhne kemijske komponente, ki so bile zaradi svojega kemijskega delovanja odgovorne za poškodbe celic. Poimenovali so jih reaktivne kisikove zvrsti (Dhalla in sod., 2000; Kohen in Nyska, 2002). To so izjemno reaktivni in nestabilni stranski produkti presnove kisika v živem organizmu, ki se neprestano proizvajajo pod fiziološkimi ter bolezenskimi pogoji (endogeni ROS) ali pa pridejo celice z njimi v stik preko zunanjih vplivov, okolja ali hrane (eksogeni ROS). Široka skupina ROS zajema proste kisikove radikale in neradikalske reaktivne kisikove spojine

(Tabela 1), ki v visokih koncentracijah povzročajo oksidativne poškodbe pomembnih bioloških molekul, ki sestavljajo celico, kot so lipidi, beljakovine in molekule deoksiribonukleinske kisline (DNA), kar privede do celične disfunkcije ali smrti (Giordano, 2005; Valko in sod., 2007). Reaktivne kisikove zvrsti v organizmu ne povzročajo samo škode, ampak imajo tudi nepogrešljivo vlogo pri uravnavanju vnetnega odziva (fagocitozi), uravnavanju vazodilatacije in aktivnosti transkripcijskih faktorjev NF- κ B ter aktivatorskega proteina 1 (AP-1). Tako so nizke koncentracije ROS pomembne za obrambo pred patogenimi mikrobi, za intracelularno signaliziranje, aktivacijo transkripcije, proliferacijo, apoptozo in kontrolo celičnega redoks potenciala. Celični redoks potencial je posledica ravnotežja med oksidanti (ROS) in reducenti (antioksidanti) (Dhalla in sod., 2000; Kohen in Nyska, 2002; Giordano, 2005; Valko in sod., 2007).

Kardiomiociti za svoje nemoteno delovanje potrebujejo neprestano dobavo kisika (O_2), saj spadajo med najbolj presnovno aktivne celice v organizmu. Srce sesalcev za normalno delovanje porabi med 8–15 mL O_2 /min/100 g tkiva. Ob fizični aktivnosti lahko ta poraba naraste na 70 mL/min/100 g tkiva. Ob tako veliki presnovni aktivnosti kot stranski produkt njihove presnove nastajajo večje količine ROS (Giordano, 2005).

Tabela 1: Najpogostejši in najpomembnejši predstavniki ROS, ki nastajajo v organizmu (Dhalla in sod., 2000; Kohen in Nyska, 2002; Giordano, 2005)

Table 1: The most important ROS in living organism (Dhalla et al., 2000; Kohen and Nyska, 2002; Giordano, 2005)

KISIKOVI PROSTI RADIKALI	Formula	NERADIKALSKI KISIKOVI DERIVATI	Formula
Kisik (bi-radikal)	$O_2^{\bullet\bullet}$	Vodikov peroksid	H_2O_2
Superoksid	$O_2^{\bullet-}$	Organski peroksid	ROOH
Hidroksil	$\bullet OH$	Hipoklorna kislina	HOCl
Hidroperoksil	$HO_2^{\bullet}$	Ozon	O_3
Peroksil	$ROO^{\bullet}$	Aldehidi	HCOR
Alkoksil	$RO^{\bullet}$	Singletni kisik	1O_2
Dušikov oksid	$NO^{\bullet}$	Peroksinitrit	ONOOH
Dušikov dioksid	$NO_2^{\bullet}$		
Triklorometil	$CCl_3^{\bullet}$		

Superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$) je reducirana oblika molekule kisika in ima različne lastnosti, odvisno od okolja in pH vrednosti. Pri nizki pH vrednosti se pojavlja v protonirani obliki kot hidroperoksilni radikal ($HO_2^{\bullet}$). Ta pri fiziološki pH vrednosti disociira, pri čemer nastaja $O_2^{\bullet-}$ (Halliwell in Cross, 1994; Kohen in Nyska, 2002). Večina $O_2^{\bullet-}$ nastane v mitohondrijski elektronski verigi, lahko pa tudi kot stranski produkt kemičnih reakcij oksidacije kateholaminov in aktivacije arahidonske kisline, kjer pride do redukcije O_2 (Ames in sod., 1993).

Vodikov peroksid (H_2O_2), ki v največji meri nastaja v peroksisomih, je šibak oksidant in šibak reducent ter je v odsotnosti prehodnih kovinskih ionov relativno stabilen. V vodnih raztopinah poteka reakcija dismutacije, katalizirana s SOD, pri čemer nastajata H_2O_2 in O_2 (Gutteridge, 1994; Dhalla in sod., 2000). Vodikov peroksid lahko povzroča celične poškodbe pri razmeroma nizkih koncentracijah. V vodni raztopini z lahkoto prodira skozi biološke membrane. Njegovo uničujoče delovanje lahko razdelimo na neposredno aktivnost, s katero neposredno poškoduje molekule, kot so nukleinske kisline in lipidi, ter inaktivira encime. Pri posredni aktivnosti H_2O_2 služi kot vir za nastanek novih ROS, kot so hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$) in hipoklorna kislina ($HOCl$) (Kohen in Nyska, 2002).

Hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$) je najbolj reaktiven izmed ROS, z zelo kratko razpolovno dobo in takoj reagira skoraj z vsako organsko in anorgansko molekulo v bližini (Kohen in Nyska, 2002). V organizmu nastaja na več načinov: večstopenjsko v Fentonovi reakciji, ki jo katalizirajo ioni kovin prehoda, predvsem železovi (Fe^{2+} , Fe^{3+}) in bakrovi (Cu^{2+}) ioni (Halliwell in Cross, 1994; Dhalla in sod., 2000), pri visoko energijski ionizaciji vode oziroma radiolizi (Gutteridge, 1994; Dhalla in sod., 2000), z reakcijo $O_2^{\bullet-}$ s hipoklorno kislino (Halliwell in Gutteridge, 1999) ter v Haber–Weiss reakciji, kjer nastane $^{\bullet}OH$ z interakcijo $O_2^{\bullet-}$ in H_2O_2 (Dhalla in sod., 2000).

Dušikov oksid ($NO^{\bullet}$) se tvori iz amino kisline L–arginin preko reakcije z encimom sintaza dušikovega oksida (angl. Nitric Oxide Synthase, NOS), ki omogoči, da se L–arginin konvertira v dušikov oksid in L–citrulin, kar povzroči sproščanje gladkih mišic v žilnem epiteliju in predstavlja pomembno vlogo pri uravnavanju krvnega pritiska (Halliwell in Gutteridge, 1999; Kohen in Nyska, 2002). Ena izmed najpomembnejših reakcij, ki v

fizioloških pogojih poteka v organizmu, je reakcija med $O_2^{\bullet-}$ in $NO^{\bullet}$, pri kateri nastane peroksinitrit. Ta reakcija pomaga ohranjati ravnotežje med $O_2^{\bullet-}$ in drugimi ROS v telesu ter ohranja celični redoks potencial (Kohen in Nyska, 2002). V pogojih oksidativnega stresa lahko $NO^{\bullet}$ reagira z molekularnim kisikom, pri čemer se tvori radikal dušikovega dioksida ($NO_2^{\bullet}$), ki lahko povzroči lipidno peroksidacijo (Dhalla in sod., 2000). Povišane vrednosti peroksinitrita lahko povzročijo s citokini povzročeno poslabšanje krčljivosti miokarda z inaktivacijo encima Ca^{2+} – ATPaze v plazmalemi (angl. Plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA), ki je transportni protein v plazma membrani in omogoča prehod Ca^{2+} iz celice ter tako posledično spremeni homeostazo Ca^{2+} v kardiomiocitih (Ferdinandy in sod., 2000).

Glavni viri nastanka ROS v kardiovaskularnem sistemu in tudi drugih organskih sistemih so:

- Mitohondriji, kjer pride tudi pod normalnimi pogoji do nastanka $O_2^{\bullet-}$ (približno 1 do 2 %), pri nastajanju energetsko bogate molekule adenzintrifosfata (ATP) v biokemičnem procesu dihalne verige na kompleksu I (nikotinamidadenin dinukleotid (NADH) dehidrogenaza) in kompleksu III (ubikion–citokrom c reduktaza), ki poteka v notranji membrani mitohondrijev. V bolezenskih pogojih pride do povečanega nastajanja $O_2^{\bullet-}$ in uhajanja elektronov intracelularno ter ekstracelularno, kjer se vežejo na različne molekule, kot so lipidi, proteini ali nukleinske kisline in povzročajo njihove poškodbe (Byrne in sod., 2003; Lakshmi in sod., 2009).
- Reakcije z encimi nikotinamidadenin dinukleotidfosfat (NADPH) oksidazami, ki se prvenstveno nahajajo v granulah nevtrofilnih granulocitov, saj ti potrebujejo ROS za proces fagocitoze. Nikotinamidadenin dinukleotidfosfat oksidaza se nahaja tudi v endoteliju ožilja, fibroblastih, kardiomiocitih in celicah gladke mišičnine ožilja (Byrne in sod., 2003). Aktivnost NADPH oksidaze v kardiomiocitih se poveča ob delovanju angiotenzina II, rastnih faktorjev (trombocitni rastni faktor (angl. Platelet–Derived Growth Factor, PDGF), transformirajočega ravnega faktorja β (angl. Transforming Growth Factor Beta 1, TGF- β), citokinov (TNF- α , IL-1 β), endotelina 1, α adrenergičnih agonistov in mehničnega stresa, kar privede do povečanega nastanka H_2O_2 ter $O_2^{\bullet-}$ (Griendling in sod., 2000; Seshiah in sod., 2002; Lakshmi in sod., 2009).
- Aktivacija encimov NOS, ksantin oksidaze, ciklooksigenaze, lipooksigenaze in citokroma P450. Vsi ti encimi so prepoznani kot vir ROS v ožilju (Lakshmi in sod., 2009).

- Avtooksidacija kateholaminov (Lakshmi in sod., 2009).
- Patofiziološka stanja različnih bolezni, kot so rakava obolenja, kardiovaskularne bolezni, vnetja, sladkorna bolezen, ledvična odpoved in druga bolezenska stanja (Lakshmi in sod., 2009).

Najmočnejši eksogeni viri nastanka ROS, predvsem $^1\text{O}_2$, H_2O_2 in $\text{O}_2^{\bullet-}$, je γ -sevanje in tudi UV-C (<290 nm) (ultravijolično sevanje C), UV-B (290–320 nm) (ultravijolično sevanje B) in UV-A (320–400 nm) sevanje (ultravijolično sevanje A) (Gutteridge, 1994; Singal in sod., 1998; Mak in Newton, 2001; Kohen in Nyska, 2002; Giordano, 2005; Valko in sod., 2007).

2.4 OKSIDATIVNI STRES

Pojem oksidativni stres je leta 1985 prvi uvedel in opisal Helmut Sies (Sies, 1985). Porušenje ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi vodi v stanje oksidativnega stresa. Oksidativni stres vključuje vsa stanja, v katerih se koncentracija ROS v organizmu poveča in/ali antioksidantni obrambni mehanizem zmanjša, kar vodi v porušenje ravnovesja med ROS in antioksidantnim obrambnim mehanizmom v telesu. Oksidativni status je spremenljiv in se lahko spremeni ob vplivu različnih dejavnikov (Halliwell in Gutteridge, 2007). V normalnih fizioloških razmerah je ravnovesje med oksidanti in antioksidanti blago nagnjeno v korist oksidantov, kar omogoča neprestani blag oksidativni stres. To pomeni, da je v organizmu stalno prisotna manjša količina ROS, ki se izogne antioksidantni zaščiti in povzroči oksidativne poškodbe bioloških molekul. Zaščitni antioksidantni mehanizmi so energetsko potratni, če se aktivirajo za daljši čas, tako bi popolna preprečitev in popravo oksidativnih celičnih poškodb od organizma zahtevala preveč energije. Zmanjšana sposobnost antioksidantnega zaščitnega in popravilnega mehanizma bioloških molekul se tako pokaže v staranju organizma ter razvoju bolezni (Poljšak in sod., 2013). Nastanek povečanega oksidativnega stresa lahko pripišemo povečani tvorbi ROS in/ali zmanjšanju antioksidantne zaščite. Vzroki za nastanek oksidativnega stresa so lahko eksogeni dejavniki, kamor štejemo ionizirajoča sevanja, onesnaženost zraka s prašnimi delci, kajenje in podobno ali endogeni dejavniki, kot so različna vnetja, presnova, puščanje elektronov iz dihalne verige v

mitohondrijih ter mnogi drugi. Vzroke za zmanjšano antioksidantno zaščito pa lahko pripišemo zmanjšanju vnosa eksogenih antioksidatov, kot sta vitamina C in E, CoQ₁₀, selen in drugi ter zmanjšane biološke uporabnosti in endogene sinteze antioksidantnih encimov v organizmu (Mravljak, 2015). Oksidativni stres povezujejo s patogenezo mnogih bolezni, kot so kardiovaskularne bolezni, sladkorna bolezen, bolezni ledvic, rakava obolenja in s procesom staranja (Ames in sod., 1993; Dhalla in sod., 2000; Pham–Huy in sod., 2008; Lakshmi in sod., 2009).

2.4.1 Lipidna peroksidacija in malondialdehid (MDA)

V stanju oksidativnega stresa so prve tarče delovanja ROS najpogostejše lipidne membrane celic in celičnih organelov. Vse celične lipidne membrane so izjemno občutljive na oksidacijo, še posebej zaradi visoke koncentracije večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Oksidativno poškodbo lipidov imenujemo lipidna peroksidacija, ki poteka v treh fazah. V prvi, iniciacijski fazi kisikov reaktivni metabolit odvzame vodikov atom metilenski skupini lipida. Na prosto vez radikala maščobne kisline se veže 1 elektron, kar stabilizira molekulo maščobne kisline. V drugi fazi nastane prosti lipidni radikal (ROO[•]). Iz prostega lipidnega radikala nastane lipidni hidroperoksid in v nadaljnjih kemičnih reakcijah nastanejo različni aldehidi, kot so MDA, propanal, heksanal in 4–hidroksinonenal (4–HNE), izoprostani, konjugirani dieni, lipidni hidroperoksidi ter mnogi drugi. V tretji fazi nastali radikal reagira z drugim ROS ali antioksidantom, ki ga nevtralizira. Že ena sama začetna iniciacijska faza lipidne peroksidacije lahko povzroči verižno reakcijo vseh večkrat nenasičenih maščobnih kislin v celični membrani (Kohen in Nyska, 2002; Dotan in sod., 2004; Ho in sod., 2013; Ayala in sod., 2014).

Malondialdehid naj bi bil najbolj mutagen produkt lipidne peroksidacije, medtem ko naj bi bil 4–HNE najbolj toksičen za celice (Ayala in sod., 2014).

Plazemska ali serumska koncentracija MDA je najpogostejše uporabljen in preučen posredni pokazatelj oksidativnega stresa tako v humanih (Mak in Newton, 2001) kot tudi živalskih študijah kardiovaskularnih bolezni (Ayala in sod., 2014). Hipoteze nastanka MDA zajemajo

encimsko in neencimsko pot. Po encimski poti MDA nastane kot stranski produkt pri sintezi tromboksana A₂. Pri neencimskem nastanku pa se MDA tvori pri lipidni peroksidaciji (Giera in sod., 2012; Ayala in sod., 2014). Malondialdehid lahko nastaja tudi pri razgradnji različnih nelipidnih molekul, vključno z beljakovinami, ogljikovimi hidrati, DNA molekulami in žolčnimi pigmenti. Iz telesa se izloča preko urina, krvi in z drugimi telesnimi tekočinami (Gutteridge, 1994; Mak in Newton, 2001).

Starost živali naj bi vplivala na koncentracijo serumskega MDA, saj so ugotovili, da imajo starejši psi, samci pasme beagle (stari več kot 9 let) višje bazalne serumske koncentracije MDA v primerjavi z mladimi psi (stari manj kot 1 leto). Te razlike pri psih niso ugotovili (Vajdovich in sod., 1997). Zdravi odrasli psi mešanci imajo značilno višjo koncentracijo MDA kot odrasle psice (Todorova in sod., 2005). Reimann in sodelavci (2017) niso ugotovili vpliva spola in starosti na koncentracijo MDA pri psih z MDZ ter zdravih psih.

2.5 ANTIOKSIDANTNI SISTEM

Človeški in živalski organizem imata več celičnih obrambnih mehanizmov, ki uravnavajo nivo ROS in tako preprečujejo njihove škodljive učinke na celice ter popravljajo poškodbe na bioloških makromolekulah. V širšem smislu govorimo o primarnem, sekundarnem in terciarnem obrambnem antioksidantnem mehanizmu. Primarni obrambni mehanizmi preprečujejo nastanek ROS, sekundarni obrambni mehanizmi omogočijo nevtralizacijo ROS, terciarni obrambni mehanizmi pa omogočijo popravilo morebitnih oksidativnih poškodb zaradi delovanja ROS na celične molekule (Halliwell in Gutteridge, 2007; Kirschvink in sod., 2008; Osredkar, 2012). Najpomembnejšo vlogo pri kataboliziranju ROS in s tem zmanjševanju škodljivih vplivov na biološke molekule ima endogeni antioksidantni sistem, ki zajema encimske ter neencimske antioksidante. Encimski antioksidanti so: katalaza, GPX, SOD, glutation reduktaza in tioredoksin reduktaza. Neencimski antioksidanti so: glutation (angl. Glutathione, GSH), tioredoksin, vitamin E, vitamin C, β -karoten, CoQ₁₀, lipoična kislina, selen, sečna kislina, albumin, bilirubin in mnogi drugi. Druga linija antioksidantne obrambe organizma je eksogeni antioksidantni sistem, ki predstavlja antioksidante, ki jih žival

zaužije s hrano ali prehranskimi dodatki (Gutteridge, 1994; Halliwell in Cross, 1994; Mates, 2000; Giordano, 2005; Valko in sod., 2007).

2.5.1 Vitamin E

Vitamin E ali α -tokoferol je najmočnejši naravni lipofilni neencimski antioksidant, ki ga sintetizirajo rastline ter cianobakterije, in ga morajo živali in ljudje zaužiti s hrano. Spada v veliko skupino tokoferolnih antioksidantov. Izmed vseh je najbolj aktivna formacija α -tokoferola. Tokoferolni antioksidanti v organizmu delujejo tako, da reducirajo $\text{ROO}^\bullet$ radikale, sami pa se pretvorijo v tokoferilne radikale (Kohen in Nyska, 2002). S tem preprečujejo verižno reakcijo lipidne peroksidacije večkrat nenasičenih maščobnih kislin celičnih membran v citosolu in v ekstracelularnem področju (Dhalla in sod., 2000; Kohen in Nyska, 2002). Tokoferilni radikal se lahko ponovno pretvori v bioaktivno formacijo α -tokoferola s pomočjo drugih antioksidantov, kot so vitamin C (askorbinska kislina), GSH in CoQ_{10} (Valko in sod., 2007).

Vitamin E se shranjuje v maščobnem tkivu kot depo in se izloča ob povečanih potrebah organizma (Rizvi in sod., 2014).

Pri zdravih labradorcih so ugotovili, da se plazemska koncentracija vitamina E značilno znižuje s staranjem, med samci in samicami pa značilnih razlik niso ugotovili (Stowe in sod., 2006). Reimann s sodelavci (2017) je proučevala koncentracijo vitamina E pri zdravih psih in psih z MDZ. Ugotovili so, da spol in starost ne vplivata na koncentracijo vitamina E, značilno pa na koncentracijo vitamina E vpliva telesna kondicija živali (ocena telesne kondicije (angl. Body Condition Score, BCS)). Ugotovili so, da imajo psi z $\text{BCS} \leq 4$ in BCS 5 značilno nižjo koncentracijo vitamina E kot psi z $\text{BCS} \geq 6$ (kategorizacija BCS je opisana v Prilogi št. 1).

2.5.2 Glutation peroksidaza (GPX)

V skupino glutathion peroksidaz (GPX) spada več sorodnih encimov, ki imajo v aktivnem mestu selenocistein. Ta se v zaporednih reakcijah najprej oksidira in potem reducira. Glutathion peroksidaza katalizira redukcije različnih hidroperoksidov (ROOH , H_2O_2), pri čemer uporablja GSH, ki pri tem prehaja iz reducirane (GSH) v oksidirano obliko (GSSG) (Ursini in sod., 1995; Singal in sod., 1998; Artur, 2000; Mates, 2000; Imai in Nakagawa, 2003; Giordano, 2005).

Družino glutathion peroksidaz sestavljajo štiri encimi: (1.) klasična celična GPX ali GPX1, ki se nahaja v citoplazmi (70 %) in mitohondrijih (30 %) večine tkiv, največ pa jo je v eritrocitih, ledvicah in jetrih (Mates, 1999); (2.) gastrointestinalna GPX ali GPX2, ki se nahaja v citoplazmi celic prebavnega trakta pri miših (Chu in sod., 1993) in v celicah jeter in širokega črevesa pri ljudeh (Imai in Nakagawa, 2003); (3.) plazemska GPX ali GPX3 je ekstracelularni encim, katere glavni vir so ledvica (Mates, 1999; Artur, 2000) in (4.) fosfolipid hidroperoksid GPX (GPX4 ali PH-GPX), ki se nahaja v mitohondrijih, citoplazmi in jedrni ter celični membrani. Slednja ima ključno vlogo pri zaščiti membran pred lipidno peroksidacijo, saj neposredno reducira hidroperokside fosfolipidov, maščobnih kislin in holesterola v peroksidiranih membranah in oksidiranih lipoproteinih (Chu in sod., 1993; Artur, 2000; Imai in Nakagawa, 2003).

Starejše psice pasme beagle imajo značilno višje aktivnosti GPX v primerjavi z mladimi. Te razlike pa niso ugotovili med starimi in mladimi psi moškega spola (Vajdovich in sod., 1997). Tomsič s sodelavci (2016) je ugotovila, da spol in starost zdravih psov ne vplivata značilno na aktivnost GPX ter koncentracijo celokupne antioksidantne kapacitete (angl. Total Antioxidant Capacity, TAC) in da starost psa značilno vpliva na aktivnost SOD. Nasprotno so dokazali Stowe in sodelavci (2006), ki so ugotovili, da se s starostjo povečuje aktivnost GPX v polni krvi pri zdravih labradorcih.

2.6 VNETJE IN KARDIOVASKULARNE BOLEZNI

Vnetje je zapleten kompleks biokemičnih in celičnih mehanizmov, katerih glavna vloga je zaščita organizma, izolacija in odstranitev povzročitelvenega dejavnika ter popravilo poškodovanega tkiva. Poznamo akutno in kronično vnetje. Povzročitelje vnetja razdelimo na:

- endogene povzročitelje:
 - novonastali antigeni iz degeneriranih, displastičnih ali neoplastičnih celic
 - preobčutljivostne reakcije
- eksogene povzročitelje:
 - mikrobi
 - tuja telesa
 - mehanski dražljaji – travma
 - fizikalni dražljaji – toplotne poškodbe, hlad, itd.
 - kemični dražljaji – jedke snovi, strupi
 - ishemija.

Faze akutnega vnetja:

1. faza: tekočinska ali eksudativna faza akutnega vnetja, pri kateri pride do dilatacije arteriol in kapilar na mestu vnetja, kar povzroči delovanje dušikovega oksida (NO), histamina, prostaglandinov, levkotrienov ter drugih mediatorjev vnetja. Nadalje pride do mikrovaskularne eksudacije elektrolitov in tekočin na mesto vnetja zaradi spremenjenih stičnih kompleksov endotelne celice, kar povzroči delovanje vazoaktivnih aminov, komplekta (C3a, C5a), bradikinin, levkotrienov ter aktivacijskega faktorja trombocitov (angl. Platelet-Activating Factor, PAF). Ob tem pride do aktivacije endotelialnih in perivaskularnih celic ter nastanka plazemskih proteinov akutne faze vnetja, kamor spadajo citokini in kemokini, ki uravnavajo izražanje receptorjev za vnetne posrednike ter adhezijske molekule.

2. faza: celična faza akutnega vnetja, kjer pride do prihoda levkocitov na podlagi kemotaktičnega gradienta. Prvi pridejo na mesto vnetja nevtrofilni granulociti. Kemokini in citokini vplivajo na proces premika levkocitov s prilagajanjem izražanja adhezijskih molekul

na njihovi površini (selektini, integrini, imunoglobulini). Nevtrofilni granulociti pridejo tudi na področja akutne tkivne nekroze, ki se pojavi pri ishemiji, infarktih in nekrotičnih področjih tumorjev. Interlevkin-1, IL-3, TNF- α , granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (angl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) in granulocitne/makrofagne kolonije stimulirajoči faktor (angl. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) povečajo sproščanje nevtrofilnih granulocitov iz kostnega mozga in pospešijo granulopoezo v 2 do 4 dneh. Eozinofilni granulociti pridejo na področje vnetja kot odziv na prisotne eozinofilne kemoatraktante, ki so prisotni pri alergijskih in parazitarnih boleznih ter tudi izločajo citokine (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 in IL-16), GM-CSF, TGF in kemokine. Tudi monociti pridejo na področje akutnega vnetja, vendar se največkrat pojavijo v večjem številu pri kroničnih vnetjih.

3. faza: ozdravitvena faza akutnega vnetja, kjer pride do celjenja poškodbe z diferenciacijo in regeneracijo epitelnih ter mezenhimskih celic, napolnitve poškodbe z veznim tkivom (brazgotinjenje) in ponovne epitelizacije (Ackermann, 2007).

Če se akutno vnetje ne pozdravi, preide vnetje v kronično obliko (Ackermann, 2007).

Kljub mnogim raziskavam povezava med vnetjem in patogenezo kardiovaskularnih bolezni do sedaj še ni natančno pojasnjena. Zaradi številnih raziskav, s katerimi so ugotovili povečano izločanje in posledično večje koncentracije proinflammatoryh citokinov v krvi pri bolnikih s kardiovaskularnimi boleznimi, največkrat TNF- α , IL-1 ter IL-6 (Levine in sod., 1990; Testa in sod., 1996; Ferrari in sod., 1995; Bozkurt, 2000; Ansari in sod., 2012; Chen in sod., 2014), se pojavljajo mnoge hipoteze, s katerimi poskušajo znanstveniki in raziskovalci razložiti to povezavo. Proinflammatory citokini so udeleženi v procesih miokardialnega preoblikovanja (spremembe v strukturi in funkciji kardiomiocitov ter ekstracelularnega matriksa v srčnem tkivu), inhibicije apoptoze kardiomiocitov, endotelijske disfunkcije in ventrikularne fibroze (Yndestad in sod., 2007; Gullestad in sod., 2012). Najverjetnejše teorije za povečano izločanje citokinov in drugih pokazateljev vnetja pri patogenezi kardiovaskularnih bolezni so:

- Nevrohormonalna aktivacija renin-angiotenzin-aldosteron in adrenergičnega sistema prispeva h kroničnemu vnetju celic kardiovaskularnega sistema. Angiotenzin II aktivira levkocite v obtoku in sodeluje pri njihovem pripetju na aktiviran endotelij žil preko sinteze adhezijskih molekul, kemokinov in inflamatornih citokinov. Na limfocitih in

monocitih so izraženi β adrenergični receptorji, katerih stimulacija lahko povzroči povečano izločanje citokinov pri povečanem izločanju kateholaminov. Pri popuščanju srca se zmanjša parasimpatična stimulacija. Holinergično delovanje naj bi delovalo protivnetno, ker pa je parasimpatična aktivnost pri srčnem popuščanju zmanjšana, se poveča možnost nastanka vnetja (Yndestad in sod., 2007).

- Vnetje kot odgovor na nekrozo srčnega tkiva po miokardialnem infarktu (Anker in von Haehling, 2004).
- Odgovor tkiv na zmanjšano prekrvavljenost oziroma hipoksijo zaradi srčnega popuščanja ali ateroskleroze. Hipoksične celice pospešijo izločanje TNF- α , monocitnega kemoatraktivnega proteina-1 (angl. Monocyte Chemoattractant Protein, MCP-1) in IL-8, ki aktivirajo izločanje NF- κ B, ki nadalje aktivira sintezo in izločanje inflamatornih citokinov (Anker in von Haehling, 2004; Yndestad in sod., 2007; Briasoulis in sod., 2016).
- Povečano izločanje citokinov iz endotelijskih celic in monocitov zaradi delovanja oxLDL (Aukrust in sod., 2005).
- Pri vnetju miokarda bi lahko bili vključeni tudi Tollu podobni receptorji (angl. Toll-Like Receptor, TLR), ki odreagirajo na stik z mikrobi kot tudi molekulami, ki se izločajo iz poškodovanih celic, kot so proteini toplotnega stresa ali ROS. Stimulacija TLR nadalje vodi v aktivacijo NF- κ B, ki nato aktivira izločanje in sintezo inflamatornih citokinov ter kemokinov (Yndestad in sod., 2007).
- Stimulacija inducibilne sintaze dušikovega oksida (angl. Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) v citosolu kardiomiocitov pod vplivom NF- κ B zaradi delovanja lipopolisaharidov (LPS), virusov, UV in γ -sevanja in citokinov (Aukrust in sod., 2005; Halliwell in Gutteridge, 2007; Yndestad in sod., 2007; Briasoulis in sod., 2016).
- Mehanična preobremenitev kardiomiocitov, kar pospeši izločanje citokinov iz več tipov celic (Aukrust in sod., 2005; Yndestad in sod., 2007).
- Morebitni avtoimuni ali infekcijski vzrok za nastanek DKM (Aukrust in sod., 2005).
- Infekcija z določenimi mikrobi (*Chlamydia pneumoniae* in citomegalovirusi), ki naj bi bili udeleženi v patogenezi ateroskleroze (Aukrust in sod., 2005; Yndestad in sod., 2007).
- Spremenjena propustnost edematoznega črevesja povzroči prehod bakterijskih toksinov (najpogosteje endotoksin LPS) iz črevesja v kri, kjer povzročijo produkcijo

proinflammatory citokins iz krvnih monocitov in verjetno tudi iz drugih tkivnih makrofagov (Anker in von Haehling, 2004; Aukrust in sod., 2005; Boswood, 2009).

Kljub vsem naštetim škodljivim učinkom citokinov imajo ti tudi pomembno zaščitno vlogo v kardiovaskularnem sistemu. Tako $\text{TNF-}\alpha$ kot $\text{IL-1}\beta$ aktivirata $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ki deluje ne le na uravnavanje vnetja, temveč tudi na izražanje antiapoptotičnih in citoprotektivnih genov. Interleukin-6 deluje preko podenote svojega receptorja gp130, ki pospešuje hipertrofijo kardiomiocitov (Yndestad in sod., 2007).

2.6.1 C-reaktivni protein (CRP)

C-reaktivni protein (CRP) je protein akutne faze vnetja, ki po molekularni strukturi spada v družino pentraksinov in ga proizvajajo hepatociti kot odgovor na vnetni dražljaj, kot je poškodba tkiva ter/ali okužba. Tako ime je dobil zaradi svoje lastnosti, da reagira s C polisaharidom *Streptococcus pneumoniae*. Molekularna struktura in specifičnost vezave pasjega CRP je zelo podobna človeški, opičji ter kunčji obliki proteina. Z razliko od človeškega CRP je pasji CRP glikoprotein, saj ima glikozilirani dve od petih podenot proteina (Caspi in sod., 1984; Ceron in sod., 2005). C-reaktivni protein se specifično veže z mikrobnimi polisaharidi ali celičnimi fragmenti iz polisaharidov, poškodovanimi deli celičnih membran, apoptotičnimi celicami, ki so prisotne pri vnetju, in tako opsonizira ligande za fagocitozo ter aktivira komplement. Ko različni vnetni dražljaji aktivirajo vnetne celice (makrofagi, granulociti), sprožijo akutni vnetni odgovor, pri katerem se iz vnetnih celic izločajo različni proinflammatory citokini (IL-1 , IL-6 , IL-8 , $\text{TNF-}\alpha$). Pri ljudeh in psih ti citokini, še posebej IL-6 , povzročijo povečano sintezo CRP v jetrih po 4–6 urah. Ko vnetje preneha, doseže koncentracija CRP v krvi vrh v 48 urah po vnetju in se nato vrne na normalne vrednosti v enem do dveh tednih (Hirschfield in Pepys, 2003; Anker in von Haehling, 2004; Ceron in sod., 2005).

Normalna koncentracija CRP v serumu pri psih je okoli 5 mg/L in se poveča pri akutnem vnetju že v nekaj urah do 1000-krat; enako kot pri ljudeh (Caspi in sod., 1984; Hirschfield in Pepys, 2003; Anker in von Haehling, 2004; Ceron in sod., 2005; Cray in sod., 2009).

Koncentracija CRP v serumu se pri psih zviša pri različnih infekcijah (Martínez–Subiela in sod., 2003; Shimada in sod., 2002; Ulutas in sod., 2005), rakavih obolenjih (Cray in sod., 2009), vnetnih boleznih, kot je pankreatitis (Nakamura in sod., 2008), in kardiovaskularnih boleznih (Rush in sod., 2006; Saunders in sod., 2009; Cunningham in sod., 2012; Lukman, 2012; Polizopoulou in sod., 2015; Reimann in sod., 2016).

Spol, pasma in telesna teža psov ne vplivata na serumske koncentracije CRP pri psih (Ceron in sod., 2005; Reimann in sod., 2016). Pri ljudeh so ugotovili, da imajo ženske blago višjo serumsko koncentracijo CRP v primerjavi z moškimi (Hirschfield in Pepys, 2003).

2.6.2 Proinflamatorni citokini

Proinflamatorni citokini so proteinske molekule z relativno nizko molekularno težo (15–30 kDa), ki delujejo v organizmu kot osnovni mediatorji vnetja pri normalnih ali patoloških imunskih odzivih. Vključeni so v celo kaskado reakcij imunskega odziva, ki ga lahko sprožijo endogeni ali eksogeni patogeni. Glavni proinflamatorni citokini pri ljudeh in psih so IL–1, IL–6 in TNF– α , ki so udeleženi v primarnem imunskem odzivu na infekcije in tkivne poškodbe (Ceron in sod., 2005; Ackermann, 2007; Turner in sod., 2014).

2.6.2.1 Interlevkin–6 (IL–6)

Interlevkin–6 je multifunkcionalni polipeptidni proinflamatorni citokin, ki deluje tudi protivnetno (Scheller in sod., 2011). Izločajo ga vse celice z jedrom v srcu kot v drugih tkivih in sodeluje v imunskih ter vnetnih odzivih. Prečno progasta mišičnina je glavni vir sinteze in izločanja tega citokina, prav tako IL–6 izločajo adipociti, gladke mišice tunike medie krvnih

žil, celice žilnega endotelija, makrofagi in ishemični kardiomiociti (Adamopoulos in sod., 2001; Kanda in Takahashi, 2004; Scheller in sod., 2011).

V organizmu IL-6 stimulira diferenciacijo B-limfocitov, aktivira timocite in T-limfocite za diferenciacijo, aktivira makrofage, stimulira hepatocite, da producirajo proteine akutne faze, ter aktivirajo celice ubijalke. Interlevkin-6 se lahko veže na IL-6 receptor (IL-6R) in tudi topni receptor IL-6 (angl. Soluble IL-6 Receptor, sIL-6R) (Kanda in Takahashi, 2004; Turner in sod., 2014).

2.6.2.2 Tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)

Tumor nekrotizirajoči faktor- α je bil prvič opisan leta 1975 in so ga poimenovali kahektin. Glavni vir sinteze in izločanja TNF- α so aktivirani makrofagi in mononuklearne krvne celice (monociti in limfociti). Zadnja dognanja poročajo, da lahko ta proinflammatory citokin proizvajajo tudi druge telesne celice, kot so: endotelijske celice, celice gladke mišičnine žil, kardiomiociti in fibroblasti. Zaradi dejstva, da so intersticijski makrofagi prisotni v skoraj vseh organih, lahko precej splošno govorimo, da lahko TNF- α proizvajajo celice vseh organov v vseh organskih sistemih. Ta proinflammatory citokin učinkuje po vezavi na membranske proteinske receptorje za TNF- α (angl. Tumor Necrosis Factor Receptor, TNFR), ki se nahajajo skoraj na vseh celicah z jedrom. Poznamo dva tipa TNRF, in sicer TNRF 1, ki jih je več in so zaslužni za škodljive učinke TNF- α , in TNFR 2, ki naj bi imeli zaščitno funkcijo v srcu. Oba receptorja se lahko odcepita od celične membrane s proteolizo in preideta v cirkulacijo ter tako nastaneta topna TNRF (angl. Soluble TNRF, sTNRF 1 in sTNRF 2). Oba lahko vežeta TNF- α v cirkulaciji in s tem preprečujeta škodljive (citotoksične) učinke TNF- α na tkiva (Bozkurt, 2000; Adamopoulos in sod., 2001; Anker in von Haehling, 2004).

Tumor nekrotizirajoči faktor- α ima v človeškem in živalskem telesu več vlog in funkcij. Glavna vloga TNF- α je uravnavanje imunskega odgovora. V nizkih koncentracijah TNF- α učinkuje kot parakrini in avtokrini regulator levkocitov ter celic endotelija. Poveča oziroma okrepi kemotakso makrofagov in nevtrofilnih granulocitov, poviša njihovo fagocitno ter

citotoksično aktivnost in spodbuja levkostazo na mestu vnetja s pospešitvijo izražanja znotrajceličnih adhezijskih molekul (angl. Intracellular Adhesion Molecule, ICAMS) ter levkocitnih endotelijskih adhezijskih molekul (angl. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule, ELAMS) (Feldman in sod., 2000). TNF- α in drugi proinflammatory citokini (IL-1 in IL-6) sprožijo akutni vnetni odgovor ter s tem povečajo porabo aminokislin in spremenijo ravnovesje med sintezo ter razpadom proteinov. To pomeni, da povečana koncentracija citokinov v tkivih vpliva na zmanjšano sintezo in povečano porabo proteinov v kardiomiocitih ter drugem mišičnem tkivu (skeletna mišičnina predstavlja skoraj 50 % vse zaloge proteinov v telesu), kar rezultira v razvoju kaheksije (Von Haehling in sod., 2007).

Eden izmed učinkov TNF- α na kardiovaskularni sistem je tudi ta, da deluje negativno inotropno na miokard. Povečane koncentracije encimov iNOS povzročijo povečan nastanek NO, in sicer tako, da se pod vplivom teh encimov intracelularni L-arginin pretvori v NO (z odstranitvijo dušikovega atoma) in L-citrulin. NO aktivira ciklični gvanozinmonofosfat (cGMP), ki je sekundarni obveščevalec in sodeluje pri prevajanju signala v celicah. cGMP naj bi spremenil homeostazo Ca^{2+} v kardiomiocitih in tako vplival na slabšo krčljivost miokarda (Oral in sod., 1995; Kofler in sod., 2005).

2.7 POVEZAVA OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA PRI POPUŠČANJU SRCA

Povečan oksidativni stres je tesno povezan z vnetjem pri ljudeh z različnimi kardiovaskularnimi boleznimi (ateroskleroza, kardiomiopatije, koronarna bolezen in druge bolezni) in popuščanjem srca (White in sod., 2006; Yndestad in sod., 2007; Amir in sod., 2009; Siti in sod., 2015; Briasoulis in sod., 2016). Povečana koncentracija ROS stimulira presnovne poti aktivacije NF- κ B, kar poveča nastanek in izločanje proinflammatory citokinov v kardiovaskularnem sistemu (Yndestad in sod., 2007).

Oksidativne spremembe LDL povzročijo encimi, kot so lipooksigenaze ali delovanje ROS, zaradi česar nastane oxLDL. Oksidirani LDL se pojavi primarno v endoteliju, kjer pride v stik z makrofagi, iz katerih se nato tvorijo penaste celice (morfološko spremenjeni makrofagi in gladkomišične celice žilne stene zaradi obilice maščobnih kapljic v citoplazmi (Starc in Bunc,

2002)), kar vodi v nastanek aterosklerotičnih plakov. Zadrževanje in povečana koncentracija oxLDL v ožilju sproži imunski odziv ter lahko poveča izražanje citokinov iz endotelijskih celic, makrofagov in monocitov. Ta mehanizem je izjemno pomemben pri patogenezi ishemične kardiomiopatije, koronarne bolezni in ateroskleroze (Aukrust in sod., 2005; Faviou in sod., 2005; Ho in sod., 2013).

Pri popuščanju srca lahko hipoksija srčnega tkiva, ki nastane zaradi miokardialnega infarkta ali koronarne bolezni, in prekomerna aktivacija kateholaminov sprožita prekomerno nastajanje ROS v kardiovaskularnem tkivu, katerih povišana koncentracija lahko sproži vnetni odziv z dražljajem za sintezo proinflammatoryh citokinov (TNF- α , IL-1, IL-6). Prav tako predpostavljajo, da naj bi samo vnetje povzročilo povečan oksidativni stres v srčno žilnem sistemu (Bozkurt in sod., 2010; Bouras in sod., 2014).

V povezavo vnetja in oksidativnega stresa v kardiovaskularnem sistemu bi lahko bili vključeni tudi TLR, katerih glavna naloga je obramba organizma pred patogeni. Reagirajo s stikom z mikrobi kot tudi molekulami, ki se izločajo iz poškodovanih celic, kot so proteini toplotnega stresa ali ROS. Stimulacija TLR nadalje vodi v aktivacijo NF- κ B, ki nato aktivira nastanek inflamatornih citokinov (Yndestad in sod., 2007; Briasoulis in sod., 2016).

2.8 RAZISKAVE OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA PRI KARDIOVASKULARNIH BOLEZNIH

2.8.1 Študije oksidativnega stresa pri ljudeh in psih

Vlogo delovanja ROS in posledično oksidativnega stresa v patogenezi srčnih obolenj, kot so koronarna bolezen, bolezni zaklopk, kardiomiopatije ter druge bolezni srca, ki vodijo v popuščanje srca, so preučevali v okviru številnih eksperimentalnih in kliničnih študij pri ljudeh ter laboratorijskih živalih. Pri ljudeh so preučevali povezavo med oksidativnim stresom in različnimi kardiovaskularnimi boleznimi (Dhalla in sod., 2000; Mak in Newton, 2001; Singal in sod., 1998; Byrne in sod., 2003; Tsutsui in sod., 2011; Münzel in sod., 2017). Klinične študije oksidativnega stresa pri pacientih z različnimi kardiovaskularnimi boleznimi

ne potrjujejo le povečane koncentracije pokazateljev oksidativnega stresa, kot so na primer koncentracija MDA, izoprostanov, proteinskih karbonilov in nekaterih drugih (Díaz–Velez in sod., 1996; Ghatak in sod., 1996, Keith in sod., 1998; Yücel in sod., 1998; Serdar in sod., 2001; Castro in sod., 2002; Polidori in sod., 2002; Faviou in sod., 2005; White in sod., 2006; Jawalekar in sod., 2010; Bhat in sod., 2012; Karabacak in sod., 2014; Wojciechowska in sod., 2014), temveč tudi nizek nivo parametrov antioksidatnega statusa, kot so na primer antioksidantni encimi, glutation, vitamina E in C ter drugi (Ghatak in sod., 1996; Yücel in sod., 1998; Castro in sod., 2002; Polidori in sod., 2002; Polidori in sod., 2004).

Prasad s sodelavci (1993) je ugotovil, da ROS ne samo poškodujejo kardiomiocite na izoliranem kunčjem srcu, temveč delujejo tudi negativno inotropno.

Díaz–Velez s sodelavci (1996) je ugotovil, da so plazemske koncentracije MDA pri bolnikih s popuščanjem srca značilno višje v primerjavi z zdravimi ljudmi, vendar se koncentracije MDA ne povečujejo s stopnjo popuščanja srca. Ugotovili so tudi značilno povezavo med visokimi koncentracijami MDA in trajanjem popuščanja srca. Podobne rezultate so pokazali tudi Ghatak s sodelavci (1996) ter White s sodelavci (2006).

Pri bolnikih s srčnim popuščanjem so v primerjavi z zdravimi ljudmi ugotovili značilno višje plazemske koncentracije pokazateljev oksidativnega stresa, MDA in lipidnega peroksida. Koncentracije obeh, MDA in lipidnega peroksida, se značilno povišujejo z napredovanjem srčnega popuščanja (Keith in sod., 1998). Podobne rezultate je dobil Serdar s sodelavci (2001).

Ljudje z DKM v NYHA III in IV stopnji srčnega popuščanja (angl. New York Heart Association (klasifikacija popuščanja srca po NYHA je opisana v Prilogi št. 2 (Raphael in sod., 2007))) imajo značilno višje koncentracije TBARS in značilno nižjo aktivnost eritrocitne SOD v primerjavi z zdravimi ljudmi (Yücel in sod., 1998).

Castro in sodelavci (2002) so določali plazemske koncentracije MDA in aktivnost GPX, SOD ter katalaze pri bolnikih s CHF pred in po zdravljenju srčnega popuščanja. Bolniki s popuščanjem srca so imeli značilno višjo koncentracijo MDA in sočasno nižjo aktivnost GPX v primerjavi z zdravimi ljudmi. Ugotovili so tudi, da imajo bolniki po petih dneh zdravljenja srčnega popuščanja značilno nižjo plazemsko koncentracijo MDA v primerjavi s

koncentracijo pred zdravljenjem, ki pa kljub znižanju ni dosegla normalnih vrednosti. Zdravljenje srčnega popuščanja ni vplivalo na aktivnost GPX, SOD in katalaze. Prav tako niso ugotovili sprememb v aktivnosti SOD in katalaze med bolniki s popuščanjem srca in zdravimi ljudmi.

Bolniki z ishemično boleznijo srca imajo značilno višje serumske koncentracije MDA in proteinskih karbonilov v primerjavi z zdravimi ljudmi (Jawalekar in sod., 2010).

Serumske koncentracije MDA in sečne kisline ter aktivnost SOD so značilno višje pri bolnikih s popuščanjem srca zaradi DKM v primerjavi z zdravimi ljudmi. Sočasno pa niso ugotovili značilnih razlik v koncentraciji MDA med bolniki z DKM po klasifikaciji NYHA I in II v primerjavi z NYHA III in IV stopnji popuščanja srca (Wojciechowska in sod., 2014).

Keith in sodelavci (1998) so ugotavljali aktivnost GPX in plazemsko koncentracijo vitamina E in C pri bolnikih s CHF zaradi ishemične bolezni srca ali DKM ter pri zdravih ljudeh. Ugotovili so, da ni značilnih razlik v aktivnosti GPX in koncentraciji vitamina E med bolniki s CHF ter zdravimi ljudmi. Vrednosti GPX in vitamina E se niso spreminjale z napredovanjem srčnega popuščanja. Zdravi ljudje imajo značilno višje koncentracije vitamina C v primerjavi z bolniki s CHF.

Po dodajanju vitamina E (500 IU α -tokoferola) v 6-ih in 12-ih tednih ni značilnih razlik v koncentracijah MDA, F₂-izoprostanov, vitamina C, vitamina E in aktivnosti GPX pri bolnikih s popuščanjem srca kot posledico ishemične kardiomiopatije glede na koncentracijo izmerjeno pred dodajanjem vitamina E (Keith in sod., 2001).

V serumski koncentraciji vitamina E pri bolnikih s popuščanjem srca zaradi ishemične kardiomiopatije ali DKM ni značilnih razlik v primerjavi z zdravimi ljudmi. Pri ljudeh s popuščanjem srca so bile v primerjavi z zdravimi ljudmi značilno nižje koncentracije vitamina C in β -karotena (de Lorgeril in sod., 2001).

Serdar in sodelavci (2001) niso ugotovili značilnih razlik v plazemski koncentraciji vitamina E med ljudmi s kroničnim popuščanjem srca in zdravimi ljudmi. So pa ugotovili značilno nižje koncentracije vitamina E v NYHA III in IV v primerjavi z NYHA I ter II stopnjo popuščanja srca.

Bolniki s popuščanjem srca imajo značilno višjo koncentracijo MDA in značilno nižjo koncentracijo vitamina E ter vitamina A v primerjavi z zdravimi ljudmi. Ugotovili so tudi, da imajo bolniki v tretji stopnji popuščanja srca (po NYHA klasifikaciji) nižjo plazemsko koncentracijo vitamina A in E v primerjavi z bolniki v drugi stopnji, sočasno pa so imeli bolniki v tretji stopnji popuščanja srca značilno višjo koncentracijo MDA v primerjavi z bolniki v drugi stopnji (Polidori in sod., 2002).

Polidori s sodelavci (2004) so ugotovili značilno višjo plazemsko koncentracijo F2-izoprostanov pri ljudeh s CHF v primerjavi z zdravimi ljudmi, ter da se koncentracija izoprostanov značilno zvišuje z napredovanjem srčnega popuščanja. Ugotovili so tudi značilno znižane plazemske koncentracije vitaminov A, C in E ter aktivnost SOD in GPX pri ljudeh s CHF v primerjavi z zdravimi ljudmi. Plazemski koncentraciji vitaminov A in E sta se značilno zniževali s stopnjo srčnega popuščanja, česar pa niso potrdili za aktivnost GPX in SOD.

Pri več kot 9500 bolnikih, starejših od 55 let s kardiovaskularnimi boleznimi (ateroskleroza, koronarna bolezen in druge) so ugotovili, da dodajanje vitamina E (400 IU dnevno) ne zmanjšuje tveganja napredovanja kardiovaskularnih bolezni, miokardialnih infarktov, kapi ali smrti. Pokazateljev oksidativnega stresa niso merili (Yusuf in sod., 2000). Chae in sodelavci (2012) niso dokazali, da bi 10-letno dodajanje vitamina E (600 IU dnevno) zmanjšalo možnost nastanka in napredovanja popuščanja srca pri zdravih ženskah na začetku študije. Nasprotno pa so Ghatak in sodelavci (1996) dokazali, da dodajanje vitamina E (400 mg/dan 4 tedne) značilno zniža koncentracijo MDA v primerjavi s placebo skupino. Stephens in sodelavci (1996) so ugotovili, da dodajanje vitamina E prepreči nastanek miokardialnih infarktov pri ljudeh z angino pectoris in koronarno aterosklerozo. Salonen in sodelavci (2003) so ugotovili koristi dodajanja kombinacije vitaminov C ter E pri bolnikih s koronarno boleznijo srca, saj dodajanje omenjenih vitaminov upočasni razvoj ateroskleroze pri ljudeh s hiperholesterolemijo. Ugotovili so, da imajo bolniki z dekompenzirano koronarno boleznijo značilno nižjo aktivnost GPX v polni krvi v primerjavi z bolniki s kompenzirano boleznijo. Bolniki z dekompenzirano koronarno boleznijo in nižjimi vrednostmi GPX imajo slabšo možnost preživetja (Blankenberg in sod., 2003).

Cavalca in sodelavci (2013) so določali vrednosti pokazateljev oksidativnega stresa (razmerje med GSH/GSSH v polni krvi in 8-iso-prostaglandin F2 α v urinu) in antioksidantov (plazemska koncentracija vitamina E) pri ljudeh z različnimi kardiovaskularnimi boleznimi (koronarna bolezen, neravmatoidna kalcifikacija aortne zaklopke, bolezen mitralne zaklopke), ki potrebujejo operacijo srca (obvod koronarnih arterij, zamenjava aortne in/ali mitralne zaklopke) in pri zdravih ljudeh. Koncentracije vitamina E so bile značilno nižje, vrednosti obeh pokazateljev oksidativnega stresa pa značilno višje pri bolnikih z obolenjem srca v primerjavi z zdravimi ljudmi.

Pri ljudeh s srčnim popuščanjem so ugotovili, da ima zdravljenje srčnega popuščanja vpliv na pokazatelje oksidativnega stresa, kar posledično lahko nakazuje na antioksidantno delovanje določenih kardioloških zdravil (Weglicki in sod., 1990; Weglicki in sod., 1999; Napoli in sod., 2004; Nakamura in sod., 2011). Beta (β) in α blokatorji adrenergičnih receptorjev (atenolol, sotalol, karvedilol, propranolol, metoprolol) naj bi imeli antioksidantno delovanje, med katerimi naj bi bila propranolol in karvedilol najbolj učinkovita. Predpostavljajo, da je antioksidantno delovanje propranolola bolj povezano z njegovo intrinzično kemično strukturo kot pa z njegovo možnostjo stabilizacije membran ali beta blokade adrenergičnih receptorjev v sinusnem vozlu. Karvedilol naj bi zaviral produkcijo ROS s strani levkocitov (Weglicki in sod., 1999; Packer in sod., 2001; Nakamura in sod., 2011). Z "*in vitro*" študijo so ugotovili antioksidantne lastnosti karvedilola (Rabasseda, 1998). Kukin in sodelavci (1999) so ugotovili, da 6-mesečno zdravljenje z metoprololom ali karvedilolom zmanjša plazemsko koncentracijo pokazatelja lipidne peroksidacije TBARS in izboljša iztisni delež levega prekata (angl. Left Ventricular Ejection Fraction, LVEF) pri ljudeh s kroničnim popuščanjem srca (vzroki: ishemična bolezen srca, idiopatska kardiomiopatija ali bolezen zaklopk). Chin in sodelavci (2003) so ugotavljali, ali ACE inhibitor (lizinopril) in β blokator adrenergičnih receptorjev (karvedilol) pri ljudeh s CHF učinkujeta na pokazatelje oksidativnega stresa, serumske koncentracije lipidnih hidroperoksidov in TAC. Ugotovili so značilno nižje koncentracije lipidnih hidroperoksidov po 3-mesečnem zdravljenju s karvedilolom, česar pa niso ugotovili v skupini zdravljenih z lizinoprilom. Zdravljenje ni imelo učinka na koncentracije TAC v krvi. Pri ljudeh s popuščanjem srca zaradi koronarne bolezni ali idiopatske kardiomiopatije, ki so bili 6 mesecev zdravljeni s karvedilolom, so ugotovili značilno nižjo plazemsko koncentracijo MDA kot pred začetkom jemanja zdravila ter 5 %

izboljšanje LVEF. Sočasno niso ugotovili razlik v aktivnosti katalaze, SOD in GPX pred in po 6 mesecih zdravljenja (Castro in sod., 2005). Po 30-dnevnem zdravljenju z inotropi (milrinon in dobutamin) so ugotovili značilno znižano plazemsko koncentracijo MDA in 8-izoprostanov pri ljudeh s CHF v primerjavi s koncentracijami pred zdravljenjem (White in sod., 2006).

Tudi zdravljenje z antioksidanti in antioksidantnimi vitamini izboljša delovanje kardiovaskularnega sistema. Zdravljenje s C vitaminom naj bi preprečevalo apoptozo endotelnih celic pri bolnikih s CHF (Rössig in sod., 2001). Vitamin E naj bi preprečeval nastanek neusodnih miokardialnih infarktov pri ljudeh z angino pectoris in koronarno aterosklerozo (Stephens in sod., 1996). Kombinacija vitamina C in E upočasni razvoj ateroskleroze pri ljudeh s hiperholesterolemijo (Salonen in sod., 2003). Dodajanje CoQ₁₀ izboljša krčljivost levega prekata pri bolnikih s popuščanjem srca in izboljša funkcijo endotelija brez neželenih učinkov (Belardinelli in sod., 2005; Kumar in sod., 2009).

Prasad s sodelavci (1996) je v eksperimentalni prospektivni študiji raziskoval oksidativni stres pri psih v srčnem popuščanju kot posledico umetno povzročene mitralne regurgitacije. Za določitev oksidativnega stresa so merili koncentracijo MDA in aktivnost antioksidantnih encimov SOD, katalaze in GPX, vse v tkivu levega prekata. Ugotovili so, da se z zmanjšanjem srčne krčljivosti poveča koncentracija MDA v srčnem tkivu, kar kaže na povečano koncentracijo ROS in/ali znižano aktivnost antioksidantnih encimov v srčnem tkivu. Aktivnosti SOD, katalaze in GPX so bile značilno nižje v skupini z mitralno regurgitacijo v primerjavi s kontrolno skupino. Pri psih z mitralno regurgitacijo, ki so dobivali vitamin E, sta bili aktivnost GPX in koncentracija MDA značilno višji kot pri psih, ki niso dobivali vitamina E, aktivnosti SOD in katalaze pa so bile nekoliko nižje, kar je bilo presenetljivo, saj so pričakovali, da bo prišlo do porasta aktivnosti vseh antioksidantnih encimov.

Freemanova s sodelavci (1998a, 1999) je določala antioksidantni status zdravih psov in psov z DKM v različnih stopnjah srčnega popuščanja po NYHA klasifikaciji. Ugotovili so, da so imeli psi z DKM značilno višjo aktivnost eritrocitne GPX v primerjavi z zdravimi psi. Sočasno pa niso ugotovili značilnih razlik v aktivnosti SOD in plazemski koncentraciji vitaminov A, C ter E med zdravimi in obolelimi psi. Višje aktivnosti GPX so predpisali

kompensatornemu antioksidantnemu mehanizmu kot odgovor na povečan oksidativni stres in morebitnim antioksidativnim lastnostim kardioloških zdravil. Leta 1998 so ugotovili tudi značilno povezavo med napreduječo boleznijo in aktivnostjo eritrocitne GPX (Freeman in sod., 1998a). Koncentracija MDA v krvi pri psih z DKM ni bila značilno povišana v primerjavi z zdravimi psi. Plazemska koncentracija vitamina E se je značilno nižala s stopnjo srčnega popuščanja po NYHA klasifikaciji (Freeman in sod., 1999).

Pri psih z eksperimentalno povzročenim popuščanjem srca pride do povečanega nastajanja $O_2^{\bullet-}$ v mitohondrijih kardiomiocitov. V izoliranih mitohondrijih, vzeti iz popuščajočih kardiomiocitov, so ugotovili zmanjšano aktivnost kompleksa I dihalne verige. Tako stanje omogoča večje nastajanje $O_2^{\bullet-}$ v mitohondrijih (določeno z metodo elektronske spinske resonančne spektroskopije, ESR), ki nato uhajajo v intracelularno in ekstracelularno področje ter tam povzročajo nadaljnje oksidativne poškodbe celičnih biomolekul (Ide in sod., 1999).

Na izoliranih kardiomiocitih psov z eksperimentalno povzročeno kardiomiopatijo so ugotovili, da dodajanje alopurinola, ki deluje antioksidantno kot inhibitor encima ksantin oksidaze (encim ki omogoča nastanek $O_2^{\bullet-}$ preko razpada purinov v sečno kislino), izboljša srčno funkcijo. Ugotovili so, da alopurinol zmanjša kontraktilno disfunkcijo levega prekata na kardiomiocitih vzeti iz popuščajočega srca. Na kardiomiocitih zdravih psov dodajanje alupurinola ni vplivalo na kontraktilnost levega prekata (Ukai in sod., 2001).

Freeman in sodelavci (2005) so določali antioksidantni status in pokazatelje oksidativnega stresa pri psih s CHF kot posledico MDZ ali DKM. Za določitev antioksidantnega statusa so določali plazemske koncentracije GSH in GSSG, vitamina E ter C in retinola. Kot pokazatelje oksidativnega stresa so določali plazemsko koncentracijo MDA, F2–izoprostanov ter proteinske karbonile. Psi s CHF so imeli značilno višje koncentracije F2–izoprostanov v plazmi v primerjavi z zdravimi psi, medtem ko se koncentracije MDA in proteinskih karbonilov niso značilno razlikovale med skupinama. Vrednosti GSH in vitamina E so bile značilno nižje pri psih s CHF v primerjavi z zdravimi psi. Nasprotno so bile vrednosti vitamina C značilno višje pri psih s srčnim popuščanjem v primerjavi z zdravimi psi. Vrednosti retinola se med skupinama niso razlikovale.

Ni ugotovljenih sprememb serumske koncentracije vitamina E med psi z MDZ v prvi stopnji popuščanja srca po ISACHC klasifikaciji in zdravimi psi. V to raziskavo niso vključili psov z napredovalim srčnim popuščanjem (Freeman in sod., 2006).

Verk (2010) je ugotovila značilno višjo aktivnost GPX v krvi pri psih s prirojenimi (aortna stenoza) in pridobljenimi (MDZ, DKM) boleznimi srca v tretji stopnji srčnega popuščanja po ISACHC klasifikaciji v primerjavi z zdravimi psi. Aktivnost GPX se ni razlikovala z napredovanjem popuščanja srca.

V pred kratkim objavljeni študiji (Reimann in sod., 2017) so ugotovili, da plazemska koncentracija MDA ni značilno povišana pri psih z MDZ v različnih stopnjah popuščanja srca, prav tako ni razlike med bolnimi in zdravimi psi. Plazemska koncentracija vitamina E se pri psih z različnimi stopnjami popuščanja srca ni spremenila.

2.8.2 Študije vnetja pri ljudeh in psih

Prva spoznanja in ugotovitve, da je lahko sistemsko vnetje povezano s popuščanjem srca, segajo v 50. leta 20. stoletja, ko je Elster s sodelavci (1956) odkril, da je koncentracija CRP v krvi povečana pri ljudeh s CHF.

Z analizami CRP pri ljudeh s kardiovaskularnimi boleznimi so ugotovili, da je smiselno in diagnostično primernejše meriti oziroma določati koncentracijo visoko občutljivega CRP (angl. High sensitivity C-Reactive Protein, hsCRP), saj se lahko s to, bolj občutljivo metodo natančneje in pravilneje izmeri tudi nižje koncentracije CRP, ki jih s starejšimi metodami niso mogli določiti. Koncentracije CRP, ki so prej veljale za normalne, so z meritvami hsCRP pokazale, da so napovedovalec slabše prognoze kardiovaskularnega obolenja tako pri asimptomatskih bolnikih s kardiovaskularno boleznijo (koronarna bolezen, ateroskleroza) kot pri bolnikih s popuščanjem srca (Blankenberg in sod., 2003; Hirschfield in Pepys, 2003; Anand in sod., 2005; Yousuf in sod., 2013; Ostrowska in sod., 2017).

Huang in sodelavci (2004) so ugotovili, da imajo ljudje s CHF kot posledice ishemične bolezni srca, DKM ali bolezni zaklopk, značilno višje koncentracije hsCRP v krvi v

primerjavi z zdravimi ljudmi. Vrednosti hsCRP so se značilno povečevale s stopnjo popuščanja srca po NYHA klasifikaciji, še posebej v tretji in četrti stopnji. Ugotovili so tudi, da imajo bolniki z višjimi koncentracijami hsCRP slabše možnosti preživetja.

Ljudje z DKM imajo značilno višje serumske koncentracije hsCRP v primerjavi z zdravimi ljudmi. Pri teh bolnikih so ugotovili značilno povišano koncentracijo hsCRP v NYHA III in IV stopnji v primerjavi z bolniki v NYHA I in II stopnji popuščanja srca (Wojciechowska in sod., 2014).

Senes s sodelavci (2008) je ugotavljal, ali so koncentracije hsCRP in CoQ₁₀ v krvi spremenjene pri ljudeh z ishemično kardiomiopatijo ali DKM v primerjavi z zdravimi ljudmi. Ugotovili so, da so koncentracije hsCRP značilno višje in koncentracije CoQ₁₀ značilno nižje pri bolnikih z obema vrstama kardiomiopatij v primerjavi z zdravimi ljudmi. Pri tej raziskavi niso ugotavljali, ali se koncentracije hsCRP zvišujejo z napredovanjem srčnega popuščanja.

Anand s sodelavci (2005) je ugotovil, da imajo ljudje s srčnim popuščanjem značilno višje koncentracije hsCRP in da je koncentracija hsCRP prognostični pokazatelj slabšega izida bolezni. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Ostrowska in sodelavci (2017), ki so ugotovili, da imajo bolniki z dekompenziranim popuščanjem srca in visokimi koncentracijami hsCRP večjo verjetnost smrtnega izida bolezni.

Pri bolnikih s koronarno boleznijo in popuščanjem srca so v primerjavi z bolniki, ki so imeli kompenzirano koronarno bolezen, ugotovili značilno višje koncentracije hsCRP in IL-6 v krvi. Sočasno so tudi ugotovili, da so višje koncentracije hsCRP pri bolnikih z dekompenzirano koronarno boleznijo pokazatelj slabšega izida bolezni (Blankenberg in sod., 2003). Do podobnih rezultatov je prišel tudi White s sodelavci (2006) pri ljudeh s CHF zaradi ishemične bolezni srca.

Bolniki s kroničnim popuščanjem srca imajo značilno višje koncentracije TNF- α v krvi v primerjavi z zdravimi ljudmi (Levine in sod., 1990). Koncentracija TNF- α se zvišuje s stopnjo srčnega popuščanja po NYHA klasifikaciji (Testa in sod., 1996; Torre-Amione in sod., 1996; Aukrust in sod., 1999; Ansari in sod., 2012; Chen in sod., 2014). Nekateri pa niso ugotovili povišanja koncentracije TNF- α v krvi pri bolnikih s popuščanjem srca, kar so pripisali premajhnemu številu bolnikov v posamezni skupini in prevelikim starostnim

razlikam med bolniki (Prichett in sod., 1995; Munger in sod., 1996). Značilno povišane koncentracije IL-6 so ugotovili pri bolnikih s popuščanjem srca (Torre-Amione in sod., 1996; White in sod., 2006; Ptaszynska-Kopczynska in sod., 2017), koronarno boleznijo (Blankenberg in sod., 2003; Chen in sod., 2014) in DKM (Aukrust in sod., 1999) v primerjavi z zdravimi ljudmi.

Testa s sodelavci (1996) je ugotovil zviševanje plazemskih koncentracij TNF- α , topnih recetorjev sTNFR2, IL-6, IL-1 β in njegovega topnega receptorja s stopnjevanjem srčnega popuščanja (vzroka ishemična ali hipertenzivna kardiomiopatija) po NYHA klasifikaciji. V to študijo niso vključili kontrolne skupine zdravih ljudi.

Keith in sodelavci (1998) so določali koncentracije TNF receptorjev TNFR1 in TNFR2 v krvi pri bolnikih s CHF v primerjavi z zdravimi ljudmi. Ugotovili so, da so serumske koncentracije obeh topnih receptorjev značilno višje pri bolnikih s srčnim popuščanjem in da se značilno višajo z napredovanjem srčnega popuščanja.

Ansari s sodelavci (2012) je ugotavljal, kakšne so plazemske koncentracije hsCRP in TNF- α pri ljudeh s popuščanjem srca kot posledice različnih bolezni srca (ishemična bolezen srca, bolezen zaklopk, DKM in hipertenziva bolezen srca). Ugotovili so značilno višje koncentracije hsCRP in TNF- α pri bolnikih s popuščanjem srca v primerjavi z zdravimi ljudmi. Vrednosti obeh parametrov so se značilno zviševale s stopnjo popuščanja srca. Ugotovili so tudi, da so koncentracije TNF- α značilno povezane s koncentracijami hsCRP, vrednosti LVEF pa se niso povezovale s koncentracijami hsCRP in TNF- α .

Pri ljudeh s popuščanjem srca v stopnji NYHA II je prišlo do značilnega povišanja koncentracije IL-6 v primerjavi z zdravimi ljudi in bolniki v NYHA I in NYHA III stopnji. Bolniki v vseh stopnjah popuščanja srca so imeli značilno višje koncentracije IL-6 v primerjavi z zdravimi ljudmi. Prav tako so ugotovili značilno linearno povezavo med koncentracijami TNF- α in IL-6 pri bolnikih s popuščanjem srca (Torre-Amione in sod., 1996).

Aukrust in sodelavci (1999) so ugotovili značilno višje plazemske koncentracije TNF- α , TNFR, IL-6, IL-1 in IL-10 pri ljudeh s popuščanjem srca (zaradi ishemične kardiomiopatije ali DKM) v primerjavi z zdravimi ljudmi. Vrednosti TNF- α , TNFR, IL-6 in IL-1 se značilno

zvišujejo z napredovanjem srčnega popuščanja po NYHA klasifikaciji. Zaznali so tudi močno pozitivno povezavo med proinflammatorym citokinom TNF- α in antiinflammatorym citokinom IL-10 pri ljudeh s popuščanjem srca v NYHA VI stopnji (najvišja stopnja srčnega popuščanja).

Chen in sodelavci (2014) so ugotavljali serumske koncentracije IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 in TNF- α pri zdravih ljudeh in bolnikih s CHF ter koronarno boleznijo. Ugotovili so, da imajo bolniki s koronarno boleznijo značilno višje koncentracije IL-2 v primerjavi z zdravimi ljudmi. Vrednosti TNF- α , IL-1 β in IL-6 so bile značilno višje pri bolnikih s CHF in bolnikih s koronarno boleznijo v primerjavi z zdravimi ljudmi. Koncentracije IL-6 in IL-10 so bile značilno višje pri bolnikih s srčnim popuščanjem v primerjavi z zdravimi ljudmi ter bolniki s koronarno boleznijo. Med bolniki s popuščanjem srca in koronarno boleznijo ni bilo značilnih razlik v koncentracijah IL-2, TNF- α in IL-1 β .

Ptaszynska-Kopczynska in sodelavci (2017) so ugotovili značilno višje plazemske koncentracije IL-6 in značilno nižje koncentracije sIL-6R pri bolnikih s popuščanjem srca zaradi ishemične ali dilatacijske kardiomiopatije v primerjavi z zdravimi ljudmi. Ugotovili so tudi, da se koncentracije hsCRP niso značilno razlikovale med bolnimi in zdravimi ljudmi.

Zdravljenje srčnega popuščanja vpliva na znižanje koncentracij TNF- α , IL-6 in CRP v krvi pri ljudeh s popuščanjem srca (Sato in sod., 1999; Kurum in sod., 2007; Bozkurt in sod., 2010). Dvotedensko zdravljenje srčnega popuščanja z antagonistom angiotenzin II receptorja tipa 1 (kandesartan cileksetil) značilno zniža plazemske koncentracije TNF- α in IL-6 (Tsutamoto in sod., 2000). Po 30-dnevnem zdravljenju z inotropi (milrinon in dobutamin) so ugotovili značilno znižanje plazemske koncentracije hsCRP, IL-6, IL-18 pri ljudeh s CHF (White in sod., 2006). Tudi zdravljenje s karvedilolom značilno zniža koncentracije IL-6 (Matsumura in sod., 2002) in TNF- α pri bolnikih z DKM (Kurum in sod., 2007).

V primerjavi s študijami pri ljudeh je objavljenih zelo malo kliničnih študij na področju določanja proinflammatoryh citokinov in drugih pokazateljev vnetja pri psih z različnimi kardiovaskularnimi boleznimi.

Plazemske koncentracije hsCRP v krvi so značilno višje pri psih z MDZ v primerjavi z zdravimi psi, medtem ko koncentracije hsCRP pri psih s dekompenziranim popuščanjem srca

niso povišane v primerjavi s psi s kompenzirano MDZ (Rush in sod., 2006). Podobne rezultate je podala študija, objavljena leta 2012 (Lukman), ki je prav tako dokazala povišane koncentracije serumskega CRP pri psih z MDZ v primerjavi z zdravimi psi. Ugotovila je tudi, da se koncentracije CRP višajo z napredovanjem popuščanja srca.

Cunningham in sodelavci (2012) so ugotovili, da imajo psi s CHF kot posledico MDZ ali DKM značilno višjo plazemsko koncentracijo hsCRP v primerjavi z zdravimi psi. Ugotovili so tudi, da imajo psi z DKM višjo koncentracijo hsCRP v primerjavi s psi z MDZ.

Polizopoulou s sodelavci (2015) je ugotavljala serumske koncentracije troponina I in CRP pri psih z MDZ v vseh treh stopnjah srčnega popuščanja po ISACHC klasifikaciji v različnih tedenskih intervalih (1., 5. in 9. teden) po začetku zdravljenja. Psi v ISACHC III so imeli značilno višjo izhodiščno vrednost koncentracije serumskega CRP v primerjavi s psi v ISACHC I. Koncentracije CRP so se značilno zniževale pri psih v ISACHC I in ISACHC III od 1. do 9. tedna študije. Tega niso ugotovili pri psih v ISACHC II skupini.

Serumska koncentracija hsCRP je značilno zvišana pri psih s CHF zaradi MDZ v primerjavi z zdravimi psi (Reimann in sod., 2016).

Nasprotno pa Ljungvall s sodelavci (2010) ni dokazala značilnih razlik v plazemskih koncentracijah hsCRP med psi z MDZ in zdravimi psi. Prav tako se koncentracija hsCRP ni zviševala s stopnjevanjem srčnega popuščanja.

Pri psih z eksperimentalno povzročenim popuščanjem srca, ki so ga povzročili z umetno povzročeno tahikardijo (210 udarcev/min tri tedne, četrti teden 240 udarcev/min), so ugotovili, da se plazemska koncentracija TNF- α in IL-6 v arterijski krvi in koronarnem sinusu ne poviša v primerjavi z vrednostmi pred, med (v tretjem tednu) in po nastanku srčnega popuščanja (v četrtem tednu). Rezultati nakazujejo, da se ob umetno povzročenim popuščanjem srca v trajanju 1 meseca ne poveča sinteza proinflammatoryh citokinov v kardiovaskularnem sistemu (Recchia in sod., 2000).

De Laforcade in sodelavci (2003) so ugotavljali plazemske koncentracije TNF in IL-1 pri lastniških psih z boleznima srca, DKM in MDZ, in ugotovili, da imajo psi z DKM značilno

nižje koncentracije TNF v primerjavi s psi z MDZ. Za IL-1 niso podali rezultatov primerjave med skupinama, saj so ta parameter določali le pri skupini psov z DKM.

Freemanova in sodelavci (1998b) niso ugotovili značilnih razlik v plazemskih koncentracijah IL-1 in TNF- α med psi s popuščanjem srca (v tretji in četrti stopnji popuščanja srca po NYHA klasifikaciji) zaradi DKM in zdravimi psi.

Pri najnovejši študiji in tudi eni redkih kliničnih študij na področju določanja proinflammatoryh in antiinflammatoryh citokinov pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi, je Zois s sodelavci (2012) določala serumske koncentracije različnih citokinov (IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15 in IL-18) pri psih z MDZ. Ugotovili so, da se koncentracija IL-2 in IL-7 v krvi znižuje s povečevanjem velikosti levega preddvora in večja kot je stopnja mitralne regurgitacije, manjše so vrednosti IL-7. Vrednosti vseh interlevkinov se niso značilno razlikovale med psi z MDZ in kontrolno skupino zdravih psov.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZBOR PSOV

Klinična raziskava je potekala od 1. 9. 2011 do 1. 9. 2014 na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. V študijo smo vključili devetinosemdeset bolnih lastniških psov različnih pasem. V raziskavo smo vključili še deset zdravih aktivnih reševalnih psov, ki so predstavljali kontrolno skupino. Lastniki psov so z vključitvijo psa v raziskavo pisno soglašali. Vse postopke je odobrila Nacionalna etična komisija in so potekali v skladu z veljavno slovensko zakonodajo na področju veterinarstva (Zakon o zaščiti živali UL RS, 43/2007). Natančna anamneza in dodatna vprašanja o prehranskih navadah živali (Priloga št. 3) so bila del kliničnega pregleda bolnih in zdravih psov. Vsem devetinosemdesetim psom smo potrdili kardiovaskularno bolezen z elektrokardiografijo, rentgenskim slikanjem prsnega koša in ehokardiografskim pregledom. Paciente smo kategorizirali glede na stopnjo srčnega popuščanja po ISACHC klasifikaciji (Fox in sod., 1999). Predpisali smo zdravljenje srčnega popuščanja glede na vrsto in napređovalost srčnega obolenja in je vključevalo diuretik, inhibitor angiotenzin konvertaze, inodilatator, glikozide digitalisa, blokatorje kalcijevih kanalčkov in selektivne antagonist adrenergičnih β_1 receptorjev. Tako zdravim kot bolnim psom smo zjutraj na tešče odvzeli vzorce venske krvi bodisi iz v. jugularis ali v. cephalice antebrachii. Pri vseh smo naredili osnovne hematološke preiskave – krvna slika z diferencialno belo krvno sliko (rezultati so predstavljeni v rezultatih in Prilogi št. 4) in biokemijski profil (natrij, kalij, klorid, sečnina, kreatinin, alkalna fosfataza (AP), alanin–aminotrasferaza (ALT), holesterol in trigliceridi (rezultati biokemijskih preiskav so predstavljeni v Prilogi št. 5). Iz raziskave smo izključili pse, ki so imeli sočasno diagnosticirano kakršnokoli drugo obolenje npr. onkološko obolenje, infekcije, alergije, endokrina obolenja, azotemijo itd. Zaradi naštetih izključitvenih dejavnikov smo sprva izločili enainštirideset psov. Prav tako smo v nadaljevanju izključili še enajst psov, ki so imeli različne prirojene bolezni srca (pulmonalna stenoza, subaortna stenoza, perzistentni duktus

arteriosus (PDA)), tako da smo na koncu v raziskavi obdržali le 37 psov, ki so oboleli za MDZ ali DKM.

Pse smo razdelili po treh razdelitvah. V prvi razdelitvi smo pse razporedili v štiri skupine, to je v tri skupine na podlagi stopnje srčnega popuščanja po ISACHC klasifikaciji ter v skupino zdravih psov.

V skupino, kjer smo ugotavljali vpliv zdravljenja, smo vključili pse s kardiovaskularnim obolenjem stopnje ISACHC II in III, ki potrebujejo zdravljenje in smo jih že zdravili. V skupino nezdravljenih psov (ISACHC II in III) smo uvrstili pse, ki še niso imeli kardiološke terapije.

Pse, vključene v ISACHC III stopnjo, smo razdelili glede na etiologijo bolezni v skupino psov z MDZ in skupino psov z DKM.

3.1.1 Ehokardiografija

Vsi psi s kardiovaskularno boleznijo so bili pregledani z ultrazvočnim aparatom Vingmed System Five (General Electrics, Norveška), s standardnimi desnimi in levimi dvo- in enodimenzionalnimi preseki ter barvnim in spektralnim Dopplerjem. Izmerili smo naslednje ehokardiografske parametre: premer levega preddvora (angl. Left Atrial Diameter, LAD), premer aorte (Ao), sistolično skrajšanje levega prekata (angl. Fractional Shortening, FS), končni premer levega prekata v diastoli (angl. Left Ventricular Diastolic Dimension, LVDd), končni premer levega prekata v sistoli (angl. Left Ventricular Systolic Dimension, LVDs), maso levega prekata (angl. Left Ventricular mass, LVmass), medprekatni pretin v diastoli (angl. Interventricular Septum Dimension in diastole, IVSd), medprekatni pretin v sistoli (angl. Interventricular Septum Dimension in systole, IVSs), prosto steno levega prekata v diastoli (angl. Left Ventricular Posterior Wall thickness in diastole, LVPWd), prosto steno levega prekata v sistoli (angl. Left Ventricular Posterior Wall thickness in systole, LVPWs), volumen ob koncu diastole po Teicholz formuli (angl. End Diastolic Volume of Left Ventricle calculated by Teicholz formula, EDVtz), volumen ob koncu sistole po Teicholz formuli (angl.

End Systolic Volume of Left Ventricle calculated by Teicholz formula, ESVtz), iztisni delež levega prekata po Teichholzu iz enodimenzionalnih meritev (LVEF) in hitrost pretokov skozi ustja iztočnih žil ter atrioventrikularna ustja. Za izračun povezav smo uporabili: razmerje med premerom levega preddvora in aorte (LAD/Ao), zgodnji mitralni priliv val E (m/s), pozni mitralni priliv val A (m/s) ter njuno razmerje (E/Ar), trantrikuspidalni gradient TRp (mmHg), sistolično skrajšanje, FS (%), LVEF, LVDs, LVDd, ESVtz in EDVtz. Parametre LVDs, LVDd, ESVtz in EDVtz smo indeksirali glede na telesno težo (kilograme) po alometrični metodi (Cornell in sod., 2004). Rezultati izbranih ehokardiografskih meritev so prikazani v Prilogi št. 6.

3.2 ODVZEM IN PRIPRAVA VZORCEV

Vzorci krvi smo odvzeli iz leve ali desne v. cephalice antebrachii ali v. jugularis.

Za hematološke preiskave smo odvzeli 0,5 mL krvi v 0,5 mL epruvete z antikoagulantom K₃EDTA (BD Microtainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA).

Za pripravo seruma za biokemijske preiskave in za določanje koncentracije vnetnih parametrov CRP, IL-6 in TNF- α smo istočasno odvzeli 2 x 4 mL krvi v 4 mL epruvete z aktivatorjem koagulacije in separacijskim gelom (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija). Vzorce krvi smo pol ure po odvzemu (po končani koagulaciji) centrifugirali 10 minut pri $1300 \times g$ pri 22 °C ter odločili serum. Krvni serum smo razdelili na šest delov (3 x 2 paralelki za vsak parameter) ter vzorce seruma do analize shranili pri temperaturi -80 °C.

Za določitev koncentracije MDA in NT-proBNP smo odvzeli 2 mL krvi v 2 mL epruvete z antikoagulantom EDTA (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija). Vzorce krvi smo v času do pol ure po odvzemu centrifugirali 15 minut pri $1500 \times g$ pri 4 °C. Po centrifugiranju smo plazmo razdelili na štiri dele (2 x 2 paralelki) ter vzorce plazme do analize shranili pri temperaturi -80 °C.

Za določanje koncentracije vitamina E in aktivnosti GPX smo kri odvzeli v 2 x 2 mL epruvete z antikoagulantom litijevim-heparinom (Greiner Bio-One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija).

Za določanje aktivnosti GPX smo polno kri odpipetirali v 2 epruveti za zamrzovanje in vzorce do analize shranili pri temperaturi -80°C . Vzorce krvi za določanje koncentracije vitamina E smo v času do pol ure po odvzemu centrifugirali 15 minut pri $1500 \times g$ pri 4°C . Po centrifugiranju smo plazmo razdelili na dva dela ter vzorce plazme do analize shranili pri temperaturi -80°C .

Hematološke in biokemijske analize ter določanje aktivnosti GPX smo opravili v Diagnostičnem laboratoriju Klinike za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Plazemsko koncentracijo vitamina E smo določali v Laboratoriju za kemijske analize krme na Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Koncentracije vnetnih parametrov CRP, IL-6 in TNF- α smo določali v laboratoriju Enote za fiziologijo in patološko fiziologijo Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Plazemsko koncentracijo MDA smo določali v laboratoriju Katedre za prehrano na Oddelku za zootehniko na Katedri za prehrano Biotehnične fakultete Univerze v Ljubljani.

Plazemsko koncentracijo NT-proBNP so določili v ameriškem IDEXX laboratoriju (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME).

3.3 ANALITIČNE METODE

3.3.1 Hematološke in biokemijske preiskave

Krvno sliko in diferencialno belo krvno sliko smo v pol ure po odvzemu določali z avtomatskim laserskim hematološkim analizatorjem Advia 120 (SIEMENS, München, Nemčija). Delovanje analizatorja temelji na citokemiji in pretočni citometriji z lasersko svetlobo. Analizator je zasnovan na računalniškem programu, ki je bil razvit za potrebe veterinarske medicine.

Vse biokemijske parametre, z izjemo natrija, kalija in klorida, smo določali na dan odvzema vzorcev z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija), natrij, kalij in klorid pa z Ilyte analizatorjem (IL – Instrumentation Laboratory, ZDA).

3.3.2 Antioksidantni parametri

3.3.2.1 Vitamin E

Za določanje koncentracije vitamina E smo uporabili postopek, opisan v literaturi (Zhao in sod., 2004; Sivertsen in sod., 2005). V epruveto smo odpipetirali 0,5 mL vzorca plazme in ga zmešali z 1 mL etanola. Mešanici smo dodali 3 mL n-heksana in jo stresali 10 sekund. Ko sta se plasti ločili, smo odpipetirali 2 mL zgornje heksanske faze in jo posušili do suhega pri približno 60 °C pod vakuumom (Syncore Reactor R-48, Büchi, Flawil, Switzerland). Suhi ostanek smo raztopili v 0,5 mL metanola. Koncentracijo vitamina E smo določili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) s fluorescenčno detekcijo. Rezultate smo ovrednotili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo

pripravili z uporabo standardnih raztopin β -tokoferola (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Uporabili smo sistem za tekočinsko kromatografijo (Waters Alliance 2695, Waters, Milford, MA, USA), opremljen s kolono μ Bondapak C18, 10 μ m, 3.9 x 300 mm (Waters), fluorescenčnim detektorjem Waters 474 in programom Millennium za vodenje sistema in obdelavo rezultatov. Za mobilno fazo smo uporabili metanol s pretokom 2 mL/min. Injekcijski volumen je bil 20 μ L, ločevanje na koloni je potekalo pri sobni temperaturi, za detekcijo pa smo uporabili valovno dolžino vzbujanja 295 nm in emisije 330 nm.

Izmerjeno koncentracijo vitamina E smo standardizirali na vsoto koncentracij holesterola in trigliceridov (LS-VE – lipidno standardizirana koncentracija vitamina E) v serumu (Thurnham in sod., 1986; Winbauer in sod., 1999).

3.3.2.2 Glutation peroksidaza (GPX)

Aktivnost GPX v hemolizatu polne krvi smo določali spektrofotometrično (340 nm) z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Uporabili smo reagenčni komplet RANSEL (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija), katerega osnova je posredna metoda določanja aktivnosti GPX Paglie in Valentina (Paglia in Valentine, 1967). Glutation peroksidaza katalizira oksidacijo reducirane oblike glutathiona s sintetičnim kumen hidroperoksidom; pri reakciji nastali oksidirani glutathion se nato v indikatorski reakciji z glutathion reduktazo in ob prisotnosti NADPH prevede v glutathion in NADP. Hitrost oksidacije NADPH, ki jo merimo kot znižanje absorbance pri 340 nm, je premosorazmerna aktivnosti GPX v vzorcu. Aktivnost GPX smo izrazili v enotah na gram hemoglobina (U/g Hb).

3.3.3 Pokazatelj oksidativnega stresa – malondialdehid (MDA)

Plazemsko koncentracijo MDA smo analizirali po analitičnem postopku, ki so ga uvedli in opisali Rezar s sodelavci (2010). MDA smo derivatizirali s tiobarbiturično kislino (TBA) v kislem mediju (0,44 M H_3PO_4). To reakcijsko zmes smo segrevali pri 95 °C 60 minut, nato smo jo ohladili na sobno temperaturo in jo filtrirali skozi 0,22 μm filter na avtomatski vzorčevalec vial. Derivat MDA–TBA₂ smo ločili z metodo HPLC (Waters Alliance, Milford, MA, ZDA) opremljen s Phenomenex HyperClone kromatografsko kolono (Phenomenex HyperClone, Torrance, CA, ZDA) in fluorescenčnim detektorjem (Waters, Milford, MA, ZDA). Inštrument je bil umerjen s tetraetoksipropanom (TEP) kot zunanjim standardom.

3.3.4 Pokazatelji vnetja – C–reaktivni protein, interleukin–6 in tumor nekrotizirajoči faktor– α

Za določanje koncentracij CRP, IL–6 in TNF– α smo uporabili komercialno dostopne encimsko imunske teste (angl. Enzyme–Linked Immunosorbent Assay, ELISA) za uporabo pri psih. Pri izvajanju ELISA testov smo upoštevali navodila proizvajalca. Koncentracijo CRP smo določali z ELISA testom 'Canine CRP ELISA' (Alpco, Salem, NH, ZDA). Glede na visoko občutljivost metode prištevamo ta test med metode z visoko občutljivostjo (hsCRP). Za določanje koncentracije IL–6 smo uporabili ELISA test 'Canine IL–6 Quantikine ELISA kit' (R&D Systems, Minneapolis MN, ZDA), za določanje koncentracije TNF– α pa smo uporabili 'Canine TNF–alpha Quantikine ELISA kit' (R&D Systems, Minneapolis MN, ZDA).

3.3.5 Pokazatelj popuščanja srca (NT–proBNP)

Plazemsko koncentracijo NT–proBNP smo določili z metodo ELISA (Cahill in sod., 2015). Vzorce smo poslali na analizo v komercialni laboratorij (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, ZDA) v Združene države Amerike.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate smo analizirali s pomočjo računalniškega statističnega programskega paketa SPSS (SPSS 22.0 for Windows, IBM, Chicago, Illinois, ZDA). Za analizo osnovnih lastnosti podatkov smo uporabili deskriptivno statistiko. Za ugotavljanje normalnosti porazdelitve podatkov smo uporabili Shapiro Wilkov test. V primeru, ko je bila porazdelitev rezultatov merjenih parametrov in starosti normalna, smo v nadaljevanju uporabili parametrične statistične analize, v primeru nenormalne porazdelitve pa neparametrične. Za primerjavo merjenih parametrov in starosti med posameznimi skupinami psov (ISACHC I–III, zdravi) smo uporabili enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) in Tukey HSD post-hoc test v primeru normalne porazdelitve podatkov ali Kruskal–Wallis analizo, ki ji je sledil Mann–Whitney U test z Bonferronijevim popravkom pri nenormalni porazdelitvi podatkov. Za primerjavo merjenih parametrov med skupinama zdravljenih in nezdravljenih pacientov oziroma med skupinama pacientov z MDZ in DKM smo, odvisno od porazdelitve podatkov, uporabili parametrični t-test za neodvisne vzorce ali neparametrični Mann–Whitneyev U test. Povezave med merjenimi parametri smo, odvisno od porazdelitve podatkov, določali s parametričnim Pearsonovim koeficientom korelacije ali neparametričnim Spearmanovim koeficientom korelacije.

V nadaljevanju so rezultati posameznih parametrov v tabelah predstavljeni kot povprečje in standardni odklon (angl. Standard Deviation, SD) v primeru normalne porazdelitve podatkov oziroma kot mediana vrednost in razpon minimalne do maksimalne vrednosti v primeru nenormalne porazdelitve.

Razlike med skupinami ter povezave med antioksidantnimi, oksidativnimi, vnetnimi in ehokardiografskimi parametri smo ovrednotili kot statistično značilne pri vrednosti $p \leq 0,05$.

V primeru, ko smo morali upoštevati Bonferronijev popravek, je bila značilna razlika med skupinama pri vrednosti $p < 0,0086$.

4 REZULTATI

4.1 OPISNI PODATKI PSOV

V študijo je bilo zajetih devetindevetdeset psov, od tega devetinosemdeset psov s potrjeno kardiovaskularno boleznijo in deset zdravih psov. Zaradi sočasnih sistemskih bolezni (neoplastične bolezni, alergije, sistemske infekcije, endokrina obolenja, azotemija) ali prirojenih kardiovaskularnih bolezni (pulmonalna stenoza, subaortna stenoza, PDA) smo izključili dvainpetdeset psov. V raziskavo smo vključili sedemintrideset psov, in sicer 16 psov z DKM in 21 psov z MDZ. Med njimi so predstavniki različnih pasem psov, in sicer z DKM: doberman ($n = 6$), nemška doga ($n = 5$), nemški bokser ($n = 2$), dalmatinec ($n = 1$), irski volčji hrt ($n = 1$), mali italijanski hrt ($n = 1$) in z MDZ: mešanec ($n = 5$), kavalir king charles španjel ($n = 4$), nemški bokser ($n = 2$), airdale terier ($n = 2$), ši-cu ($n = 2$), mali italijanski hrt ($n = 1$), schipperke ($n = 1$), jazbečar ($n = 1$), sicilijanski hrt ($n = 1$), pekinčan ($n = 1$) in hovawart ($n = 1$). V skupini zdravih so bili border koli ($n = 2$), labradorec ($n = 2$), hovawart ($n = 1$), dolgodlaki škotski ovčar ($n = 1$), irski volčji hrt ($n = 1$), beli švicarski ovčar ($n = 1$), afganistanski hrt ($n = 1$) in mešanec ($n = 1$).

Z analizo podatkov nismo ugotovili značilnih razlik v teži psov (Tabela 2) med posameznimi skupinami psov, razdeljenih po ISACHC klasifikaciji in zdravimi psi. Ugotovili pa smo, da so psi v skupini zdravih psov značilno mlajši (Tabela 2) v primerjavi z vsemi skupinami psov po ISACHC klasifikaciji (ISACHC I ($p = 0,001$); ISACHC II ($p < 0,001$); ISACHC III ($p = 0,007$)). Med psi, vključenimi v posamezne ISACHC skupine, nismo ugotovili značilnih razlik v starosti.

Med zdravljenimi in nezdravljenimi psi nismo ugotovili značilnih razlik v teži in starosti psov (Tabela 3).

Psi z MDZ v ISACHC III so bili značilno starejši ($p = 0,013$) in z značilno manjšo telesno težo ($p = 0,007$) v primerjavi s psi z DKM v ISACHC III (Tabela 4).

Tabela 2: Opisni podatki psov, vključenih v raziskavo

Table 2: Descriptive data of dogs included in the study

SKUPINE	spol (samci/samice)	starost (leta) povprečje ± SD	teža (kg) mediana (minimum–maksimum)
ISACHC I (n = 11)	9/2	9,30 ± 3,64	31,4 (5,9–70,0)
ISACHC II (n = 7)	7/0	10,58 ± 1,48	13,0 (6,0–35,5)
ISACHC III (n = 19)	15/4	7,93 ± 2,39	29,0 (8,0–94,0)
zdravi (n = 10)	3/7	4,53 ± 2,48 *	22,4 (18,0–64,0)

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon (angl. Standard Deviation, SD), ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, *značilno nižje vrednosti pri zdravih psih v primerjavi z ISACHC I ($p = 0,001$), z ISACHC II ($p < 0,001$) in z ISACHC III ($p = 0,007$)

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, *significantly lower in healthy dogs in comparison to ISACHC I ($p = 0.001$), ISACHC II ($p < 0.001$) and ISACHC III ($p = 0.007$)

Tabela 3: Opisni podatki zdravljenih in nezdravljenih psov (ISACHC II in III)

Table 3: Descriptive data of treated and non-treated dogs (ISACHC II and III)

SKUPINE	spol (samci/samice)	starost (leta) povprečje ± SD	teža (kg) mediana (minimum–maksimum)
nezdravljeni psi (n = 13)	11/2	7,86 ± 1,85	35,0 (8,0–68,1)
zdravljeni psi (n = 13)	11/2	9,42 ± 2,83	16,9 (6,0–94,0)

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation

Tabela 4: Opisni podatki psov z DKM in MDZ v stopnji ISACHC III

Table 4: Descriptive data of dogs with DCM and MVD in ISACHC III

SKUPINE	spol (samci/samice)	starost (leta) povprečje $\pm$ SD	teža (kg) povprečje $\pm$ SD
DKM (n = 11)	10/1	6,82 $\pm$ 1,78	44,0 $\pm$ 21,1
MDZ (n = 8)	5/3	9,46 $\pm$ 2,38 *	19,0 $\pm$ 10,4 *

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, MDZ – miksomatozna degeneracija zaklopk, DKM – dilatacijska kardiomiopatija, *značilno višje vrednosti pri psih z MDZ v primerjavi z DKM ($p = 0,013$), *značilno nižje vrednosti pri psih z MDZ v primerjavi z DKM ($p = 0,007$)

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, MVD – Myxomatous Valvular Degeneration, DCM – Dilated Cardiomyopathy, *significantly higher in dogs with MVD in comparison to DCM ($p = 0.013$), *significantly lower in dogs with MVD in comparison to DCM ($p = 0.007$)

4.2 KARDIOVASKULARNE BOLEZNI V POSAMEZNIH SKUPINAH PSOV IN ŠTEVILO ZDRAVLJENIH TER NEZDRAVLJENIH PSOV

V Tabeli 5 je prikazano, koliko psov je obolelo za MDZ ali DKM v posamezni skupini psov, in koliko je bilo zdravljenih oziroma nezdravljenih psov s kardiovaskularnim obolenjem ISACHC II in III. Nadalje je v Tabeli 6 prikazano, katera kardiološka zdravila so prejemale psi s kardiovaskularnim obolenjem.

Tabela 5: Psi z MDZ in DKM v različnih ISACHC skupinah ter zdravljeni in nezdravljeni psi

Table 5: Number of dogs with MVD and DCM in different ISACHC groups and number of treated and non-treated dogs

Bolezen	n	ISACHC I (n = 11)	ISACHC II (n = 7)	ISACHC III (n = 19)	n	Zdravljeni psi (ISACHC II in III) (n = 13)	Nezdravljeni psi (ISACHC II in III) (n = 13)
MDZ	21	7	6	8	14	9	5
DKM	16	4	1	11	12	4	8

Legenda: n – število psov, MDZ – miksomatozna degeneracija zaklopk, DKM – dilatacijska kardiomiopatija, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali

Legend: n – number of dogs, MVD – Myxomatous Valvular Degeneration, DCM – Dilated Cardiomyopathy, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council

Tabela 6: Kardiološka zdravila, ki so jih prejeli zdravljeni psi s kardiovaskularnim obolenjem v ISACHC II in III stopnji

Table 6: List of cardiac medications given to treated dogs in ISACHC II and III

Zdravljenje – zdravilo ali kombinacija zdravil	ISACHC II (n = 6)	ISACHC III (n = 7)
Furosemid		2
Furosemid in ACE inhibitor	2	1
Furosemid, ACE inhibitor in pimobendan	3	1
Furosemid, ACE inhibitor, pimobendan in β blokator adrenergičnih receptorjev	1	1
Furosemid, ACE inhibitor, digoksin in diltiazem		1
Furosemid, ACE inhibitor, pimobendan in digoksin		1

Legenda: n – število psov, ACE – encim angiotenzin konvertaza, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali

Legend: n – number of dogs, ACE – Angiotensin Converting Enzyme, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council

4.3 N-TERMINALNI FRAGMENT NATRIURETIČNEGA PRO-PEPTIDA TIP A (NT-proBNP)

Pri primerjavi plazemskih koncentracij NT-proBNP (Tabela 7) med skupinami psov, razdeljenih po ISACHC klasifikaciji, in zdravimi psi smo ugotovili značilno višjo koncentracijo NT-proBNP pri psih v skupini ISACHC III v primerjavi s psi v skupini ISACHC I ($p < 0,001$), ISACHC II ($p = 0,006$) in zdravimi psi ($p < 0,001$). Koncentracije NT-proBNP so bile značilno višje v skupini ISACHC II v primerjavi z zdravimi psi ($p = 0,001$). Med skupino zdravih psov in psi v ISACHC I ni bilo značilnih razlik v koncentraciji NT-proBNP.

Med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov nismo ugotovili značilne razlike v koncentraciji NT-proBNP (Tabela 8).

Tabela 7: Plazemska koncentracija NT-proBNP pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih

Table 7: Plasma concentrations of NT-proBNP of dogs in different stages of heart failure and healthy dogs

SKUPINE	NT-proBNP (pmol/L) mediana (minimum–maksimum)
ISACHC I (n = 11)	1207 (820–12056)
ISACHC II (n = 7)	2569 * (1340–8238)
ISACHC III (n = 19)	5173 * (2047–18631)
zdravi (n = 10)	822 (407–1331)

Legenda: n – število psov, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, *značilno višje vrednosti v ISACHC III v primerjavi z zdravimi psi ($p < 0,001$), ISACHC I ($p < 0,001$) in ISACHC II ($p = 0,006$), *značilno višje koncentracije pri ISACHC II v primerjavi z zdravimi psi ($p = 0,001$)

Legend: n – number of dogs, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, *significantly higher in ISACHC III in comparison to healthy dogs ($p < 0.001$), ISACHC I ($p < 0.001$) and ISACHC II ($p = 0.006$), *significantly higher in ISACHC II in comparison to healthy dogs ($p = 0.001$)

Tabela 8: Plazemska koncentracija NT-proBNP pri zdravljenih in nezdravljenih psih

Table 8: Plasma concentrations of NT-proBNP in treated and non-treated dogs

SKUPINE	NT-proBNP (pmol/L) mediana (minimum–maksimum)
nezdravljeni psi (n = 13)	4876 (2047–16704)
zdravljeni psi (n = 13)	3346 (1340–18631)

Legenda: n – število psov, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B

Legend: n – number of dogs, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide

4.4 POKAZATELJI OKSIDATIVNEGA STRESA

4.4.1 Malondaldehid (MDA)

Med posameznimi ISACHC skupinami psov in zdravimi psi ni bilo značilnih razlik v koncentraciji MDA. Pri primerjavi plazemskih koncentracij MDA (Tabela 9) med skupinami psov, razdeljenih po ISACHC klasifikaciji, smo ugotovili značilno nižjo koncentracijo MDA pri psih v skupini ISACHC II v primerjavi s psi v ISACHC I skupini ($p = 0,004$) in s psi v ISACHC III skupini ($p = 0,017$). Pri primerjavi plazemskih koncentracij MDA (Tabela 10) med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov nismo ugotovili značilnih razlik.

4.4.2 Glutation peroksidaza (GPX)

Pri primerjavi aktivnosti GPX (Tabela 9) med skupinami psov, razdeljenih po ISACHC klasifikaciji, in zdravimi psi nismo ugotovili značilnih razlik. Na podlagi rezultatov smo zaznali trend, da je aktivnost GPX višja pri psih v skupinah ISACHC I ($p = 0,059$) in ISACHC II ($p = 0,051$) v primerjavi s skupino zdravih psov.

Pri primerjavi aktivnosti GPX (Tabela 10) med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov nismo ugotovili značilnih razlik.

4.4.3 Vitamin E in lipidno standardizirani vitamin E (LS-VE)

Pri primerjavi plazemskih koncentracij vitamina E in LS-VE (Tabela 9) med ISACHC skupinami psov in zdravimi psi nismo ugotovili značilnih razlik, kot tudi ne med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov (Tabela 10).

Tabela 9: Parametri oksidativnega stresa pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih

Table 9: Parameters of oxidative stress in dogs at different stages of heart failure and healthy dogs

SKUPINE	MDA ($\mu\text{mol/L}$) povprečje $\pm$ SD	VITAMIN E ($\mu\text{mol/L}$) mediana (minimum–maksimum)	LS–VE ($\times 10^{-3}$) mediana (minimum–maksimum)	GPX (U/gHb) povprečje $\pm$ SD
ISACHC I (n = 11)	1,77 $\pm$ 0,74	57,8 (25,8–117,0)	8,91 (5,52–20,72)	457,6 $\pm$ 43,7
ISACHC II (n = 7)	0,71 $\pm$ 0,58 *	49,0 (35,2–107,5)	7,64 (3,89–11,71)	465,8 $\pm$ 36,6
ISACHC III (n = 19)	1,55 $\pm$ 0,64	71,7 (35,8–113,1)	8,84 (6,16–14,00)	414,1 $\pm$ 69,6
zdravi (n = 10)	1,34 $\pm$ 0,31	56,7 (38,9–72,4)	8,37 (6,77–10,59)	393,7 $\pm$ 43,6

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, MDA – malondialdehid, LS–VE – lipidno standardizirani vitamin E, GPX – glutation peroksidaza, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, *značilno nižje vrednosti v ISACHC II v primerjavi z ISACHC I ($p = 0,004$) in z ISACHC III ($p = 0,017$)

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, MDA – Malondialdehyde, LS–VE – Lipid–Standardized vitamin E, GPX – Glutathione Peroxidase, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, *significantly lower in ISACHC II in comparison to ISACHC I ($p = 0.004$) and ISACHC III ($p = 0.017$)

Tabela 10: Parametri oksidativnega stresa pri zdravljenih in nezdravljenih psih

Table 10: Parameters of oxidative stress in treated and non–treated dogs

SKUPINE	MDA ($\mu\text{mol/L}$) povprečje $\pm$ SD	VITAMIN E ($\mu\text{mol/L}$) povprečje $\pm$ SD	LS–VE ($\times 10^{-3}$) povprečje $\pm$ SD	GPX (U/gHb) povprečje $\pm$ SD
nezdravljeni psi (n = 13)	1,34 $\pm$ 0,68	70,57 $\pm$ 22,61	8,85 $\pm$ 1,30	420,4 $\pm$ 67,8
zdravljeni psi (n = 13)	1,30 $\pm$ 0,79	60,68 $\pm$ 22,80	8,31 $\pm$ 2,99	437,9 $\pm$ 64,9

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, MDA – malondialdehid, LS–VE – lipidno standardizirani vitamin E, GPX – glutation peroksidaza

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, MDA – Malondialdehyde, LS–VE – Lipid–Standardized vitamin E, GPX – Glutathione Peroxidase

4.5 POKAZATELJI VNETJA PRI PSIH V ISACHC SKUPINAH IN ZDRAVIH PSIH TER PRI ZDRAVLJENIH IN NEZDRAVLJENH PSIH

4.5.1 Tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)

Pri primerjavi serumskih koncentracij TNF- α (Tabela 11) med bolnimi in zdravimi psi nismo ugotovili značilnih razlik.

Med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov ni bilo značilnih razlik v koncentraciji TNF- α (Tabela 12).

4.5.2 Interlevkin-6 (IL-6)

Pri primerjavi serumskih koncentracij IL-6 med bolnimi in zdravimi psi (Tabela 11) ter med zdravljenimi in nezdravljenimi psi nismo ugotovili značilnih razlik (Tabela 12).

4.5.3 C-reaktivni protein (CRP)

Pri primerjavi serumskih koncentracij CRP (Tabela 11) smo ugotovili značilno višje koncentracije CRP pri psih v ISACHC III skupini v primerjavi z zdravimi psi ($p = 0,006$). Ugotovili smo višje serumske koncentracije CRP pri psih v ISACHC II v primerjavi z zdravimi psi, toda razlika ni bila značilna ($p = 0,014$).

Med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov ni bilo značilnih razlik v vrednosti CRP (Tabela 12).

Tabela 11: Parametri vnetja pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih

Table 11: Parameters of inflammation in dogs at different stages of heart failure and healthy dogs

SKUPINE	TNF- α (pg/mL) mediana (minimum–maksimum)	IL-6 (pg/mL) mediana (minimum–maksimum)	CRP (mg/L) mediana (minimum–maksimum)
ISACHC I (n = 11)	3,90 (3,90–5,68)	31,3 (31,3–33,2)	1,45 (0,43–13,49)
ISACHC II (n = 7)	6,81 (3,90–10,84)	31,3 (31,3–62,5)	1,41 (0,98–21,75)
ISACHC III (n = 19)	7,94 (3,90–25,73)	31,3 (31,3–218,3)	3,62 * (0,29–114,62)
zdravi (n = 10)	5,90 (3,90–17,49)	31,3 (31,3–33,9)	0,90 (0,78–2,27)

Legenda: n – število psov, TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- α , IL-6 – interleukin-6, CRP – C-reaktivni protein, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, *značilno višje vrednosti v ISACHC III v primerjavi z zdravimi psi (p = 0,006)

Legend: n – number of dogs, TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , IL-6 – Interleukin-6, CRP – C-Reactive Protein, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, *significantly higher in ISACHC III in comparison to healthy dogs (p = 0.006)

Tabela 12: Parametri vnetja pri zdravljenih in nezdravljenih psih

Table 12: Parameters of inflammation in treated and non-treated dogs

SKUPINE	TNF (pg/mL) mediana (minimum–maksimum)	IL-6 (pg/mL) mediana (minimum–maksimum)	CRP (mg/L) mediana (minimum–maksimum)
nezdravljeni psi (n = 13)	4,8 (3,9–25,7)	31,3 (31,3–218,3)	2,91 (0,29–114,62)
zdravljeni psi (n = 13)	7,9 (3,9–22,6)	31,3 (31,3–62,5)	4,31 (0,48–21,75)

Legenda: n – število psov, TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- α , IL-6 – interleukin-6, CRP – C-reaktivni protein

Legend: n – number of dogs, TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , IL-6 – Interleukin-6, CRP – C-Reactive Protein

4.6 BELA KRVNA SLIKA

V Tabeli 13 so podani rezultati vrednosti parametrov bele krvne slike v posameznih skupinah psov. Nadalje so v Tabeli 14 rezultati parametrov bele krvne slike pri zdravljenih in nezdravljenih psih.

Pri primerjavi skupnega števila levkocitov med skupinami psov, razdeljenih po ISACHC klasifikaciji, in zdravimi psi smo ugotovili značilno višje vrednosti pri psih v ISACHC III skupini v primerjavi s psi v ISACHC I skupini ($p = 0,005$) ter v primerjavi s skupino zdravih psov ($p < 0,001$).

Absolutno število nevtrofilnih granulocitov je bilo značilno višje pri psih v ISACHC III skupini v primerjavi zdravimi psi ($p < 0,001$).

Značilne razlike smo ugotovili tudi v relativnih vrednostih nevtrofilnih granulocitov, in sicer značilno višje vrednosti v skupini psov v ISACHC I ($p = 0,012$) in ISACHC III ($p < 0,001$) v primerjavi z zdravimi psi. Sočasno so imeli tudi psi v ISACHC III značilne višje relativne vrednosti nevtrofilnih granulocitov v primerjavi z ISACHC II skupino psov ($p = 0,041$).

Relativna vrednost limfocitov je bila značilno nižja v skupini ISACHC I ($p = 0,004$) in ISACHC III ($p < 0,001$) v primerjavi s skupino zdravih psov. Prav tako je bila relativna vrednost limfocitov nižja v skupini ISACHC III v primerjavi s skupino ISACHC II ($p = 0,017$).

Absolutno število monocitov je bilo značilno višje v skupini ISACHC III psov v primerjavi s skupino zdravih psov ($p = 0,001$), v primerjavi s psi v ISACHC I skupini pa kljub veliki razliki v številčni vrednosti statistična analiza ni pokazala značilne razlike ($p = 0,009$).

Absolutno število velikih neobarvanih celic je bilo značilno višje v ISACHC II skupini v primerjavi z zdravimi psi ($p = 0,006$).

Med drugimi parametri bele krvne slike, to so absolutno število limfocitov, relativna vrednost monocitov, relativna vrednost in absolutno število eozinofilnih granulocitov, relativna vrednost in absolutno število bazofilnih granulocitov ter relativna vrednost velikih neobarvanih celic, nismo ugotovili značilnih razlik med posameznimi skupinami psov.

Posamezni parametri bele krvne slike se niso značilno razlikovali med zdravljenimi oziroma nezdravljenimi psi.

Tabela 13: Bela krvna slika pri psih v različnih stopnjah srčnega popuščanja in pri zdravih psih

Table 13: Total white blood cell count (WBC) and differential WBC in dogs in different stages of heart failure and healthy dogs

SKUPINE	ISACHC I (n = 11)	ISACHC II (n = 7)	ISACHC III (n = 19)	ZDRAVI (n = 10)
Levkociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	7,74 (4,47–13,49)	10,50 (5,78–14,44)	10,43 * (6,68–25,91)	6,19 (4,36–9,97)
Nevtrofilni granulociti (%) povprečje $\pm$ SD	67,66 $\pm$ 7,68 *	61,56 $\pm$ 8,43	70,68 $\pm$ 7,49 $\square$	57,10 $\pm$ 6,52
Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	5,19 (3,26–8,81)	6,31 (2,90–9,16)	7,21 $\times$ (3,81–20,16)	3,39 (2,10–6,84)
Limfociti (%) povprečje $\pm$ SD	19,98 $\pm$ 7,37 Φ	26,59 $\pm$ 6,73	18,24 $\pm$ 4,81 Φ $\blacklozenge$	29,72 $\pm$ 6,26
Limfociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	1,28 (0,61–2,35)	2,96 (1,50–4,22)	1,95 (1,34–3,52)	1,83 (1,27–2,69)
Monociti (%) mediana (minimum–maksimum)	5,50 (4,10–7,30)	4,50 (3,00–15,20)	5,80 (3,10–12,90)	4,20 (3,00–12,40)
Monociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,42 (0,26–0,74)	0,49 (0,41–0,88)	0,60 $\#$ (0,40–1,64)	0,28 (0,18–1,24)
Eozinofilni granulociti (%) mediana (minimum–maksimum)	6,00 (2,40–11,30)	2,90 (0,20–9,00)	2,80 (0,20–14,10)	7,75 (1,20–12,10)
Eozinofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,40 (0,18–1,52)	0,31 (0,10–0,95)	0,29 (0,01–1,28)	0,46 (0,12–0,65)
Bazofilni granulociti (%) mediana (minimum–maksimum)	0,10 (0,00–0,30)	0,20 (0,00–0,90)	0,10 (0,00–0,30)	0,20 (0,10–0,50)
Bazofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,01 (0,00–0,020)	0,01 (0,01–0,12)	0,01 (0,01–0,04)	0,01 (0,00–0,04)
velike neobarvane celice (%) mediana (minimum–maksimum)	0,50 (0,20–0,90)	0,60 (0,20–0,90)	0,60 (0,00–2,00)	0,30 (0,10–0,70)
velike neobarvane celice ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,04 (0,01–0,08)	0,07 $\diamond$ (0,03–0,31)	0,05 (0,01–0,51)	0,02 (0,01–0,05)

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, *značilno višje vrednosti v ISACHC III v primerjavi z ISACHC I ($p = 0,005$) in zdravimi psi ($p < 0,001$), *značilno višje vrednosti v ISACHC III v primerjavi z zdravimi psi ($p < 0,001$), $\square$ značilno višje vrednosti v ISACHC III v primerjavi z ISACHC II ($p = 0,041$) in zdravimi psi ($p < 0,001$), *značilno višje vrednosti v ISACHC I v primerjavi z zdravimi psi ($p = 0,012$), Φ značilno nižje vrednosti v skupini ISACHC I ($p = 0,004$) in ISACHC III ($p < 0,001$) v primerjavi z zdravimi psi, $\blacklozenge$ značilno nižje vrednosti v ISACHC III v primerjavi z ISACHC II ($p = 0,017$), $\#$ značilno višje vrednosti v ISACHC III v primerjavi z zdravimi psi ($p = 0,001$), $\diamond$ značilno višje vrednosti v ISACHC II v primerjavi z zdravimi psi ($p = 0,006$)

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, *significantly higher in ISACHC III in comparison to ISACHC I ($p = 0.005$) and healthy dogs ($p < 0.001$), *significantly higher in ISACHC III in comparison to healthy dogs ($p < 0.001$), $\square$ significantly higher in ISACHC III in comparison to ISACHC II ($p = 0.041$) and healthy dogs ($p < 0.001$), *significantly higher in ISACHC I in comparison to healthy dogs ($p = 0.012$), Φ significantly lower in ISACHC I ($p = 0.004$) and ISACHC III ($p < 0.001$) in comparison to healthy dogs, $\blacklozenge$ significantly lower in ISACHC III in comparison to ISACHC II ($p = 0.017$), $\#$ significantly higher in ISACHC III in comparison to healthy dogs ($p = 0.001$), $\diamond$ significantly higher in ISACHC II in comparison to healthy dogs ($p = 0.006$)

Tabela 14: Bela krvna slika pri zdravljenih in nezdravljenih psih

Table 14: Total white blood cell count (WBC) and differential WBC in treated and non-treated dogs

SKUPINE	nezdravljeni psi (n = 13)	zdravljeni psi (n = 13)
Levkociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	10,50 (7,45–25,91)	10,08 (5,78–15,32)
Nevtrofilni granulociti (%) povprečje $\pm$ SD	70,47 $\pm$ 7,65	65,98 $\pm$ 9,26
Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	7,21 (5,30–20,16)	6,31 (2,90–11,50)
Limfociti (%) povprečje $\pm$ SD	18,74 $\pm$ 6,03	22,23 $\pm$ 6,64
Limfociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	2,01 (1,38–3,52)	1,90 (1,34–4,22)
Monociti (%) povprečje $\pm$ SD	5,53 $\pm$ 1,24	7,38 $\pm$ 3,87
Monociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,59 (0,40–1,64)	0,61 (0,41–1,16)
Eozinofilni granulociti (%) mediana (minimum–maksimum)	3,50 (0,20–12,30)	2,40 (0,20–14,10)
Eozinofilni granulociti ($\times 10^9/L$) povprečje $\pm$ SD	0,50 $\pm$ 0,40	0,31 $\pm$ 0,25
Bazofilni granulociti (%) mediana (minimum–maksimum)	0,10 (0,00–0,20)	0,20 (0,10–0,90)
Bazofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,01 (0,01–0,02)	0,01 (0,01–0,12)
velike neobarvane celice (%) mediana (minimum–maksimum)	0,60 (0,00–2,00)	0,60 (0,10–2,10)
velike neobarvane celice ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,06 (0,01–0,51)	0,04 (0,01–0,31)

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation

4.7 PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA IN VNETJA TER NT–proBNP PRI PSIH OBOLELIH ZA MDZ ALI DKM V STOPNJI ISACHC III

Ugotovili smo značilno višjo aktivnost GPX pri psih z MDZ v primerjavi s psi z DKM ($p = 0,004$). Med drugimi parametri nismo ugotovili značilnih razlik.

V Tabeli 15 so podane koncentracije NT-proBNP in vrednosti parametrov oksidativnega stresa ter vnetja, v Tabeli 16 pa skupno število levkocitov in diferencialna bela krvna slika pri psih, obolelih za MDZ oziroma DKM v zadnji stopnji popuščanja srca (ISACHC III).

Tabela 15: Parametri oksidativnega stresa in vnetja ter NT-proBNP pri psih z MDZ ali DKM V ISACHC III

Table 15: Oxidative stress, inflammatory parameters and NT-proBNP in dogs with DCM or MVD in ISACHC III

Bolezen	MDZ (n = 8)	DKM (n = 11)
MDA ($\mu\text{mol/L}$) povprečje $\pm$ SD	1,35 $\pm$ 0,47	1,69 $\pm$ 0,73
VITAMIN E ($\mu\text{mol/L}$) povprečje $\pm$ SD	69,64 $\pm$ 20,77	70,04 $\pm$ 22,41
LS-VE ($\times 10^{-3}$) povprečje $\pm$ SD	8,43 $\pm$ 1,07	9,55 $\pm$ 2,40
GPX (U/gHb) povprečje $\pm$ SD	467,5 $\pm$ 57,4 *	376,8 $\pm$ 51,6
NT-proBNP (pmol/L) mediana (minimum-maksimum)	5005 (2047-18631)	5173 (4088-16704)
TNF- α (pg/mL) mediana (minimum-maksimum)	3,90 (3,90-22,60)	12,76 (3,90-25,73)
IL-6 (pg/mL) mediana (minimum-maksimum)	31,3 (31,3-68,9)	31,3 (31,3-218,3)
CRP (mg/L) mediana (minimum-maksimum)	3,31 (0,83-67,79)	6,25 (0,29-114,62)

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, MDA – malondialdehid, LS-VE – lipidno standardizirani vitamin E, GPX – glutation peroksidaza, TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- α , IL-6 – interlevkin-6, CRP – C-reaktivni protein, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B, MDZ – miksomatozna degeneracija zaklopk, DKM – dilatacijska kardiomiopatija, *značilno višje vrednosti pri psih z MDZ v primerjavi s psi z DKM ($p = 0,004$)

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, MDA – Malondialdehyde, LS-VE – Lipid-Standardized vitamin E, GPX – Glutathione Peroxidase, TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , IL-6 – Interleukin-6, CRP – C-Reactive Protein, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, MVD – Myxomatous Valvular Degeneration, DCM – Dilated Cardiomyopathy, *significantly higher in dogs with MVD in comparison to dogs with DCM ($p = 0.004$)

Tabela 16: Bela krvna slika pri psih, obolelih za MDZ ali DKM v ISACHC III skupini

Table 16: Total white blood cell count (WBC) and differential WBC in dogs with MVD or DCM in ISACHC III

Bolezen	MDZ (n = 8)	DKM (n = 11)
Levkociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	9,92 (6,68–14,96)	10,51 (7,42 – 25,91)
Nevtrofilni granulociti (%) povprečje $\pm$ SD	71,05 $\pm$ 7,20	70,42 $\pm$ 8,03
Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	6,94 (3,81–11,50)	7,26 (4,51–20,16)
Limfociti (%) povprečje $\pm$ SD	18,36 $\pm$ 3,06	18,15 $\pm$ 5,93
Limfociti ($\times 10^9/L$) povprečje $\pm$ SD	1,95 $\pm$ 0,48	2,09 $\pm$ 0,71
Monociti (%) mediana (minimum–maksimum)	4,95 (3,10–8,70)	6,30 (4,00–12,90)
Monociti ($\times 10^9/L$) povprečje $\pm$ SD	0,57 $\pm$ 0,15	0,83 $\pm$ 0,38
Eozinofilni granulociti (%) mediana (minimum–maksimum)	2,95 (1,60–14,10)	1,10 (0,20–12,30)
Eozinofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,29 (0,21–0,94)	0,13 (0,01–1,28)
Bazofilni granulociti (%) mediana (minimum–maksimum)	0,10 (0,10–0,30)	0,10 (0,00–0,30)
Bazofilni granulociti ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,01 (0,01–0,02)	0,01 (0,01–0,04)
Velike neobarvane celice (%) mediana (minimum–maksimum)	0,60 (0,10–0,90)	0,40 (0,00–2,00)
Velike neobarvane celice ($\times 10^9/L$) mediana (minimum–maksimum)	0,07 (0,01–0,13)	0,04 (0,01–0,51)

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, MDZ – miksomatozna degeneracija zaklopk, DKM – dilatacijska kardiomiopatija

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, MVD – Myxomatous Valvular Degeneration, DCM – Dilated Cardiomyopathy

4.8 MEDSEBOJNE POVEZAVE PARAMETROV V POSAMEZNIH ISACHC SKUPINAH IN SKUPINAH ZDRAVLJENIH IN NEZDRAVLJENIH PSOV

V okviru raziskave smo ugotavljali povezave med vsemi izmerjenimi parametri, in sicer parametri oksidativnega stresa (MDA, vitamin E, LS-VE in GPX), NT-proBNP, vnetnimi parametri (TNF- α , IL-6 in CRP), skupnim številom levkocitov ter parametri diferencialne bele krvne slike in ehokardiografskimi parametri (razmerje LAD/Ao, E/Ar, val A, val E, TRp, FS, LVEF, LVDs, LVDd, ESVtz in EDVtz). Ehokardiografske parametre, LVDs, LVDd, ESVtz in EDVtz smo indeksirali po alometrični metodi (Cornell in sod., 2004). Za interpretacijo smo upoštevali le smiselne in značilne povezave. Zaradi velikega števila podatkov smo v Tabelah št. od 17 do 21 navedli le značilne povezave.

Tabela 17: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri skupini psov v stopnji ISACHC I

Table 17: Significant correlations between all parameters in group of dogs in ISACHC I

ISACHC I	Monociti (%)	Monociti ($\times 10^9/L$)	Val A (m/s)	FS (%)
VITAMIN E ($\mu\text{mol/L}$)			$r = -0,885$ $p = 0,004$	
LS-VE ($\times 10^{-3}$)	$r = 0,618$ $p = 0,043$		$r = -0,831$ $p = 0,011$	
NT-proBNP (pmol/L)				$R = -0,809$ $p = 0,003$
CRP (mg/L)	$r = 0,764$ $p = 0,006$	$R = 0,612$ $p = 0,045$		

Legenda: $p \leq 0,05$, r – Pearsonov koeficient, R – Spearmanov koeficient, LS-VE – lipidno standardizirani vitamin E, CRP – C-reaktivni protein, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B, Val A – zgodnji mitralni priliv, FS – sistolično skrajšanje

Legend: $p \leq 0,05$, r – Pearson coefficient, R – Spearman coefficient, LS-VE – Lipid-Standardized vitamin E, CRP – C-Reactive Protein, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, Wave A – early mitral flow, FS – Fractional Shortening

Tabela 18: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri skupini psov v stopnji ISACHC II

Table 18: Significant correlations between all parameters in group of dogs in ISACHC II

ISACHC II	CRP (mg/L)	NT-proBNP (pmol/L)	Nevtrofilni granulociti (%)	Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	Val A (m/s)
TNF- α (pg/mL)	R = 0,775 p = 0,041				
IL-6 (pg/mL)	R = 0,768 p = 0,044	R = 0,808 p = 0,028			R = -0,880 p = 0,021
CRP (mg/L)			R = 0,786 p = 0,036	R = 0,821 p = 0,023	R = -0,829 p = 0,042
Nevtrofilni granulociti (%)					r = -0,848 p = 0,033
Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9/L$)					r = -0,824 p = 0,044

Legenda: $p \leq 0,05$, r – Pearsonov koeficient, R – Spearmanov koeficient, TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- α , IL-6 – interleukin-6, CRP – C-reaktivni protein, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B, Val A – pozni mitralni priliv

Legend: $p \leq 0,05$, r – Pearson coefficient, R – Spearman coefficient, TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , IL-6 – Interleukin-6, CRP – C-Reactive Protein, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, Wave A – late mitral flow

Tabela 19: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri skupini psov v stopnji ISACHC III

Table 19: Significant correlations between all parameters in group of dogs in ISACHC III

ISACHC III	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Nevtrofilni granulociti (%)	Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9/\text{L}$)	Limfociti (%)	Limfociti ($\times 10^9/\text{L}$)	Monociti (%)	Monociti ($\times 10^9/\text{L}$)	Val E (m/s)	E/Ar	FS (%)
LS-VE ($\times 10^{-3}$)		$r = -0,593$ $p = 0,007$	$R = -0,462$ $p = 0,047$	$r = 0,507$ $p = 0,027$						
GPX (U/gHb)							$R = -0,484$ $p = 0,049$			
NT-proBNP (pmol/L)						$R = 0,553$ $p = 0,014$				
CRP (mg/L)					$R = 0,502$ $p = 0,047$					
TNF- α (pg/mL)	$R = 0,485$ $p = 0,035$									$R = -0,566$ $p = 0,018$
IL-6 (pg/mL)									$R = -0,672$ $p = 0,023$	
Monociti (%)								$R = 0,638$ $p = 0,019$		

Legenda: $p \leq 0,05$, r – Pearsonov koeficient, R – Spearmanov koeficient, MDA – malondialdehid, LS-VE – lipidno standardizirani vitamin E, GPX – glutation peroksidaza, TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- α , IL-6 – interlevkin-6, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B, E/Ar – razmerje med valoma A in E mitralnega priliva, Val E – zgodnji mitralni priliv, FS – sistolično skrajšanje

Legend: $p \leq 0,05$, r – Pearson coefficient, R – Spearman coefficient, MDA – Malondialdehyde, LS-VE – Lipid-Standardized vitamin E, GPX – Glutathione Peroxidase, TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , IL-6 – Interleukin-6, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, E/Ar – ratio between wave E and A of mitral flow, Wave E – early mitral flow, FS – Fractional Shortening

Tabela 20: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri nezdravljenih psih

Table 20: Significant correlations between all parameters in non-treated dogs

NEZDRAVLJENI PSI	GPX (U/gHb)	Levkociti ($\times 10^9/L$)	Nevtrofilni granulociti (%)	Limfociti (%)	Limfociti ($\times 10^9/L$)	Monociti (%)	razmerje LAD/Ao	E/Ar
MDA ($\mu\text{mol/L}$)			$r = 0,594$ $p = 0,032$	$r = -0,688$ $p = 0,009$	$r = -0,570$ $p = 0,028$			
VITAMIN E ($\mu\text{mol/L}$)							$r = -0,555$ $p = 0,049$	
NT-proBNP (pmol/L)						$R = 0,661$ $p = 0,014$		
TNF- α (pg/mL)	$R = -0,627$ $p = 0,029$	$R = 0,707$ $p = 0,007$						
CRP (mg/L)						$R = 0,606$ $p = 0,048$		
Limfociti ($\times 10^9/L$)								$r = 0,720$ $p = 0,029$

Legenda: $p \leq 0,05$, r – Pearsonov koeficient, R – Spearmanov koeficient, MDA – malondialdehid, GPX – glutation peroksidaza, TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- α , CRP – C-reaktivni protein, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B, LAD/Ao – razmerje med premerom levega preddvora in aorte, E/Ar – razmerje med valoma A in E mitralnega priliva

Legend: $p \leq 0,05$, r – Pearson coefficient, R – Spearman coefficient, MDA – Malondialdehyde, GPX – Glutathione Peroxidase, TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , CRP – C-Reactive Protein, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, LAD/Ao – ratio between diameter of left atrium and aorta, E/Ar – ratio between wave E and A of mitral flow

Tabela 21: Značilne medsebojne povezave vseh izmerjenih parametrov pri zdravljenih psih

Table 21: Significant correlations between all parameters in treated dog

ZDRAVLJENI PSI	VITAMIN E ($\mu\text{mol/L}$)	LS-VE ($\times 10^{-3}$)	NT- proBNP (pmol/L)	Levkociti ($\times 10^9/\text{L}$)	Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9/\text{L}$)	Monociti ($\times 10^9/\text{L}$)	Val A (m/s)	FS (%)
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	$r = 0,605$ $p = 0,028$	$r = 0,697$ $p = 0,008$	$R = 0,637$ $p = 0,019$					
VITAMIN E ($\mu\text{mol/L}$)		$r = 0,901$ $p < 0,001$	$R = 0,566$ $p = 0,044$					
LS-VE ($\times 10^{-3}$)				$r = -0,623$ $p = 0,023$	$r = -0,571$ $p = 0,041$			
GPX (U/gHb)						$r = -0,722$ $p = 0,008$		
TNF- α (pg/mL)	$R = 0,579$ $p = 0,038$	$R = 0,593$ $p = 0,033$						$R = -0,609$ $p = 0,036$
CRP (mg/L)							$R = -0,738$ $p = 0,037$	

Legenda: $p \leq 0,05$, r – Pearsonov koeficient, R – Spearmanov koeficient, MDA – malondialdehid, LS-VE – lipidno standardizirani vitamin E, GPX – glutation peroksidaza, TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor- α , CRP – C-reaktivni protein, NT-proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro-peptida tipa B, Val A – pozni mitralni priliv

Legend: $p \leq 0,05$, r – Pearson coefficient, R – Spearman coefficient, MDA – Malondialdehyde, LS-VE – Lipid-Standardized vitamin E, GPX – Glutathione Peroxidase, TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α , CRP – C-Reactive Protein, NT-proBNP – N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, Wave A – late mitral flow

5 RAZPRAVA

V veterinarski medicini je objavljenih malo raziskav, ki bi proučevale oksidativni stres (Freeman in sod., 1998a; Freeman in sod., 1999; Freeman in sod., 2005; Verk, 2010; Reimann in sod., 2017; Svete in sod., 2017) in vnetje (De Laforcade in sod., 2003; Rush in sod., 2006; Ljungvall in sod., 2010; Lukman, 2012; Zois in sod., 2012; Polizopoulou in sod., 2015; Reimann in sod., 2016) pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi. V humani medicini pa so številne raziskave pokazale, da imajo ljudje s kardiovaskularnimi boleznimi spremenjene vrednosti pokazateljev oksidativnega stresa (Diaz–Velez in sod., 1996; Ghatak in sod., 1996; Keith in sod., 1998; Polidori in sod., 2004; White in sod., 2006; Jawalekar in sod., 2010; Wojciechowska in sod., 2014), antioksidantnega statusa (Ghatak in sod., 1996; Blankenberg in sod., 2003; Shinde in sod., 2005; Flores–Mateo in sod., 2009; Chae in sod., 2012; Cavalca in sod., 2013) in vnetja (Elster in sod., 1956; Blankenberg in sod., 2003; Huang in sod., 2004; White in sod., 2006; Ansari in sod., 2012; Ostrowska in sod., 2017).

Z našo raziskavo smo želeli dobiti boljši vpogled v vrednosti krvnih pokazateljev oksidativnega stresa (MDA, GPX, vitamin E in LS–E) in vnetja (CRP, IL–6 in TNF– α) pri psih s kardiovaskularnima boleznima MDZ in DKM v različnih stopnjah popuščanja srca v primerjavi z zdravimi psi. Zanimalo nas je, ali se vrednosti prej omenjenih parametrov znižujejo ali povečujejo glede na stopnjo srčnega popuščanja. Sočasno smo določali tudi plazemsko koncentracijo pokazatelja popuščanja srca NT–proBNP, ki je dober in specifičen pokazatelj napredovalosti srčnega popuščanja tako v humani kot veterinarski medicini (Collinson, 2005; Oyama in sod., 2008; Serres in sod., 2009; Potter, 2011). Nadalje nas je zanimalo, ali zdravljenje srčnega popuščanja vpliva na nivo pokazateljev oksidativnega stresa in vnetja. Določene študije pri ljudeh s kardiovaskularnimi boleznimi poročajo o antioksidantnem delovanju nekaterih kardioloških zdravil, predvsem selektivnih blokatorjev α in β adrenergičnih receptorjev (Rabasseda, 1998; Weglicki in sod., 1999; Packer in sod., 2001; Nakamura in sod., 2011) in ACE inhibitorjev (McMurray in Chopra, 1991; Weglicki in sod., 1999; Napoli in sod., 2004). Želeli smo tudi ugotoviti, ali obstajajo povezave med parametri oksidativnega stresa, vnetja in ehokardiografskimi parametri pri psih v različnih

stopnjah popuščanja srca, in med zdravljenimi ter nezdravljenimi psi, ki so bili v srčnem popuščanju.

5.1 N-TERMINALNI FRAGMENT NATRIURETIČNEGA PRO-PEPTIDA TIPA B

V diagnostiki srčnega popuščanja pri ljudeh je NT-proBNP vsesplošno uporabljen pokazatelj napredovalosti popuščanja srca (Collinson, 2005; Thygesen in sod., 2012) in sočasno tudi uporaben parameter pri diferencialni diagnostiki bolezni respiratornega sistema, kar so dokazali tako s študijami pri ljudeh (Dao in sod., 2001; Maisel in sod., 2002) kot pri živalih (DeFrancesco in sod., 2007; Boswood in sod., 2008). Vrednosti NT-proBNP v krvi naraščajo z napredovalostjo srčnega popuščanja pri ljudeh (Ozturk in sod., 2011) in pri psih (Oyama in sod., 2008; Serres in sod., 2009; Moesgaard in sod., 2011; Verk in sod., 2017).

Ugotovili smo, da so imeli psi v zadnji stopnji srčnega popuščanja, to je v ISACHC III, značilno višjo plazemsko koncentracijo NT-proBNP v primerjavi s psi v ISACHC II, ISACHC I skupini in z zdravimi psi. Sočasno pa nismo potrdili, da bi zdravljenje srčnega popuščanja značilno vplivalo na koncentracijo NT-proBNP, kljub temu pa je bila vrednost mediane pri nezdravljenih psih (4876 pmol/L) višja kot pri zdravljenih (3346 pmol/L), kar nakazuje na morebitni vpliv zdravljenja srčnega popuščanja na izločanje in sintezo tega natriuretičnega hormona. Do zanimivih rezultatov so prišli pri ljudeh s srčnim popuščanjem, kjer se je serumska koncentracija NT-proBNP v krvi razpolovila po uspešnem zdravljenju popuščanja srca v primerjavi z vrednostjo pred zdravljenjem (Nakano in sod., 2016). Izsledki te raziskave so lahko dobra podlaga za nadaljnje študije pri psih, ki bi ugotavljale vpliv zdravljenja srčnega popuščanja na koncentracijo NT-proBNP v krvi. V pregledu literature nismo našli raziskave, s katero bi ugotavljali, ali zdravljenje srčnega popuščanja vpliva na koncentracijo NT-proBNP v krvi pri psih. Leta 2017 so pri mačkah s CHF, ki je bilo posledica hipertrofne kardiomiopatije (HKM), ugotovili, da zdravljenje srčnega popuščanja značilno zniža koncentracijo NT-proBNP v serumu (Pierce in sod., 2017). Patogenezi zajetih kardiovaskularnih bolezni v naši raziskavi, to sta MDZ in DKM, se razlikujeta, toda z napredovanjem obe bolezni rezultirata v srčnem popuščanju, zato nas je zanimalo, ali se pri

kateri od teh bolezni izloča več NT–proBNP v primerjavi z drugo boleznijo. Statistična analiza ni pokazala značilnih razlik v plazemski koncentraciji NT–proBNP med obema skupinama psov, kar je v skladu z rezultati Oyame in sodelavcev (2008).

Glede na dejstvo, da se NT–proBNP izloča in da plazemska koncentracija narašča z napredovanjem srčnega popuščanja, nas je zanimalo, ali obstajajo povezave med plazemskimi vrednostmi tega parametra z vsemi drugimi izmerjenimi parametri v vseh treh ISACHC skupinah in v skupinah zdravljenih in nezdravljenih psov. Ugotovili smo značilne povezave med NT–proBNP in vitaminom E ter MDA, kar bo razloženo v poglavju o povezavah med vsemi izmerjenimi parametri (Poglavje 5.5 Povezave med parametri oksidativnega stresa, vnetja in ehokardiografskimi parametri).

5.2 POKAZATELJI OKSIDATIVNEGA STRESA

Večina raziskav, ki so preučevale vlogo oksidativnega stresa v patogenezi kardiovaskularnih bolezni pri ljudeh in živalih, ugotavlja tesno povezavo med povečanim obsegom oksidativnega stresa ter razvojem različnih kardiovaskularnih bolezni. To so ugotovili pri ljudeh (Yücel in sod., 1998; Wojciechowska in sod., 2014) in psih (Freeman in sod., 1998a; Freeman in sod., 1999) z DKM, CHF pri ljudeh (Diaz–Velez in sod., 1996; Keith in sod., 1998; White in sod., 2006; Karabacak in sod., 2014) in psih (Freeman in sod., 2005), koronarni bolezeni pri ljudeh (Blankenberg in sod., 2003; Flores–Mateo in sod., 2009; Bhat in sod., 2012; Holley in sod., 2017) in drugih boleznih obtočil pri ljudeh (ishemična kardiomiopatija, ateroskleroza, HKM) (McMurray in sod., 1993; Dhalla in Singal, 1994; Dimitrow in sod., 2009; Jawalekar in sod., 2010).

Malondialdehid je najpogosteje uporabljen pokazatelj lipidne peroksidacije tako v študijah kardiovaskularnih bolezni pri ljudeh (Mak in Newton, 2001) in živalih (Ayala in sod., 2014). Raziskave pri ljudeh so pokazale, da imajo ljudje s kardiovaskularnimi boleznimi povišane koncentracije MDA v primerjavi z zdravimi ljudmi (Ghatak in sod., 1996; Diaz–Velez in sod., 1996; Keith in sod., 1998; Castro in sod., 2002; White in sod., 2006; Jawalekar in sod., 2010; Wojciechowska in sod., 2014). Nasprotno pa v naši raziskavi nismo ugotovili značilno višje

koncentracije MDA pri posameznih ISACHC skupinah psov v primerjavi z zdravimi psi, kar je v skladu z nekaterimi drugimi raziskavami pri psih (Freeman in sod., 1999; Freeman in sod., 2005; Reimann in sod., 2017). Ob tem pa rezultati raziskave Freemanove in sodelavcev (2005) kažejo na povečan obseg lipidne peroksidacije pri psih s CHF, saj so ugotovili značilno višjo koncentracijo F2-izoprostanov v krvi v skupini psov s CHF v primerjavi z zdravimi. Prav tako z raziskavo pri psih niso uspeli potrditi, da se koncentracije MDA v krvi zvišujejo z napređovalostjo srčnega popuščanja (Reimann in sod., 2017), kar je v skladu z našimi ugotovitvami. Pri naši študiji smo ugotovili značilno nižje plazemske koncentracije MDA v skupini ISACHC II v primerjavi s psi v skupini ISACHC I in psi v skupini ISACHC III. Rezultati nakazujejo, da je obseg lipidne peroksidacije povečan v začetni stopnji in v zadnji stopnji srčnega popuščanja, kar nakazuje, da se v ISACHC II stopnji srčnega popuščanja najverjetneje vzpostavijo kompenzatorni antioksidantni mehanizmi, ki zmanjšujejo obseg lipidne peroksidacije. V nasprotju z našimi pričakovanji pa med zdravimi psi in psi v posameznih ISACHC skupinah nismo ugotovili značilne razlike v koncentraciji MDA.

Pričakovali smo, da bomo, podobno kot pri ljudeh (Ghatak in sod., 1996; Castro in sod., 2002; White in sod., 2006), ugotovili značilno nižje koncentracije MDA v skupini zdravljenih psov v primerjavi z nezdravljenimi, vendar tega nismo ugotovili. Ti rezultati nakazujejo, da zdravljenje srčnega popuščanja pri psih ne vpliva na proces lipidne peroksidacije. Številne študije dokazujejo antioksidatno aktivnost nekaterih kardioloških zdravil, kot so selektivni antagonisti α in β adrenergičnih receptorjev (Rabasseda, 1998; Weglicki in sod., 1999; Packer in sod., 2001; Nakamura in sod., 2011), ACE inhibitorji (Napoli in sod., 2004) in blokatorji kalcijevih kanalčkov (Weglicki in sod., 1990; Hornig in sod., 2001). Nekatera od teh zdravil, karvedilol (Kukin in sod., 1999; Chin in sod., 2003; Castro in sod., 2005; Nakamura in sod., 2011), metoprolol (Kukin in sod., 1999; Nakamura in sod., 2011), sulfhidril ACE inhibitorji (Napoli in sod., 2004) in inotropi (milrinon in dobutamin) (White in sod., 2006) dokazano zmanjšujejo obseg lipidne peroksidacije in posledično koncentracijo MDA pri zdravljenih ljudeh s srčnim popuščanjem.

Zanimalo nas je tudi, ali se koncentracije MDA razlikujejo med psi, ki so oboleli za MDZ oziroma DKM. Med skupinama psov nismo ugotovili značilnih razlik v plazemski

koncentraciji MDA, kar nakazuje, da se obseg lipidne peroksidacije med obema boleznima ne razlikuje. Rezultati so v skladu z ugotovitvami Freemanove in sodelavcev (2005), ki prav tako niso ugotovili značilnih razlik v koncentraciji MDA, pa tudi ne v koncentraciji F2-izoprostanov med psi z DKM in MDZ.

5.3 ANTIOKSIDANTNI PARAMETRI

5.3.1 Glutation peroksidaza (GPX)

Intracelularni antioksidantni encimi, kamor spadajo GPX, SOD, katalaza in drugi, predstavljajo primarni antioksidantni sistem v organizmu, ki z odstranjevanjem ROS varujejo organizem pred oksidativnim stresom (Gutteridge, 1994; Halliwell in Cross, 1994; Mates, 2000; Giordano, 2005; Valko in sod., 2007). Številne raziskave so pokazale, da imajo ljudje s srčnim popuščanjem nizke vrednosti tako encimskih antioksidantov (SOD, GPX) kot tudi neencimskih antioksidantov (vitamin E, vitamin C, CoQ₁₀) (Ghatak in sod., 1996; Yücel in sod., 1998; Serdar in sod., 2001; Castro in sod., 2002; Polidori in sod., 2002; Blankenberg in sod., 2003; Senes in sod., 2008; Madmani in sod., 2014). Prav tako kot pri ljudeh so tudi pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi ugotovili spremenjene vrednosti antioksidantnega statusa, med drugim povečano aktivnost GPX (Freeman in sod., 1998a; Freeman in sod., 1999; Verk, 2010). Nizke vrednosti antioksidantnih encimov, predvsem GPX, so pri bolnikih s koronarno boleznijo v srčnem popuščanju napovednik slabšega izida bolezni (Blankenberg in sod., 2003; Flores–Mateo in sod., 2009).

Najpomembnejši kompenzatorni antioksidantni encim v živalskem organizmu je GPX, ki med drugim varuje celične membrane pred lipidno peroksidacijo (Brigelius–Flohé in sod., 2002). V naši raziskavi nismo ugotovili značilnih razlik v aktivnosti GPX med bolnimi in zdravimi psi. Neznačilno višje aktivnosti GPX pri skupini ISACHC I ($p = 0,059$) in ISACHC II ($p = 0,051$) psov v primerjavi z zdravimi, nakazujejo na aktivacijo encimskih obrambnih mehanizmov kot odgovor na povečan oksidativni stres. Rezultati nakazujejo, da se v razvoju

srčnega popuščanja antioksidantni mehanizmi ne iztrošijo, ampak aktivirajo, najverjetneje kot del kompenzatornega mehanizma. Značilno višjo aktivnost GPX pri psih z DKM v primerjavi z zdravimi je ugotovila Freemanova s sodelavci (1999), medtem ko značilne povezave med aktivnostjo tega encima in napredovanjem bolezni ni dokazala. S študijo leta 2010 (Verk, 2010) smo ugotovili značilno višje aktivnosti GPX v skupini ISACHC III v primerjavi z zdravimi psi, česar s to študijo nismo potrdili. Čeprav smo predvidevali, da se z napredovanjem srčnega popuščanja povečuje oksidativni stres in zaradi tega znižuje aktivnost GPX, rezultati naše raziskave tega niso pokazali.

Pri obširnem pregledu literature, z izjemo naše raziskave leta 2010 (Verk, 2010), kjer nismo ugotovili vpliva zdravljenja srčnega popuščanja na aktivnost GPX, nismo našli prispevka, ki bi preučeval učinek zdravljenja srčnega popuščanja na aktivnosti GPX v krvi pri psih. Med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov nismo ugotovili značilnih razlik v aktivnosti GPX v krvi, kar kaže na to, da zdravljenje ne vpliva na aktivnost tega antioksidantnega encima.

Ugotovili pa smo značilno višje aktivnosti GPX pri psih, ki so obboleli za MDZ v primerjavi s psi, ki so imeli DKM. Najverjetnejši razlog za tak rezultat je starostna razlika med psi z MDZ in DKM, saj so bili psi z MDZ značilno starejši od psov z DKM; študije poročajo, da imajo starejši psi višjo aktivnosti GPX v krvi v primerjavi z mlajšimi (Stowe in sod., 2006). Praviloma se MDZ pojavlja pri malih pasmah psov, z razliko od DKM, ki se pojavlja pri srednje velikih do velikih pasmah psov. Morda ti rezultati nakazujejo, da lahko telesna teža vpliva na aktivnost GPX. V času naše študije nismo zasledili literaturnih podatkov, ki nam bi potrdili našo tezo.

5.3.2 Vitamin E in LS–VE

Vitamin E ali α -tokoferol je glavni in najpomembnejši v maščobi topen antioksidant, ki spada v veliko skupino neencimskih antioksidantov. Ima pomembno vlogo pri nevtralizaciji ROS, ki nastajajo v večjem številu pri povečanem oksidativnem stresu, in predvsem ščiti celične membrane pred lipidno peroksidacijo (Meydani, 1995; Kohen in Nyska, 2002; Schneider,

2005). Vitamin E sintetizirajo rastline in cianobakterije, zato moramo ljudje ter psi dobiti vitamin E preko hrane (Schneider, 2005). V maščobi topen vitamin E nima specifičnega prenašalca v plazmi in ga prenašajo vsi plazemski lipoproteini. Standardizacija koncentracije vitamina E glede na koncentracijo trigliceridov in holesterola podaja natančnejšo vrednost vitamina E v krvi (Thurnham in sod., 1986; Jordan in sod., 1995; Winbauer in sod., 1999).

Med posameznimi ISACHC skupinami bolnih psov in zdravimi psi ter zdravljenimi in nezdravljenimi psi nismo ugotovili značilnih razlik v plazemskih koncentracijah vitamina E in vrednostih LS–VE, kar kaže, da je ravnovesje vitamina E v sistemske krvnem obtoku ohranjeno pri psih z MDZ in DKM. Pri ljudeh (Serdar in sod., 2001; Polidori in sod., 2002; Polidori in sod., 2004; Cavalca in sod., 2013) in psih (Freeman in sod., 2005) so ugotovili, da so serumske ali plazemske koncentracije vitamina E znižane pri kardiovaskularnih bolnikih v primerjavi z zdravimi, kar z našo študijo nismo ugotovili. Podobno tega niso ugotovili z določenimi študijami pri ljudeh (Keith in sod., 1998; de Lorgeril in sod., 2001) in psih (Freeman in sod., 1998a; Freeman in sod., 1999; Freeman in sod., 2006; Reimann in sod., 2017). Ugotovili smo tudi, da zdravljenje srčnega popuščanja ne vpliva na koncentracijo vitamina E v krvi, čeprav obstajajo študije, ki dokazujejo antioksidatno delovanje nekaterih kardioloških zdravil, kot so selektivni antagonisti α in β adrenergičnih receptorjev (Rabasseda, 1998; Weglicki in sod., 1999; Packer in sod., 2001; Nakamura in sod., 2011), ACE inhibitorji (Napoli in sod., 2004) in blokatorji kalcijevih kanalčkov (Weglicki in sod., 1990; Hornig in sod., 2001).

Nadalje smo ugotovili, da ni bilo značilnih razlik v plazemskih koncentracijah vitamina E in vrednostih LS–VE med psi z MDZ in DKM, kar je v skladu z rezultati (vitamin E) Freemanove in sodelavcev (2005). Naši rezultati kažejo, da zdravljenje srčnega popuščanja ne vpliva na plazemsko koncentracijo vitamina E in vrednosti LS–VE.

5.4 PARAMETRI VNETJA

Vsak stik organizma z določenim antigenom, mehanično poškodbo, kemično poškodbo ali bolezenskim procesom privede do procesa vnetja. Vnetje je obrambni mehanizem, ki obvaruje, ozdravi in obnovi organizem pred poškodbami tkiv (Ackermann, 2007). Kljub mnogim raziskavam povezava med vnetjem in patogenezo kardiovaskularnih bolezni še ni natančno pojasnjena. Številni raziskovalci poročajo o značilno višji koncentraciji CRP (Elster in sod., 1956; Huang in sod., 2004; Anand in sod., 2005; White in sod., 2006; Senes in sod., 2008; Wojciechowska in sod., 2014; Ostrowska in sod., 2017) in proinflammatory citokinov v krvi, največkrat TNF- α , IL-1 ter IL-6 (Levine in sod., 1990; Ferrari in sod., 1995; Testa in sod., 1996; Torre-Amione in sod., 1996; Bozkurt, 2000; Ansari in sod., 2012; Chen in sod., 2014) pri ljudeh s srčnim popuščanjem. Pri psih z MDZ in DKM (Rush in sod., 2006; Cunningham in sod., 2012; Lukman, 2012; Reimann in sod., 2016) so dokazali povečano serumsko ali plazemsko koncentracijo CRP v primerjavi z zdravimi psi. Koncentracije CRP se zvišujejo z napredovanjem srčnega popuščanja pri psih (Lukman, 2012; Polizopoulou in sod., 2015). Pri psih niso ugotovili značilnih sprememb koncentracij interlevkinov med psi obolelimi za MDZ (Zois in sod., 2012) ali DKM (Freeman in sod., 1998b) ter kontrolno skupino zdravih psov. Proinflammatory citokini so udeleženi v procesih miokardnega preoblikovanja (spremembe v strukturi in funkciji kardiomiocitov in ekstracelularnega matriksa v srčnem tkivu), inhibicije apoptoze kardiomiocitov, endotelijske disfunkcije in ventrikularne fibroze (Yndestad in sod., 2007; Gullestad in sod., 2012).

5.4.1 C-reaktivni protein (CRP)

Najpogosteje uporabljen in preučen pokazatelj vnetja v krvi pri ljudeh s kardiovaskularnimi boleznimi je CRP. Spada med proteine akutne faze vnetja in se sintetizira v jetrih. Številne študije pri ljudeh so pokazale, da so koncentracije CRP v krvi povišane pri ljudeh s popuščanjem srca zaradi različnih kardiovaskularnih bolezni, kot so: koronarna bolezen, DKM, MDZ in druge bolezni srca (Elster in sod., 1956; Huang in sod., 2004; Anand in sod.,

2005; White in sod., 2006; Wojciechowska in sod., 2014; Ostrowska in sod., 2017). Z našo raziskavo smo ugotovili, da imajo psi v zadnji stopnji srčnega popuščanja, torej v ISACHC III skupini, značilno višjo serumsko koncentracijo CRP v primerjavi z zdravimi psi, kar sovпада z rezultati drugih študij pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi (Rush in sod., 2006; Cunningham in sod., 2012; Lukman, 2012; Reimann in sod., 2016). Nasprotno pa Ljungvall in sodelavci (2010) niso ugotovili značilno višje koncentracije CRP pri psih z različnimi stopnjami MDZ (brez srčnega popuščanja) kot tudi ne v primerjavi z zdravimi psi. Mi smo ugotovili tudi višje koncentracije CRP v ISACHC II v primerjavi z zdravimi psi, toda razlika ni bila značilna ($p = 0,014$). Rezultati nakazujejo, da je stanje dekompenziranega srčnega popuščanja pri psih glavni vzrok povečanih koncentracij CRP v krvi; očiten pa je trend povečevanja koncentracije CRP z napredovanjem srčnega popuščanja. Prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v koncentraciji CRP med skupinama zdravljenih in nezdravljenih psov, kar so že ugotovili pri ljudeh (White in sod., 2006). Ti rezultati nakazujejo, da zdravljenje srčnega popuščanja pri psih ne vpliva na sintezo CRP. Cunningham in sodelavci (2012) so ugotovili, da imajo psi z DKM višje plazemske koncentracije CRP v primerjavi s psi z MDZ. Tudi v naši študiji so imeli psi z DKM (mediana 6,25 mg/L) višje koncentracije CRP v primerjavi s psi z MDZ (mediana 3,31 mg/L), vendar razlika ni bila značilna ($p = 0,83$). Vzrok za tak rezultat je lahko premajho število psov z določeno boleznijo.

5.4.2 Tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)

TNF- α je proinflammatory citokin, ki ima ključno vlogo v patogenezi srčnega popuščanja (Briasoulis in sod., 2016). Glavni vir sinteze in izločanja TNF- α so aktivirani makrofagi in mononuklearne krvne celice (monociti in limfociti), proizvajajo ga tudi druge telesne celice kot so: endotelijske celice, celice gladke mišičnine žil, kardiomiociti in fibroblasti (Adamopoulos in sod., 2001). Pri bolnikih z DKM in blagim srčnim popuščanjem so ugotovili, da je povečano izražanje TNF- α v srcu ključno v patogenezi te bolezni. Ugotovili so tudi značilno pozitivno povezavo med koncentracijo TNF- α in aktivnostjo oxLDL ter na osnovi rezultatov raziskave zaključili, da v srcu povečano izražanje tega proinflammatory citokina izzove oksidativni stres, kar vodi v disfunkcijo levega prekata pri bolnikih z DKM

(Tsutamoto in sod., 2001). Pri obširnem pregledu literature smo ugotovili, da je objavljenih zelo malo kliničnih študij, ki bi ugotavljale koncentracije TNF- α (Freeman in sod., 1998b) oziroma TNF-podobno aktivnost (De Laforcade in sod., 2003) v krvi pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi. Pri psih z eksperimentalno povzročenim popuščanjem srca, ki so ga povzročili z umetno povzročeno tahikardijo, so ugotovili, da v razvoju popuščenja srca ne pride do povišanja koncentracij TNF- α in IL-6 v arterijski krvi in koronarnem sinusu (Recchia in sod., 2000). V nasprotju s študijami pri ljudeh pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi (DKM) niso ugotovili zvišanih koncentracij TNF- α v krvi (Freeman in sod., 1998b). Kljub ugotovitvam zgoraj omenjenih študij pri psih smo pričakovali povišane serumske koncentracije TNF- α pri psih s srčnim popuščanjem v primerjavi z zdravimi psi, saj so to dokazale številne klinične študije pri ljudeh s popuščanjem srca (Levine in sod., 1990; Ferrari in sod., 1995; Aukrust in sod., 1999; Tsutamoto in sod., 2001; Ansari in sod., 2012; Chen in sod., 2014). V naši raziskavi nismo ugotovili značilnih razlik v serumskih koncentracijah TNF- α med posameznimi skupinami ISACHC psov in zdravimi, kar sovпада z rezultati drugih študij pri psih (Freeman in sod., 1998b; De Laforcade in sod., 2003). Ne glede na rezultate statistične analize naši rezultati kažejo trend povečevanja mediane koncentracije TNF- α od ISACHC I do ISACHC III skupine (3,90 pg/mL; 6,81 pg/mL; 7,94 pg/mL), kar se odraža v značilno višji koncentraciji CRP v najvišji stopnji srčnega popuščenja v primerjavi z zdravimi psi.

Prav tako nismo ugotovili razlik v koncentraciji TNF- α med nezdravljenimi in zdravljenimi psi. Potrebno je poudariti, da so vzroki popuščenja srca pri ljudeh največkrat napredovanje koronarne bolezni, DKM in ishemične kardiomiopatije, kar se odraža z večjo vnetno reakcijo (Hirschfield in Pepys, 2003; Yndestad in sod., 2007; Gullestad in sod., 2012). Nasprotno je pri psih najpogostejši vzrok popuščenja srca DKM ali MDZ, zlasti slednja pa je kronična dolgotrajna bolezen starejše populacije psov, kar se lahko odraža tudi na rezultatih koncentracij TNF- α . V naši študiji nismo ugotovili značilnih razlik v serumski koncentraciji TNF- α med psi z MDZ in DKM. De Laforcade in sodelavci (2003) so ugotovili, da imajo psi z DKM značilno nižje koncentracije TNF-podobne aktivnosti v primerjavi s psi z MDZ; toda metoda, ki so jo uporabili (citotoksična študija na celični liniji (Espevik in Nissen-Meyer, 1986)), ni primerljiva z našo. Glede na rezultate naše raziskave lahko sklepamo, da v patogenezi popuščenja srca pri psih ne pride do povečanega izločanja in sinteze TNF- α .

5.4.3 Interlevkin-6 (IL-6)

Interlevkin-6 je proinflammatory citokin in ga izločajo vse celice z jedrom v srcu kot tudi v drugih tkivih (adipociti, gladke mišice tunike medie krvnih žil, celice žilnega endotelija, makrofagi) (Adamopoulos in sod., 2001; Kanda in Takahashi, 2004; Chen in sod., 2014). V klinični študiji pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi, ki je poleg drugih citokinov obravnavala tudi IL-6, se koncentracije IL-6 niso značilno razlikovale med psi z MDZ in kontrolno skupino zdravih psov (Zois in sod., 2012). Tudi v naši raziskavi nismo ugotovili značilnih razlik v serumski koncentraciji IL-6 med psi v različnih stopnjah srčnega popuščanja in zdravimi psi, za razliko od rezultatov študij pri ljudeh, kjer so ugotovili značilno višje koncentracije IL-6 pri ljudeh s popuščanjem srca kot posledico koronarne bolezni (Aukrust in sod., 1999; Blakenberg in sod., 2003; White in sod., 2006; Chen in sod., 2014), kroničnim popuščanjem srca (Torre-Amione in sod., 1996; Ptaszynska-Kopczynska in sod., 2017), akutnim srčnim popuščanjem (Pudil in sod., 2010) in DKM (Aukrust in sod., 1999). Naši rezultati niso pokazali značilnih razlik v koncentraciji IL-6 med skupinama nezdravljenih in zdravljenih psov, kot tudi ne med psi z DKM in MDZ. Rezultati naše raziskave kot tudi rezultati Zois in sodelavcev (2012) kažejo, da ta proinflammatory citokin nima vloge v razvoju teh dveh bolezni srca. Morda je vzrok tudi v visoki meji detekcije metod določanja koncentracije IL-6 kljub uporabi vrstno-specifičnih imunokemijskih metod (Zois in sod., 2012) ali pa v kratki razpolovni dobi citokinov v sistemske krvnem obtoku, ki je približno 2–4 ure (Zhou in sod., 2010).

5.4.4 Bela krvna slika

Z analizo bele krvne slike pri posameznih skupinah psov smo ugotovili, da imajo psi v ISACHC III skupini značilno višjo skupno število levkocitov in relativne vrednosti nevtrofilnih granulocitov v primerjavi s psi v ISACHC I in zdravimi psi; sočasno pa so imeli psi v ISACHC III značilno nižjo relativno vrednost limfocitov v primerjavi s psi v ISACHC II in zdravimi psi. Naši rezultati sovpadajo z rezultati študij pri psih s popuščanjem srca

(Farabaugh in sod., 2004; Lukman, 2012). Do podobnih rezultatov so prišli tudi s študijami pri ljudeh, kjer so ugotovili, da imajo ljudje s popuščanjem srca značilno zvišano skupno število levkocitov in absolutno število nevtrofilnih granulocitov (Cruz-Torres in sod., 2011; Ostrowska in sod., 2017) in znižano absolutno število limfocitov (Karabacak in sod., 2014; Ostrowska in sod., 2017) v primerjavi z zdravimi ljudmi. Absolutno število monocitov je bilo značilno višje v skupini ISACHC III psov v primerjavi s skupino zdravih psov, kar nakazuje na prisotnost kroničnega vnetja pri dekompenziranem popuščanju srca. Nevtrofilni granulociti najverjetneje ne delujejo neposredno na kontraktilno disfunkcijo miokarda, lahko pa je povečanje levkocitov in nevtrofilnih granulocitov posredni pokazatelj sodelovanja vnetja pri patogenezi srčnega popuščanja. Posredno pa bi lahko delovali na napredovanje srčnega popuščanja preko proteolitičnih poškodb celic, agregacije levkocitov in z morebitno obstrukcijo manjših žil (Madjid in Fatemi, 2013). Na tem mestu je potrebno upoštevati tudi morebitno povečano izločanje ROS, ki jih proizvajajo nevtrofilni granulociti za potrebe fagocitoze, ki bi lahko škodljivo delovali na celice kardiovaskularnega sistema. Povečano skupno število levkocitov in parametrov diferencialne bele krvne slike so pri ljudeh s srčnim popuščanjem v močni povezavi z višjo mortalnostjo in slabšim izidom bolezni (Madjid in Fatemi, 2013). S pričujočo raziskavo nismo ugotavljali izida bolezni in preživetja psov s popuščanjem srca, vsekakor bi bilo zanimivo ugotoviti te povezave tudi pri psih.

Med skupino nezdravljenih in zdravljenih psov nismo ugotovili značilnih razlik v vrednostih parametrov bele krvne slike, kar kaže na to, da zdravljenje ne vpliva na parametre bele slike. Prav tako nismo ugotovili značilnih razlik v vrednostih parametrov bele krvne slike ne med psi z MDZ in DKM.

5.5 POVEZAVE MED PARAMETRI OKSIDATIVNEGA STRESA, VNETJA IN EHOKARDIOGRAFSKIMI PARAMETRI

S študijami pri ljudeh so raziskovalci želeli ugotoviti, ali obstajajo povezave med oksidativnim stresom in vnetjem pri bolnikih s kardiovaskularnimi boleznimi (Keith in sod., 1998; Tsutamoto in sod., 2001; White in sod., 2006; Yndestad in sod., 2007; Siti in sod.,

2015; Briasoulis in sod., 2016). Ugotovili smo, da v skupinah psov v ISACHC I in ISACHC II ni značilnih povezav med MDA in vnetnimi parametri ter parametri bele krvne slike. V ISACHC III skupini pa smo ugotovili značilno pozitivno povezavo med MDA in TNF- α , kar nakazuje, da se z višanjem koncentracije MDA višajo tudi koncentracije TNF- α . Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da obseg lipidne peroksidacije sovpada z vnetjem in s tem na povezavo oksidativnega stresa in vnetja v tej najvišji stopnji srčnega popuščanja. Do podobnih ugotovitev so prišli pri ljudeh (Keith in sod., 1998), kjer so ugotovili značilno pozitivno povezavo med serumskimi koncentracijami TNFR in MDA. Tsutamoto in sodelavci (2001) pa so ugotovili značilno pozitivno povezavo med koncentracijo TNF- α in vrednostjo oxLDL pri bolnikih s srčnim popuščanjem. Povezavo oksidativnega stresa in vnetja v ISACHC III skupini psov dodatno potrjujeta značilni negativni povezavi absolutnega števila in relativnih vrednosti nevtrofilnih granulocitov z LS-VE ter značilna negativna povezava med aktivnostjo GPX in absolutnim številom monocitov. Vsi ti rezultati kažejo na izčrpavanje antioksidantnega obrambnega sistema z naraščanjem vnetja.

V skupini nezdravljenih psov smo ugotovili značilno pozitivno povezavo med MDA in relativno vrednostjo nevtrofilnih granulocitov ter značilno negativno povezavo med MDA in relativno vrednostjo ter absolutnim številom limfocitov, kar nakazuje na povezavo oksidativnega stresa in vnetja v tej skupini bolnih psov. Zanimiva je tudi značilna negativna povezava med GPX in TNF- α v tej skupini psov, ki nakazuje, da se z naraščanjem koncentracije TNF- α aktivnost GPX znižuje. Ti rezultati nakazujejo na izčrpavanje tega antioksidantnega encima z naraščanjem vnetja ter s tem na povezavo oksidativnega stresa in vnetja v skupini nezdravljenih psov.

V skupini zdravljenih psov ni bilo značilnih povezav med MDA in vnetnimi parametri. Smo pa tudi v tej skupini bolnih psov ugotovili nekaj značilnih povezav, ki nakazujejo na povezavo vnetja in oksidativnega stresa. Ugotovili smo namreč značilni pozitivni povezavi koncentracije vitamina E in vrednosti LS-VE s koncentracijo TNF- α ter značilno negativno povezavo med GPX in absolutnim številom monocitov. Slednja kaže na zniževanje aktivnosti GPX z rastjo kroničnega vnetja. Zanimivi sta tudi značilni negativni povezavi vrednosti LS-VE s skupnim številom levkocitov in nevtrofilnih granulocitov, kar kaže na to, da z naraščanjem vnetja pada koncentracija vitamina E. Povečan obseg vnetja v tej skupini psov bi

lahko bil posledica povečane tvorbe ROS, kar bi lahko imelo za posledico zniževanje koncentracije vitamina E in aktivnosti GPX, saj se porabljata za nevtralizacijo ROS.

Nadalje smo v skupini zdravljenih psov ugotovili značilni pozitivni povezavi med koncentracijami NT-proBNP in MDA ter med NT-proBNP in vitaminom E, kar kaže, da se z napredovanjem srčnega popuščanja obseg lipidne peroksidacije in koncentracija vitamina E povečujeta. Prav tako smo v skupini zdravljenih psov ugotovili značilno pozitivno povezavo koncentracije MDA s koncentracijami vitamina E in vrednostmi LS-VE, kar nakazuje, da se koncentracije vitamina E in vrednosti LS-VE povečajo z večjim obsegom lipidne peroksidacije. Ti rezultati nakazujejo na morebitno sproščanje vitamina E iz maščobnih depojev, in sicer kot odgovor na povečan obseg lipidne peroksidacije zaradi povečanega oksidativnega stresa.

S študijami so ugotovili značilno povezavo med koncentracijo CRP v krvi in povišanim absolutnim številom nevtrofilnih granulocitov pri psih z različnimi sistemskimi boleznimi (Ceron in sod., 2005), pregledni članek drugih veterinarskih študij pa poroča o šibki povezavi med CRP in skupnim številom levkocitov in nevtrofilnih granulocitov (Kjelgaard-Hansen in sod., 2003; Cray in sod., 2007). Lukman (2012) je ugotovila značilno pozitivno povezavo med serumsko koncentracijo CRP in skupnim številom levkocitov ter nevtrofilnih granulocitov pri psih v ISACHC III stopnji popuščanja srca. V naši raziskavi smo s povezavami med CRP in parametri bele krvne slike ugotovili značilno pozitivno povezavo med CRP in relativno vrednostjo ter absolutnim številom monocitov v ISACHC I skupini, kar nakazuje na začetek vnetnega procesa pri asimptomatskih bolnikih z MDZ in DKM. V ISACHC II skupini smo ugotovili močno pozitivno povezavo med CRP in absolutnim številom ter relativno vrednostjo nevtrofilnih granulocitov, kar kaže na akutnejši vnetni proces v napredovanju srčnega popuščanja. V ISACHC II skupini psov smo ugotovili tudi značilno pozitivno povezavo med CRP in TNF- α ter med CRP in IL-6, kar nakazuje, da z naraščanjem koncentracije proinflammatoryh citokinov narašča tudi koncentracija CRP pri napredovanju popuščanja srca. Tudi pri ljudeh s srčnim popuščanjem so ugotovili tovrstno povezavo (Ansari in sod., 2012). V skupini ISACHC III in skupini nezdravljenih psov smo ugotovili značilno pozitivno povezavo koncentracije CRP z relativno vrednostjo monocitov. Vse pozitivne značilne povezave med CRP in levkociti, nevtrofilnimi granulociti ter monociti

nakazujejo, da se z napredovanjem srčnega popuščanja vzpostavijo mehanizmi sistemskega vnetnega odziva.

Poleg omenjenih značilnih povezav pokazatelja srčnega popuščanja, NT-proBNP, z nekaterimi parametri oksidativnega stresa v skupini zdravljenih psov, smo v nekaterih skupinah bolnih psov ugotovili tudi značilne povezave parametrov vnetja in bele krvne slike s koncentracijo NT-proBNP. Tako smo v ISACHC II skupini ugotovili značilno pozitivno povezavo med koncentracijami NT-proBNP in IL-6 ter v ISACHC III in skupini nezdravljenih psov značilno pozitivno povezavo med NT-proBNP in relativno vrednostjo monocitov, kar kaže na kronično vnetje v napredujoči oziroma dekompenzirani stopnji bolezni srca. Tudi s študijo pri ljudeh s popuščanjem srca so ugotovili značilno povezavo med BNP in IL-6 (Emdin in sod., 2004), kar nakazuje na tesno povezavo med endokrino aktivnostjo srca in vnetjem v razvoju popuščanja srca. V skupini nezdravljenih psov smo ugotovili značilno pozitivno povezavo med TNF- α in skupnim številom levkocitov, kar dodatno kaže na prisotnost vnetja v tej nestabilni skupini bolnikov (razen enega, vsi v ISACHC III).

Z analizo povezav med ehokardiografskimi parametri in vsemi parametri oksidativnega stresa (MDA, GPX, vitamin E in LS-VE), vnetja (CRP, TNF- α , IL-6) in parametri bele krvne slike smo v skupini ISACHC II ugotovili značilne negativne povezave vala A s koncentracijo IL-6, CRP ter absolutnim številom in relativnimi vrednostmi nevtrofilnih granulocitov, kar nakazuje na povečan obseg vnetja v napredovanju srčnega popuščanja, kjer pride do zmanjšanja vala A. Zmanjšanje vala A je posledica poviševanja tlaka v levem preddvoru z napredovanjem srčnega popuščanja (Fuentes, 2008).

V skupini ISACHC III se je pokazala značilna negativna povezava med IL-6 in E/Ar ter značilna pozitivna povezava med valom E in relativno vrednostjo monocitov. Slednja nakazuje na povečan obseg vnetja v napredovanju srčnega popuščanja, saj pride do povečanja E vala pri napredovanju srčnega popuščanja (Fuentes, 2008).

Pri nezdravljenih psih smo ugotovili negativno značilno povezavo med razmerjem LAD/Ao in vitaminom E. Razmerje LAD/Ao se večja z napredovanjem srčnega popuščanja, ob

hkratnem zmanjševanju koncentracije vitamina E, kar nakazuje na porabo vitamina E, najverjetneje zaradi povečanega oksidativnega stresa, pri popuščanju srca.

Pri zdravljenih psih smo ugotovili značilno negativno povezavo med valom A in CRP, kar nakazuje na manjšanje hitrosti vala A ob napredovalem vnetju in srčnem popuščanju. Zmanjšanje vala A je logična posledica poviševanja tlaka v levem preddvoru z napredovanjem srčnega popuščanja (Fuentes, 2008).

Nekatere študije pri ljudeh poročajo o močnih negativnih povezavah med plazemskimi koncentracijami proinflammatoryh citokinov in LVEF ter FS, ki sta dobra pokazatelja napredovanja srčnega popuščanja (Aukrust in sod., 1999; Aukrust in sod., 2005), nekatere pa teh povezav niso dokazale (Ansari in sod., 2012). V naši raziskavi smo v skupini zdravljenih psov ter v ISACHC III skupini ugotovili značilno negativno povezavo med koncentracijami TNF- α in vrednostmi FS, kar kaže na slabšanje miokardne funkcije ob napredovalem vnetju.

Naša študija ima nekaj pomanjkljivosti. Ena od teh je, da skupine psov niso bile uravnotežene glede spola in da so bili psi v kontrolni skupini mlajši od bolnih psov, zaradi česar ne moremo popolnoma izključiti vpliva spola in starosti na merjene parametre (Vajdovich in sod., 1997; Todorova in sod., 2005; Stowe in sod., 2006; Tomsich in sod., 2016). Pri kontrolni skupini psov nismo naredili ehokardiografije, vendar smo merili koncentracijo NT-proBNP, ki bi pri tej skupini lahko izključila bolezen srca. Spolnega statusa pacientov nismo beležili in nismo določali ocene telesne kondicije, čeprav ni bil noben pes ekstremno shujšan ali predebel. V študijo so bili vključeni psi z dvema različnima srčnima boleznima, ki imata različno etiologijo in patogenezo nastanka.

Iz naše raziskave lahko kljub nekaterim neznačilnim razlikam parametrov oksidativnega stresa in nekaterih vnetnih parametrov med skupinami psov izpostavimo nekaj zaključkov in ugotovitev. Psi v najvišji stopnji popuščanja srca imajo značilno višjo koncentracijo CRP in skupno število levkocitov, nevtrofilnih granulocitov ter monocitov v primerjavi z zdravimi psi. Zdravljenje srčnega popuščanja nima vpliva na parametre oksidativnega stresa in vnetja. Nekatere značilne povezave, kot je povezava med MDA in TNF- α , nakazujejo, da gre v patogenezi srčnega popuščanja za prepletanje oksidativnega stresa in vnetja. Z rezultati naše študije smo dobili vpogled v nivo oksidativnega stresa in vnetja ter njuno prepletanje pri psih

z MDZ in DKM v različnih stopnjah popuščanja srca. Značilne povezave med parametri oksidativnega stresa in vnetja nakazujejo, da igrata pomembno vlogo v razvoju popuščanja srca pri psih tako oksidativni stres kot tudi vnetje.

6 SKLEPI

1. Plazemska koncentracija MDA pri psih z MDZ in DKM se ne zvišuje s stopnjo srčnega popuščanja in ni višja v primerjavi z zdravimi psi.
2. Antioksidantni obrambni mehanizem ni iztrošen pri psih z MDZ in DKM ne glede na stopnjo bolezni. Plazemska koncentracija vitamina E in aktivnost GPX se ne znižujeta s stopnjo srčnega popuščanja pri psih z DKM in MDZ in nista nižji v primerjavi z zdravimi psi.
3. Zdravljenje srčnega popuščanja ne vpliva na parametre oksidativnega stresa in vnetja.
4. Serumske koncentracije IL-6 in TNF- α se ne zvišujejo s stopnjo srčnega popuščanja in niso višje v primerjavi z zdravimi psi.
5. V patogenezi srčnega popuščanja pride do vnetja, saj smo ugotovili značilno višje koncentracije CRP pri psih v ISACHC III stopnji v primerjavi z zdravimi psi. To potrjujejo tudi značilno povišano skupno število levkocitov in nevtrofilnih granulocitov pri psih v ISACHC III stopnji popuščanja srca v primerjavi z ISACHC I stopnjo in zdravimi psi.
6. Psi z MDZ in DKM niso imeli sočasno povišane koncentracije MDA in serumskih koncentracij pokazateljev vnetja (IL-6, TNF- α in CRP). Ugotovili smo močno pozitivno povezavo med koncentracijama MDA in TNF- α pri psih v ISACHC III stopnji ter negativno povezavo med koncentracijama GPX in TNF- α v skupini nezdravljenih psov ter pozitivno povezavo med koncentracijo TNF- α in vitaminom E v skupini zdravljenih psov, kar kaže na povezavo med oksidativnim stresom in vnetjem pri psih z napredovalim srčnim popuščanjem.
7. N-terminalni pronatriuretični peptid tipa B je zanesljiv pokazatelj popuščanja srca pri psih in njegova koncentracija se značilno povečuje z napredovanjem srčnega popuščanja.

7 POVZETEK

Popuščanje srca je eden izmed glavnih in najpogostejših vzrokov smrti pri ljudeh in starejših psih. Pri ljudeh je dokazano, da sta v patogenezi srčnega popuščanja udeležena tako oksidativni stres kot vnetje. Stanje oksidativnega stresa pomembno vpliva na povečan obseg oksidativnih poškodb lipidnih membran celic in celičnih organelov, proteinov, ogljikovih hidratov in DNA, napredovanje srčnega popuščanja ter napoveduje slabšo možnost preživetja. Določena kardiološka zdravila (α in β blokatorji adrenergičnih receptorjev, zaviralci angiotenzin konvertaze in zaviralci kalcijevih kanalčkov) naj bi imela antioksidantni in protivnetni učinek, saj so ugotovili, da zdravljenje srčnega popuščanja zmanjša stanje oksidativnega stresa in vnetja.

Pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi je področje oksidativnega stresa in vnetja dokaj slabo raziskano, zato je bil naš namen, da z določanjem pokazateljev oksidativnega stresa ter vnetja v krvi pri psih z miksomatozno degeneracijo zaklopk (MDZ) in dilatacijsko kardiomiopatijo (DKM) v različnih stopnjah bolezni ugotovimo, ali pri njih obstaja prisotnost oksidativnega stresa in vnetja. Prav tako nas je zanimal tudi vpliv zdravljenja srčnega popuščanja na parametre oksidativnega stresa in vnetja ter morebitne povezave med pokazatelji vnetja, oksidativnega stresa in napreduvalostjo bolezni.

V raziskavi smo oksidativni stres ovrednotili z določanjem pokazatelja lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA), antioksidanta vitamina E, ki je močan lovilec prostih radikalov, lipidno standardiziranega vitamina E (LS-VE) ter enega izmed glavnih intracelularnih antioksidantnih encimov, glutathion peroksidaze (GPX). Vnetje smo ovrednotili na podlagi določanja proinflammatoryh citokinov (interlevkin-6 (IL-6), tumor nekrotizirajoči faktor- α (TNF- α)) in C-reaktivnega proteina (CRP), glavnega proteina akutne faze vnetja pri psih. Za kvantitativno oceno napreduvalosti bolezni smo pri vseh psih določili koncentracijo N-terminalnega fragmenta natriuretičnega pro-peptida tipa B (NT-proBNP). Vsem psom smo določili tudi belo krvno sliko in biokemijski profil, ki je zajemal natrij, kalij, klorid, sečnino, kreatinin, alkalno fosfatazo, alanin-aminotrasferazo, holesterol in trigliceride.

V klinično raziskavo smo vključili 37 psov, 21 psov z MDZ, 16 psov z DKM in 10 zdravih psov. Pse s kardiovaskularno boleznijo smo razdelili po ISACHC klasifikaciji srčnega popuščanja (International Small Animal Cardiac Health Council) v tri skupine (ISACHC I – III) in v skupino zdravih. V drugi razdelitvi smo pse v ISACHC II in III razdelili v skupino zdravljenih in nezdravljenih psov. Za ugotovitev, ali se izbrani parametri oksidativnega stresa, vnetja in napredovalosti bolezni razlikujejo med boleznima, smo pse iz ISACHC III skupine razdelili še glede na bolezen (MDZ in DKM).

Ugotovili smo, da se plazemska koncentracija MDA in vitamin E, LS–VE, aktivnost GPX ter serumske koncentracije proinflammatoryh citokinov značilno ne spreminjajo s stopnjo srčnega popuščanja in se značilno ne razlikujejo v primerjavi z zdravimi psi. Značilno nižje plazemske koncentracije MDA smo ugotovili v skupini ISACHC II v primerjavi s psi v skupini ISACHC I in psi v ISACHC III skupini. Ti rezultati nakazujejo, da je obseg lipidne peroksidacije povečan v začetni in v zadnji stopnji srčnega popuščanja, kar nakazuje, da se v ISACHC II stopnji srčnega popuščanja najverjetneje vzpostavijo kompenzatorni antioksidantni mehanizmi, ki zmanjšujejo obseg lipidne peroksidacije.

V patogenezi srčnega popuščanja pride do vnetja, saj smo ugotovili značilno višje koncentracije CRP v najvišji stopnji srčnega popuščanja v primerjavi z zdravimi psi. Prisotnost vnetja pri popuščanju srca potrjujejo tudi značilno povišano skupno število levkocitov in nevtrofilnih granulocitov ter značilno znižane relativne vrednosti limfocitov v tretji stopnji popuščanja srca v primerjavi z zdravimi psi. Absolutno število monocitov je bilo značilno višje v skupini ISACHC III psov v primerjavi s skupino zdravih psov, kar nakazuje na prisotnost kroničnega vnetja pri dekompenziranim popuščanju srca.

Ugotovili smo tudi pozitivno povezavo med plazemskima koncentracijama $\text{TNF-}\alpha$ in MDA pri psih v najvišji stopnji srčnega popuščanja, negativno povezavo med plazemskima koncentracijama $\text{TNF-}\alpha$ in GPX v skupini nezdravljenih psov ter pozitivno povezavo med koncentracijo $\text{TNF-}\alpha$ in vitaminom E v skupini zdravljenih psov, kar kaže na povezavo oksidativnega stresa in vnetja pri psih z napredovalim srčnim popuščanjem.

V naši raziskavi smo ugotovili, da so imeli psi v zadnji stopnji srčnega popuščanja, to je v ISACHC III stopnji, značilno višjo plazemsko koncentracijo NT-proBNP v primerjavi s psi v skupinah ISACHC II in ISACHC I ter z zdravimi psi.

Zdravljenje srčnega popuščanja ni vplivalo na parametre oksidativnega stresa in vnetja ter NT-proBNP.

Ugotovili smo značilno višjo aktivnost GPX pri psih, ki so oboleli za MDZ v primerjavi s psi, ki so imeli DKM. Najverjetnejši razlog za tak rezultat je starostna razlika med skupinama, saj so bili psi z MDZ znatno starejši od psov z DKM. Med drugimi izmerjenimi parametri nismo ugotovili značilnih razlik med obema boleznima.

Z rezultati naše študije smo dobili vpogled v nivo oksidativnega stresa in vnetja ter njuno prepletanje pri psih z MDZ in DKM v različnih stopnjah popuščanja srca. Značilne povezave med parametri oksidativnega stresa in vnetja nakazujejo, da igrata pomembno vlogo v razvoju popuščanja srca pri psih tako oksidativni stres kot tudi vnetje.

8 SUMMARY

Heart failure is common in people as well as in dogs and is a cause for high mortality. It has been reported that oxidative stress and inflammation play the role in the pathogenesis of heart failure in humans. Oxidative stress can cause oxidative damage to lipid cell membranes, cell organelles, proteins, carbon hydrates, DNA, as well as heart failure progression and predicts poor prognosis. Some cardiac therapeutics (α and β blockers of adrenergic receptors, angiotensin convertase blockers, and calcium channel blockers) are known to have antioxidant and anti-inflammatory effect. It has been reported that cardiac therapy decreases the extent of oxidative stress and inflammation.

In dogs, the association between cardiovascular diseases and oxidative stress and inflammation has not been studied extensively yet. The purpose of our study was therefore to investigate whether oxidative stress and inflammation are present in dogs with different stages of myxomatous valve disease (MVD) and dilated cardiomyopathy (DCM) by evaluation of markers of oxidative stress and inflammation. Additionally, we investigated the effect of cardiac therapy on oxidative stress and inflammatory parameters and correlations between disease severity and parameters of oxidative stress and inflammation. Oxidative stress was evaluated by measuring values of lipid peroxidation product, malondialdehyde (MDA), antioxidant vitamin E (and lipid standardized vitamin E), which is a potent free radical scavenger, and one of the major intracellular antioxidant enzyme, glutathione peroxidase (GPX). Inflammation was evaluated by measuring values of proinflammatory cytokines (interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)), and C-reactive protein (CRP), a major acute phase protein in dogs. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide was determined to serve as the quantitative marker of disease severity. Complete blood count and white cell differential count, as well as biochemical profile (sodium, potassium, chloride, urea, creatinine, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, cholesterol, and triglycerides) were also determined in patients and healthy dogs.

Thirty-seven dogs, 21 with MVD, 16 with DCM and 10 healthy controls were included in the study. Dogs with cardiovascular diseases were classified according to ISACHC (International Small Animal Cardiac Health Council) into three groups (ISACHC I – III) and into a group of healthy dogs. The dogs in ISACHC II and III groups were combined and then subdivided into a group already receiving cardiac therapy at the time of presentation and into a group receiving no cardiac therapy. The ISACHC III group was further divided into MVD and DCM patients.

The results of our study showed that plasma MDA and vitamin E (LS–VE) concentrations, the activity of GPX and the serum concentration of pro-inflammatory cytokines did not change significantly with the stage of the disease and that these parameters did not differ significantly in comparison to healthy controls. However, we found a significantly lower plasma MDA concentration in the ISACHC II group in comparison to groups ISACHC I and ISACHC III. This indicates that in the ISACHC II stage of heart failure, compensating mechanisms are most likely activated that reduce the extent of lipid peroxidation.

The results of our study indicate the presence of inflammation in the pathogenesis of heart failure, as evident from significantly higher CRP concentration found in the highest stage of heart failure (ISACHC III) in comparison to healthy dogs. The presence of inflammation is also supported by significantly higher leukocyte and absolute neutrophil granulocyte counts and significantly lower relative lymphocyte count in the highest stage of heart failure in comparison to healthy dogs. The absolute monocyte count was significantly higher in the ISACHC III group in comparison to healthy dogs, which indicates the presence of chronic inflammation in decompensated heart failure.

This study demonstrated a significant positive correlation between MDA and TNF- α in dogs in the most advanced stage of heart failure, a significant negative correlation between TNF- α and GPX in the group of non-treated dogs and a significant positive correlation between TNF- α and vitamin E in treated dogs, which indicates the association of oxidative stress and inflammation in dogs with advanced stage of heart failure. Additionally, our results showed that dogs in the ISACHC III group have significantly higher plasma concentration of NT-proBNP in comparison to all other groups (ISACHC I and II, and healthy dogs).

Cardiac treatment did not significantly affect oxidative stress and inflammatory parameters, and the NT-proBNP concentration.

In our study, dogs with MVD had a significantly higher GPX activity as compared to dogs with DCM. This might be ascribed to the effect of age, given that the MVD dogs were significantly older than the DCM dogs, or to disease etiology. Other measured parameters did not differ significantly between the MVD and DCM groups.

The results of the study give an insight into the extent of oxidative stress and inflammation, and demonstrate significant association between oxidative stress and inflammatory parameters and severity of the disease in advanced stage of heart failure. We may conclude that both, oxidative stress and inflammation, play a role in the progression of heart failure in dogs.

9 ZAHVALE

Spoštovani in cenjeni mentorici **izr. prof. Aleksandri Domanjko Petrič**. Najlepša in iskrena hvala za vodenje ter pomoč pri zasnovi raziskovalne ideje in najboljše možno strokovno znanje. Hvala za vse konstruktivne kritike, podporo v dobrem in slabem, nasvete, izjemno potrpljenje ter stalno pripravljenost. Nenazadnje, hvala, da ste zaupali vame.

Spoštovani in cenjeni somentorici **izr. prof. Alenki Nemec Svete**. Iz srca hvala za vse nasvete, pomoč, konstruktivne kritike, vzpodbudo glede klinično laboratorijskega in raziskovalnega dela. Hvala, da ste mi vedno priskočili na pomoč in da ste do konca zaupali vame. Pogovor z vami je vedno nadvse navdihujoč in prijeten. Iskreno cenim vašo požrtvovalnost.

Hvala **prof. dr. Janezu Salobirju, doc. dr. Vidi Rezar** in **asist. dr. Alenki Levart** z Oddelka za zootehniko Katedre za prehrano Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, za določanje plazemske koncentracije MDA.

Hvala **dr. Gabrijeli Tavčar Kalcher** z Inštituta za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, za določanje plazemske koncentracije vitamina E.

Hvala **prof. dr. Nini Čebulj Kadunc** iz Enote za fiziologijo in patofiziologijo Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, za določanje serumske koncentracije TNF- α , IL-6 in CRP.

Dr. Peter B. Connolly iz IDEXX laboratorija (Westbrook, ME) za določanje plazemske koncentracije NT-proBNP, thank you.

Hvala **Aleksandru Jenku** za pomoč pri obdelavi in analizi vzorcev.

Hvala veterinarским tehnikom **Biljani Grubišič, Editi Okršlar, Mojci Juvan, Renati Šušnjara** in **Katarini Ramljak** za pomoč pri odvzemu vzorcev.

Hvala **dr. Mateji Gaber** za lektoriranje doktorske disertacije v slovenskem jeziku in najlepša hvala dragemu prijatelju **Andreju Lovšinu** za lektoriranje besedila v angleškem jeziku.

Iskrena hvala **Stanki Ujc** in **Slavici Sekulič** za pomoč pri pregledu in citiranju literature.

Hvala **mami, očetu, Damjanu** in **Sabini** ter ostalim družinskim članom, da ste mi stali ob strani, me neumorno vzpodbujali in verjeli, da mi bo uspelo.

Hvala tudi prijateljem in sodelavcem na Kliniki za male živali, Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani za potrpežljivost, razumevanje, vzpodbude ter podporo.

10 LITERATURA

- Ackermann MR. Acute Inflammation. In: McGavin MD, Zachary JF, eds. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. St. Louis: Mosby–Elsevier, 2007: 101–45.
- Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3: 517–26.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915–22.
- Amir O, Paz H, Rogowski O, et al. Serum oxidative stress level correlates with clinical parameters in chronic systolic heart failure patients. *Clin Cardiol* 2009; 32(4): 199–203.
- Anand IS, Latini R, Florea VG, et al. C–reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation* 2005; 112(10): 1428–34.
- Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* 2004; 90(4): 464–70.
- Ansari N, Asif H, Owais M. A study of inflammatory markers and their correlation with severity, in patients with chronic heart failure. *Biomed Res* 2012; 23(3): 408–15.
- Artur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 1825–35.
- Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* 2009; 23(6): 1142–50.
- Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, Damås JK, Yndestad A. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. *Ann Med* 2005; 37(2): 74–85.
- Aukrust P, Ueland T, Lien E, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999; 83(3): 376–82.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4–hydroxy–2–nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: e360438. (31 str.)
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438/> (20. 7. 2017).

Baldwin K, Bartges J, Buffington T, et al. AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 2010; 46: 285–96.

Belardinelli R, Mucaj A, Lacalaprice F, et al. Coenzyme Q10 improves contractility of dysfunctional myocardium in chronic heart failure. *Bio Factors* 2005; 25: 137–45.

Bhat MA, Mahajan N, Gandhi G. Oxidative stress status in coronary artery disease patients. *Int J LifeSci Bt Pharm Res* 2012; 1(2): e236–43.
http://new.ijlbpr.com/jlbpradmin/upload/ijlbpr_4f79d7514baad.pdf (23. 7. 2017).

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 1605–13.

Boswood A, Dukes–McEwan J, Loureiro J, et al. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 2008; 49(1): 26–32.

Boswood A. Biomarkers in cardiovascular disease: beyond natriuretic peptides. *J Vet Cardiol* 2009; 11(1): 23–32.

Bouras G, Giannopoulos G, Hatzis G, Alexopoulos D, Leventopoulos G, Deftereos S. Inflammation and chronic heart failure: from biomarkers to novel anti-inflammatory therapeutic strategies. *Med Chem* 2014; 10(7): 682–99.

Bozkurt B, Mann DL, Deswal A. Biomarkers of inflammation in heart failure. *Heart Fail Rev* 2010; 15(4): 331–41.

Bozkurt B. Activation of cytokines as a mechanism of disease progression in heart failure. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 90–3.

Briasoulis A, Androulakis E, Christophides T, Tousoulis D. The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure. *Heart Fail Rev* 2016; 21(2): 169–76.

Brigelius–Flohé R, Wingler K, Müller C. Estimation of individual types of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology* 2002; 347: 101–12.

Byrne JA, Grieve DJ, Cave AC, Shah AM. Oxidative stress and heart failure. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2003; 96: 214–21.

Cahill RJ, Pigeon K, Strong-Townsend MI, Drexel JP, Clark GH, Buch JS. Analytical validation of a second-generation immunoassay for the quantification of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in canine blood. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27: 61–7.

Caspi D, Baltz ML, Snel F, et al. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology* 1984; 53(2): 307–13.

Castro P, Vukasovic JL, Chiong M, et al. Effects of carvedilol on oxidative stress and chronotropic response to exercise in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2005; 7(6): 1033–9.

Castro PF, Díaz-Araya G, Nettle D, et al. Effects of early decrease in oxidative stress after medical therapy in patients with class IV congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2002; 89(2): 236–9.

Cavalca V, Tremoli E, Porro B, et al. Oxidative stress and nitric oxide pathway in adult patients who are candidates for cardiac surgery: patterns and differences. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013; 17(6): 923–30.

Ceron JJ, Eckersall PD, Martýnez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 2005; 34(2): 85–99.

Chae CU, Albert CM, Moorthy MV, Lee IM, Buring JE. Vitamin E supplementation and the risk of heart failure in women. *Circ Heart Fail* 2012; 5(2): 176–82.

Chen O, Patel J, Mohamed E, Greene M, Moskovits N, Shani J. The Immunoregulatory Role of Cytokines in Congestive Heart Failure. *Interdiscip J Microinflammation* 2014; 1(1): e1–6. (6 str.) <https://www.omicsonline.org/open-access/the-immunoregulatory-role-of-cytokines-in-congestive-heart-failure-ijm.1000111.php?aid=32606> (23. 7. 2017).

Chin BSP, Langford NJ, Nuttall SL, Gibbs CR, Blann AD, Lip GYH. Anti-oxidative properties of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2003; 5: 171–4.

Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; 268: 2571–6.

Collinson PO. Natriuretic Peptides – A review. *Eur Cardiol* 2005; e66–9. (3 str.) <https://www.ecrijournal.com/articles/natriuretic-peptides-review> (10. 10. 2013).

Cornell CC, Kittleson MD, Della Torre P, et al. Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med* 2004; 18(3): 311–21.

Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: A review. *Comp Med* 2009; 59(6): 517–26.

Cruz-Torres L, Griño R, Relos J. Correlation of total white blood cell and differential count in the development of congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Philipp J Intern Med* 2011; 49: 185–90.

Cunningham SM, Rush JE, Freeman LM. Systemic inflammation and endothelial dysfunction in dogs with congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2012; 26(3): 547–57.

Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(2): 379–85.

de Laforcade AM, Freeman LM, Rush JE. Serum nitrate and nitrite in dogs with spontaneous cardiac disease. *J Vet Intern Med* 2003; 17(3): 315–8.

de Lorgeril M, Salen P, Accominotti M, et al. Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure. Insights into the potential importance of selenium in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3(6): 661–9.

DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA, et al. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. *J Vet Intern Med* 2007; 21(2): 243–50.

Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation* 2001; 103(16): 2055–9.

Dhalla AK, Singal PK. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol* 1994; 266: 1280–5.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; 18: 655–73.

Díaz-Vélez CR, García-Castiñeiras S, Mendoza-Ramos E, Hernández-López E. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1996; 131: 146–52.

Dimitrow PP, Undas A, Wołkow P, Tracz W, Dubiel JS. Enhanced oxidative stress in hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep* 2009; 61(3): 491–5.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43(3): 200–27.

Elster SK, Braunwald E, Wood HF. A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1956; 51: 533–41.

Emdin M, Passino C, Prontera C, et al. Cardiac natriuretic hormones, neuro-hormones, thyroid hormones and cytokines in normal subjects and patients with heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(6): 627–36.

Espevik T, Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 1986; 95(1): 99–105.

Farabaugh AE, Freeman LM, Rush JE, George KL. Lymphocyte subpopulations and hematologic variables in dogs with congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2004; 18(4): 505–9.

Faviou E, Vourli G, Nounopoulos C, Zachari A, Dionyssiou–Asteriou A. Circulating oxidized low density lipoprotein, autoantibodies against them and homocysteine serum levels in diagnosis and estimation of severity of coronary artery disease. *Free Radic Res* 2005; 39(4): 419–29.

Feldman AM, Combes A, Wagner D, et al. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 537–44.

Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res* 2000; 87(3): 241–7.

Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, et al. Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 1995; 92: 1479–86.

Flores–Mateo G, Carrillo–Santistevan P, Elosua R, et al. Antioxidant enzyme activity and coronary heart disease: meta-analyses of observational studies. *Am J Epidemiol* 2009; 170: 135–47.

Fox PR, Sisson D, Moise NS. ISACHC. The International Small Animal Cardiac Health Council 1999. Recommendations for diagnosis of heart disease and treatment of heart failure in small animals. In: Fox PR, Sisson D, Moise NS, eds. Textbook of canine and feline cardiology. 2nd ed. Philadelphia:W.B. Saunders, 1999: 883–902.

Freeman LM, Brown DJ, Rush JE. Antioxidant status in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Nutr* 1998a; 12: 2768–70.

Freeman LM, Brown DJ, Rush JE. Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215: 644–6.

Freeman LM, Rush JE, Kehayias JJ, et al. Nutritional alterations and the effect of fish oil supplementation in dogs with heart failure. *J Vet Intern Med* 1998b; 12(6): 440–8.

Freeman LM, Rush JE, Markwell PJ. Effects of dietary modification in dogs with early chronic valvular disease. *J Vet Intern Med* 2006; 20(5): 1116–26.

Freeman LM, Rush JE, Milbury PE, Blumberg JB. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 537–41.

Fuentes VL. Echocardiography and Doppler ultrasound. In: Tilley LP, eds. Manual of Canine and Feline Cardiology. 4th ed. St. Louis: Saunders–Elsevier, 2008: 78–98.

Ghatak A, Brar MJ, Agarwal A, et al. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol* 1996; 57(2): 119–27.

Giera M, Lingeman H, Niessen WM. Recent advancements in the LC– and GC–based analysis of malondialdehyde (MDA): A brief overview. *Chromatographia* 2012; 75(9–10): 433–40.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 3: 500–8.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio–Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86(5): 494–501.

Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. *Cardiology* 2012; 122(1): 23–35.

Gutteridge JMC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 133–40.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen–derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 5–12.

Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press, 1999: 36–104.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed., Oxford: Oxford University Press, 2007.

Hirschfield GM, Pepys MB. C–reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJM* 2003; 96(11): 793–807.

Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 2013; 1: 483–91.

Holley A, Pitman J, Miller J, Harding S, Larsen P. Glutathione peroxidase activity and expression levels are significantly increased in acute coronary syndromes. *J Invest Med* 2017; 65(5): 919–25.

Hornig B, Landmesser U, Kohler C, et al. Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin II type receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: Role of superoxide dismutase. *Circulation* 2001; 103: 799–805.

Huang WP, Yin WH, Jen HL, et al. C–Reactive Protein Levels in Chronic Congestive Heart Failure. *Acta Cardiol Sin* 2004; 20: 7–14.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999; 85(4): 357–63.

Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 145–69.

Jawalekar SL, Kulkarni UJ, Surve VT, Deshmukh YA. Status of Lipid profile, MDA and protein carbonyl in patients with cardiovascular diseases. *Arch Appl Sci Res* 2010; 2(6): 355–61.

Johnson FL. Pathophysiology and etiology of heart failure. *Cardiol Clin* 2014; 32(1): 9–19.

Jordan P, Brubacher D, Moser U, Stähelin HB, Gey KF. Vitamin E and vitamin A concentrations in plasma adjusted for cholesterol and triglycerides by multiple regression. *Clin Chem* 1995; 41: 924–7.

Kanda T, Takahashi T. Interleukin–6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J* 2004; 45(2): 183–93.

Karabacak M, Dogan A, Tayyar S, Bas HA. Oxidative stress status increase in patients with nonischemic heart failure. *Med Princ Pract* 2014; 23(6): 532–7.

Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1352–6.

Keith ME, Jeejeebhoy KN, Langer A, et al. A controlled clinical trial of vitamin E supplementation in patients with congestive heart failure. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 219–24.

Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Vet J* 2008; 177(2): 178–91.

Kjelgaard–Hansen M, Mikkelsen LF, Kristensen AT, et al. Study on biological variability of five acute phase reactants in dogs. *Comp Clin Path* 2003; 12: 69–74.

Knight D. Pathophysiology of heart failure and clinical evaluation of cardiac function. In: Ettinger SJ, eds. *Textbook of veterinary internal medicine*. 4th ed. Vol. 1. Saunders 1995: 844–67.

Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci* 2005; 108: 205–13.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620–50.

Kukin ML, Kalman J, Charney RH, et al. Prospective, randomized comparison of effect of long–term treatment with metoprolol or carvedilol on symptoms, exercise, ejection fraction, and oxidative stress in heart failure. *Circulation* 1999; 99(20): 2645–51.

Kumar A, Kaur H, Devi P, Mohan V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere–like syndrome. *Pharmacol Ther* 2009; 124: 259–68.

Kurum T, Tatli E, Yuksel M. Effects of carvedilol on plasma levels of pro-inflammatory cytokines in patients with ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy.

Tex Heart Inst J 2007; 34(1): 52–9.

Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. Indian J Biochem Biophys 2009; 46: 421–40.

Lee S, Park Y, Zuidema MY, Hannink M, Zhang C. Effects of interventions on oxidative stress and inflammation of cardiovascular diseases. World J Cardiol 2011; 3(1): 18–24.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides.

N Engl J Med 1998; 339(5): 321–8.

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med 1990; 323(4): 236–41.

Ljungvall I, Höglund K, Tidholm A, et al. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs.

J Vet Intern Med 2010; 24(1): 153–9.

Lukman T. Določanje serumske koncentracije C-reaktivnega proteina in njegova povezava s srčnim popuščanjem pri psih s kardiovaskularnimi boleznimi. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2012. Prešernova naloga.

Madjid M, Fatemi O. Components of the complete blood count as risk predictors for coronary heart disease: In-depth review and update. Tex Heart Inst J 2013; 40(1): 17–29.

Madmani ME, Yusuf Solaiman A, Tamr Agha K, et al. Coenzyme Q10 for heart failure. Cochrane Database Syst Rev 2014; (6):CD008684 (32str.). <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD008684.pub2/full> (20. 8. 2017).

Mair J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide – where are we now?

Clin Chem Lab Med 2008; 46(11): 1507–14.

Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, et al. Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med 2002; 347(3): 161–7.

Mak S, Newton GE. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure.

Chest 2001; 120: 2035–46.

Markby G, Summers KM, MacRae VE, Del-Pozo J, Corcoran BM. Myxomatous degeneration of the canine mitral valve: from gross changes to molecular events. *J Comp Pathol* 2017; 156(4): 371–83.

Martínez-Subiela S, Bernal LJ, Cerón JJ. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res* 2003; 64(8): 1021–6.

Mates JM. Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species. *Toxicology* 2000; 153: 83–104.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595–603.

Matsumura T, Tsushima K, Ohtaki E, et al. Effects of carvedilol on plasma levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in nine patients with dilated cardiomyopathy. *J Cardiol* 2002; 39(5): 253–7.

McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 1993; 14: 1493–8.

McMurray J, Chopra M. Influence of ACE inhibitors on free radicals and reperfusion injury: pharmacological curiosity or therapeutic hope? *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31(4): 373–9.

Meydani M. Vitamin E. *Lancet* 1995; 345: 170–5.

Moesgaard SG, Falk T, Teerlink T, et al. Brain-natriuretic peptide and cyclic guanosine monophosphate as biomarkers of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Vet J* 2011; 189(3): 349–52.

Mravljak J. Radikali in oksidativni stres. *Farm vestn* 2015; 66: 127–32.

Munger MA, Johnson B, Amber IJ, Callahan KS, Gilbert EM. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996; 77: 723–7.

Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of oxidative stress on the heart and vasculature: part 2 of a 3-part series. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70(2): 212–29.

Nakamura K, Murakami M, Miura D, et al. Beta-blockers and oxidative stress in patients with heart failure. *Pharmaceuticals* 2011; 4(8): 1088–100.

Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, et al. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci* 2008; 70(2): 127–31.

Nakano H, Fuse KA, Takahashi M, et al. The response of NT-proBNP to intensified medication in advanced chronic heart failure. *IJC Metab Endocr* 2016; 10: 24–9.

Napoli C, Sica V, de Nigris F, et al. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J* 2004; 148(1): e5. (7 str.) [http://www.ahjonline.com/article/S0002-8703\(04\)00151-6/fulltext](http://www.ahjonline.com/article/S0002-8703(04)00151-6/fulltext) (8. 1. 2017).

National Center for Health Statistics. Health, United States, 2016: With Chartbook on long-term trends in health. Hyattsville, 2017. (488 str.) <https://www.cdc.gov/nchs/data/health/data/hus/hus16.pdf> (1. 9. 2017).

Ng LL, Pathik B, Loke IW, Squire IB, Davies JE. Myeloperoxidase and C-reactive protein augment the specificity of B-type natriuretic peptide in community screening for systolic heart failure. *Am Heart J* 2006; 152(1): 94–101.

Oral H, Kapadia S, Nakano M, et al. Tumor Necrosis Factor- α and the Failing Human Heart. *Clin Cardiol* 1995; 18(suppl. IV): IV 20–IV 27.

Osredkar J. Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 393–406.

Ostrowska M, Ostrowski A, Łuczak M, et al. Basic laboratory parameters as predictors of in-hospital death in patients with acute decompensated heart failure: data from a large single centre cohort. *Kardiol Pol* 2017; 75: 157–63.

Oyama MA, Fox PR, Rush JE, et al. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232: 1496–503.

Ozturk TC, Unluer E, Denizbasi A, Guneyssel O, Onur O. Can NT-proBNP be used as a criterion for heart failure hospitalization in emergency room? *J Res Med Sci* 2011; 16(12): 1564–71.

Packer M, Coats AJ, Fowler MB, et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 344(22): 1651–8.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158–69.

Passino C, Poletti R, Fontana M, et al. Clinical relevance of non-cardiac determinants of natriuretic peptide levels. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(11): 1515–23.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008; 4(2): 89–96.

Pierce KV, Rush JE, Freeman LM, Cunningham SM, Yang VK. Association between survival time and changes in NT-proBNP in cats treated for congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2017; 31(3): 678–84.

Polidori MC, Praticó D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Fail* 2004; 10(4): 334–8.

Polidori MC, Savino K, Alunni G, et al. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 148–52.

Polizopoulou ZS, Koutinas CK, Cerón JJ, et al. Correlation of serum cardiac troponin I and acute phase protein concentrations with clinical staging in dogs with degenerative mitral valve disease. *Vet Clin Pathol* 2015; 44(3): 397–404.

Poljšak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: e956792 (11 str.) <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/956792/> (20. 8. 2017).

Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J* 2011; 278: 1808–17.

Prasad K, Gupta JB, Kalra J, Lee P, Mantha SV, Bharadwaj B. Oxidative stress as a mechanism of cardiac failure in chronic volume overload in canine model. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 375–85.

Prasad K, Kalra J, Bharadwaj L. Cardiac depressant effects of oxygen free radicals. *Angiology* 1993; 44: 257–70.

Prichett G, Cohen HJ, Rao KM, Cobb F, Sullivan M, Currie MS. Tumor necrosis factor, natural killer activity and other measures of immune function and inflammation in elderly men with heart failure. *Gerontology* 1995; 41: 45–56.

Ptaszynska-Kopczynska K, Szpakowicz A, Marcinkiewicz-Siemion M, et al. Interleukin-6 signaling in patients with chronic heart failure treated with cardiac resynchronization therapy. *Arch Med Sci* 2017; 13(5): 1069–77.

Pudil R, Tichý M, Andrys C, et al. Plasma interleukin-6 level is associated with NT-proBNP level and predicts short- and long-term mortality in patients with acute heart failure. *Acta Med* 2010; 53(4): 225–8.

Rabasseda X. Carvedilol: an effective antihypertensive drug with antiischemic/antioxidant cardioprotective properties. *Drugs Today* 1998; 34: 905–26.

Raphael C, Briscoe C, Davies J, et al. Limitations of the New York Heart Association functional classification system and self-reported walking distances in chronic heart failure. *Heart* 2007; 93(4): 476–82.

Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 102(25): 3060–7.

Recchia FA, Bernstein RD, Sehgal PB, Ferreri NR, Hintze TH. Cytokines are not a requisite part of the pathophysiology leading to cardiac decompensation. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223(1): 47–52.

Reimann MJ, Häggström J, Møller JE, Lykkesfeldt J, Falk T, Olsen LH. Markers of oxidative stress in dogs with myxomatous mitral valve disease are influenced by sex, neuter status, and serum cholesterol concentration. *J Vet Intern Med* 2017; 31(2): 295–302.

Reimann MJ, Ljungvall I, Hillström A, et al. Increased serum C-reactive protein concentrations in dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *Vet J* 2016; 209: 113–8.

Rezar V, Frankič T, Narat N, Levart A, Salobir J. Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens. *Poult Sci* 2010; 86: 1155–60.

Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2014; 14(2): e157–e65. (9 str.) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997530/> (1.8.2017).

Rössig L, Hoffmann J, Hugel B, et al. Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation* 2001; 104(18): 2182–7.

Rush JE, Lee ND, Freeman LM, Brewer B. C-reactive protein concentration in dogs with chronic valvular disease. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 635–9.

Salonen RM, Nyyssönen K, Kaikkonen J, et al. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation* 2003; 107(7): 947–53.

Sato Y, Takatsu Y, Kataoka K, et al. Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL) –4, and IL–6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol* 1999; 22(12): 811–3.

Saunders AB, Smith BE, Fosgate GT, et al. Cardiac troponin I and C-reactive protein concentrations in dogs with severe pulmonic stenosis before and after balloon valvuloplasty. *J Vet Cardiol* 2009; 11(1): 9–16.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin–6. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(5): 878–88.

Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(1): 7–30.

Scollan KF, Sisson DD. Pathophysiology of Heart Failure. In Ettinger SJ, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and the cat*. 8th ed. Vol. 2. St. Louis: Elsevier, 2017: 1153–63.

Seki Y, Machida N, Arimura T, Kiryu K, Kondoh M. Transmural myocardial infarction caused by thromboembolism associated with mitral insufficiency in a dog. *J Vet Med Sci* 1998; 60(6): 741–3.

Senes M, Erbay AR, Yilmaz FM, Topkaya BC, Zengi MD, Yücel D. Coenzyme Q10 and highly sensitivity C-reactive protein in ischemic and dilated cardiomyopathy. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 382–6.

Serdar A, Yesilbursa D, Serdar Z, Dirican M, Turel B, Cordan J. Relation of functional capacity with the oxidative stress and antioxidants in chronic heart failure. *Congest Heart Fail* 2001; 7(6): 309–11.

Serres F, Pouchelon JL, Poujol L, et al. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J Vet Cardiol* 2009; 11(2): 103–21.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; 91(5): 406–13.

Shimada T, Ishida Y, Shimizu M, et al. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Commun* 2002; 26(3): 171–7.

Shinde S, Patil N, Tendolkar A. Coenzyme Q10: a review of essential functions. *Internet J Nutr Wellness* 2005; 1(2): (17 str.)
<http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijnw/vol1n2/q10.xml>.
(30.6.2010).

Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, ed. *Oxidative stress*. London: Academic Press, 1985:1–8.

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 426–32.

Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol* 2015; 71: 40–56.

Sivertsen T, Øvernes G, Østerds O, Nymoen U, Lunder T. Plasma vitamin E and blood selenium concentration in Norwegian dairy cows: Regional differences and relations to feeding and health. *Acta Vet Scand* 2005; 46: 177–91.

Smith JG, Newton-Cheh C, Almgren P, et al. Assessment of conventional cardiovascular risk factors and multiple biomarkers for the prediction of incident heart failure and atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56(21): 1712–9.

Starč R, Bunc M. Patofiziologija akutnih koronarnih sindromov. *Med Razgl* 2002; 41: 41–9.

Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347(9004): 781–6.

Stern JA, Meurs KM. Myocardial Disease: Canine. In: Ettinger SJ, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: diseases of the dog and the cat*. 8th ed. Vol. 2. St. Louis: Elsevier, 2017: 1269–77.

Stowe HD, Lawler DF, Kealy RD. Antioxidant status of pair-fed labrador retrievers is affected by diet restriction and aging. *J Nutr* 2006; 136: 1844–8.

Strickland KN. Pathophysiology and Therapy of Heart failure. In: Tilley LP, eds. Manual of Canine and Feline Cardiology. 4th ed. St. Louis: Saunders–Elsevier, 2008: 288–314.

Su D, Li Z, Li X, et al. Association between serum interleukin–6 concentration and mortality in patients with coronary artery disease. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 726178 (7 str.) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/726178> (20.6.2017).

Svete AN, Verk B, Seliškar A, Tomsič K, Križman PJ, Petrič AD. Plasma coenzyme Q10 concentration, antioxidant status, and serum N–terminal pro–brain natriuretic peptide concentration in dogs with various cardiovascular diseases and the effect of cardiac treatment on measured variables. *Am J Vet Res* 2017; 78(4): 447–57.

Szczurek W, Szyguła–Jurkiewicz B. Oxidative stress and inflammatory markers – the future of heart failure diagnostics? *Kardiochir Torakochirurgia Pol* 2015; 12(2): 145–9.

Testa M, Yeh M, Lee P, et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 964–71.

Thurnham DI, Davies JA, Crump BJ, Situnayake RD, Davis M. The use of different lipids to express serum tocopherol:lipid ratios for the measurement of vitamin E status. *Ann Clin Biochem* 1986; 23: 514–20.

Thygesen K, Mair J, Mueller C, et al. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: a position statement from the study group on biomarkers in cardiology of the ESC working group on acute cardiac care. *Eur Heart J* 2012; 33(16): 2001–6.

Todorova I, Simeonova G, Kyuchukova D, Dinev D. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comp Clin Path* 2005; 13: 190–4.

Tomsič K, Seliškar A, Lukanc B, Nemec Svete A. Plasma total antioxidant capacity and activities of blood glutathione peroxidase and superoxide dismutase determined in healthy dogs by using commercially available kits. *Acta Vet Beog* 2016; 66(4): 534–48.

Torre–Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(5): 1201–6.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin–6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35(3): 714–21.

Tsutamoto T, Wada A, Matsumoto T, et al. Relationship between tumor necrosis factor- α production and oxidative stress in the failing hearts of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(8): 2086–92.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(6): 2181–90.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(11): 2563–82.

Ukai T, Cheng CP, Tachibana H, et al. Allopurinol enhances the contractile response to dobutamine and exercise in dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation* 2001; 103(5): 750–5.

Ulutas B, Bayramli G, Ulutas PA, Karagenc T. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Vet Clin Pathol* 2005; 34(2): 144–7.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38–48.

Vajdovich P, Gaál T, Szilágyi A, Harnos A. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs. *Vet Res Commun* 1997; 21: 463–70.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.

Verk B, Nemec Svete A, Salobir J, Rezar V, Domanjko Petrič A. Markers of oxidative stress in dogs with heart failure. *J Vet Diagn Invest* 2017; 1–9.

Verk B. Antioksidantni status in plazemski nivo koencima Q₁₀ pri različnih kardiovaskularnih boleznih pri psih. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2010. Prešernova naloga.

Von Haehling S, Doehner W, Anker SD. Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure. *Cardio Res* 2007; 73: 298–309.

Weglicki WB, Kramer JH, Mak IT. The Role of Antioxidant Drugs in Oxidative Injury of Cardiovascular Tissue. *Heart Fail Rev* 1999; 4: 183–92.

Weglicki WB, Mak IT, Simic MG. Mechanisms of cardiovascular drugs as antioxidants. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 1199–208.

White M, Ducharme A, Ibrahim R, et al. Increased systemic inflammation and oxidative stress in patients with worsening congestive heart failure: improvement after short-term inotropic support. *Clin Sci* 2006; 110(4): 483–9.

Winbauer AN, Pingree SS, Nuttall KL. Evaluating serum α -tocopherol (vitamin E) in terms of a lipid ratio. *Ann Clin Lab Sci* 1999; 29(3): 185–91.

Wojciechowska C, Romuk E, Tomasik A, et al. Oxidative stress markers and C-reactive protein are related to severity of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: e147040. (10 str.)
<https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/147040/> (26.3.2017).

Yndestad A, Damås JK, Øie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep* 2007; 9(3): 236–41.

Yousuf O, Mohanty BD, Martin SS, et al. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link? *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(5): 397–408.

Yücel D, Aydoğdu S, Cehreli S, et al. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 1998; 44: 148–54.

Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342(3): 154–60.

Zhao B, Tham SY, Lu J, Ali MH, Lee LKH, Moochhala SM. Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2004; 7(2): 200–4.

Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchela GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13(5): 541–7.

Zois NE, Moesgaard SG, Kjølgaard-Hansen M, et al. Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease. *Vet J* 2012; 192(1): 106–11.

11 PRILOGE

11.1 PRILOGA ŠT. 1

Pripomoček za oceno telesne kondicije pri psih.

Tabela 22: Ocena telesne kondicije pri psih (Baldwin in sod., 2010)

Table 22: Body Condition Score in dogs (Baldwin et al., 2010)

	BCS	Opis
Presuhi	1	Na daleč jasno vidna rebra, ledvena vretenca in kosti medenice. Ni vidnega in otipljivega maščobnega tkiva. Izrazita izguba mišične mase.
	2	Jasno vidna rebra, ledvena vretenca in kosti medenice. Manjša izguba mišične mase.
	3	Enostavna palpacija reber, ki so še vidna, z malo ali nič podkožne maščobe. Vidni vrhovi ledvenih vretenc. Še jasno vidne kosti medenice.
Normalni	4	Enostavna palpacija reber, z minimalno količino podkožne maščobe. Dobro viden ozek pas od zgoraj. Trebuh dvignjen ob rebernem loku, gledano s strani.
	5	Tipna rebra z normalno količino podkožne maščobe. Še viden pas. Trebuh blago dvignjen, gledano s strani.
Predebeli	6	Tipna rebra z malce več podkožne maščobe. Pas je še viden ob pogledu navzdol, trebuh je očiten.
	7	Težko tipljiva rebra, veliko podkožne maščobe. Veliko podkožne maščobe tudi v ledvenem predelu in na bazi repa. Pasu se več ne vidi. Trebuh večji.
	8	Rebra več niso tipljiva ali le z močnim pritiskom, z veliko podkožne maščobe. Velika količina podkožne maščobe v ledvenem predelu in na bazi repa. Pas ni več viden. Trebuh zelo povečan in razširjen.
	9	Ogromna količina podkožne maščobe po celotnem podkožju prsnega koša, hrbtenice, vratu, okončin in baze repa. Pas ni več viden. Očitna razširitev trebuha.

Legenda: BCS – ocena telesne kondicije

Legend: BCS – Body Condition Score

11.2 PRILOGA ŠT. 2

Klasifikacija srčnega popuščanja po New York Heart Association (NYHA) (Raphael in sod., 2007).

NYHA I – IV klasifikacija (angl. New York Heart Association Functional Classification), ki so jo uvedli za kategoriziranje srčnega popuščanja in omogoča postavitev najprimernejšega zdravljenja glede na klinično stanje kardiovaskularnega bolnika.

- **Kategorija I** (blaga): brez sprememb ob aktivnostih. Običajna aktivnost ne povzroča simptomov, kot so utrujenost, palpitacije (pospešeno bitje srca) in dispneje (oteženo dihanje).
- **Kategorija II** (blaga–srednja): blago zmanjšanje oziroma omejitev aktivnosti. V mirovanju simptomi niso izraženi, ob fizični aktivnosti pa se pokažejo utrujenost, palpitacija in dispneja.
- **Kategorija III** (srednja): izrazita omejitev fizičnih aktivnosti, bolniki nimajo izraženih simptomov le ob počitku.
- **Kategorija IV** (težka): Katerakoli fizična aktivnost povzroči že prej omenjene simptome, ki se pojavljajo tudi med počitkom.

11.3 PRILOGA ŠT. 3

Vprašalnik

INTERNI SPREMNI DOPIS VZORCEV VF

Vzorci za doktorat oksidativni stres in vnetje		
Podatki o lastniku		Datum odvzema vzorca:
		Datum sprejema vzorca:
Vzorec krvi	Vrsta epruvete	Shraniti na °C
1x 500 µL	epruveta z EDTA (mala vijolična) (hemogram)	
1x 4 mL	epruveta z gelom (rdeča) (biokemija, CRP, IL-6, TNF-α)	– 80 °C
3x 2 mL	epruveta s heparinom (zelena) (vitamin E-2x0,5mL)	– 80 °C
1x 2 mL	Epruveta z EDTA (velika vijolična) (MDA 2x0,5mL, NT-proBNP)	– 80 °C
Anamneza: _____ _____ _____ _____ _____		
Hrana: Meso: da/ne, surovo/kuhano/pečeno, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno govedina, svinjina, piščanec, puran, raca, kunec, ribe _____, divjačina, konjsko meso, _____ količina _____ Konzervirana hrana: da/ne, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno proizvajalec _____ katero meso vsebuje _____ dodatki _____ količina _____ Suha briketirana hrana: da/ne, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno proizvajalec _____ katero meso vsebuje _____ dodatki _____ količina _____ Priloge: da/ne, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno riž, krompir, ajdova kaša, ovsena kaša, ješprenj, polenta, testenine, kruh, _____ količina _____ Sadje: da/ne, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno/nekajkrat letno vrsta _____ količina _____ Zelenjava: da/ne, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno/nekajkrat letno vrsta _____ količina _____ Pribojčki: da/ne, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno/nekajkrat letno vrsta _____ proizvajalec _____ Vitaminski in mineralni dodatki h prehrani: da/ne, vsak dan/nekajkrat na teden/1x na teden/nekajkrat mesečno/nekajkrat letno		

kaj in koliko česa vsebujejo _____ proizvajalec _____
Zdravila:
Klinični pregled: _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____

11.3 PRILOGA ŠT. 4

Izbrani hematološki parametri pri psih, ki so bili vključeni v raziskavo.

Tabela 23: Izbrani hematološki parametri pri psih, ki so bili vključeni v raziskavo

Table 23: Selected haematological parameters of dogs included in the study

SKUPINA	Eritrociti ($\times 10^{12}/L$) (ref. 5,5–8,5 $\times 10^{12}/L$)	Hemoglobin (g/L) (ref. 120–180 g/L)	Hematokrit (L/L) (ref. 0,37–0,55 L/L)	Trombociti ($\times 10^9/L$) (ref. 200–500 $\times 10^9/L$)	MCV (fL) (ref. 60–77 fL)	MCH (pg) (ref. 19,5–24,5 pg)	MCHC (g/L) (ref. 320–360 g/L)
ISACHC I (n = 11) povprečje $\pm$ SD	7,19 $\pm$ 0,37	163 $\pm$ 3	0,51 $\pm$ 0,01	313 $\pm$ 81	67,9 $\pm$ 3,5	22,6 $\pm$ 1,5	334 $\pm$ 4
ISACHC II (n = 7) povprečje $\pm$ SD	6,55 $\pm$ 1,13	148 $\pm$ 18	0,44 $\pm$ 0,06	316 $\pm$ 223	67,3 $\pm$ 2,7	22,7 $\pm$ 1,0	337 $\pm$ 1
ISACHC III (n = 19) povprečje $\pm$ SD	7,92 $\pm$ 1,49	177 $\pm$ 29	0,53 $\pm$ 0,11	348 $\pm$ 43	66,5 $\pm$ 0,2	22,4 $\pm$ 0,8	337 $\pm$ 13
ZDRAVI (n = 10) povprečje $\pm$ SD	7,06 $\pm$ 0,88	164 $\pm$ 14	0,49 $\pm$ 0,04	187 $\pm$ 11	69,8 $\pm$ 2,8	23,3 $\pm$ 0,9	333 $\pm$ 1

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, MCV – povprečni volumen eritrocitov, MCH – povprečna količina hemoglobina v eritrocitu, MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, MCV – Mean Corpuscular Volume, MCH – Mean Corpuscular Haemoglobin, MCHC – Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration

11.4 PRILOGA ŠT. 5

Izbrani biokemijski parametri.

Tabela 24: Izbrani biokemijski parametri pri psih, ki so bili vključeni v raziskavo

Table 24: Selected biochemical parameters of dogs included in the study

SKUPINA	Sečnina (mmol/L) (ref. 2,50–9,60 mmol/L)	Kreatinin (μmol/L) (ref. 44,2–132,6 μmol/L)	Natrij (mmol/L) (ref. 141–152 mmol/L)	Kalij (mmol/L) (ref. 4,37–5,35 mmol/L)	Klorid (mmol/L) (ref. 105–115 mmol/L)	AP (U/L) (ref. 20–156 U/L)	ALT (U/L) (ref. 21–148 U/L)	Holesterol (mmol/L) (ref. 3,50–6,99 mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L) (ref. 0,2–1,3 mmol/L)
ISACHC I (n = 11) povprečje ± SD	6,65 ± 1,68	92,1 ± 43,3	142,4 ± 15,5	4,41 ± 0,51	117,2 ± 0,2	81,8 ± 61,7	48,1 ± 10,8	5,63 ± 0,91	1,08 ± 0,03
ISACHC II (n = 7) povprečje ± SD	10,13 ± 0,53	90,9 ± 7,7	147,2 ± 12,8	4,31 ± 0,80	111,4 ± 3,3	114,6 ± 31,1	116,1 ± 6,0	6,74 ± 0,83	0,74 ± 0,16
ISACHC III (n = 19) povprečje ± SD	10,90 ± 0,71	110,9 ± 23,7	142,7 ± 10,7	4,42 ± 0,49	112,7 ± 0,4	138,4 ± 205,6	100,8 ± 66,5	6,58 ± 0,47	1,16 ± 0,65
ZDRAVI (n = 10) povprečje ± SD	6,35 ± 0,01	106,2 ± 1,9	147,3 ± 0,6	4,43 ± 0,29	114,7 ± 0,6	26,9 ± 10,6	47,9 ± 9,1	5,92 ± 0,66	0,70 ± 0,17

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, AP – alkalna fosfataza, ALT – alanin–aminotrasferaza

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, AP – Alkaline Phosphatase, ALT – Alanine Aminotrasferase

11.5 PRILOGA ŠT. 6

Izbrani ehokardiografski parametri.

Tabela 25: Izbrani ehokardiografski parametri psih s kardiovaskularnim obolenjem, ki so bili vključeni v raziskavo

Table 25: Selected echocardiographic parameters of dogs with cardiovascular disease included in the study

SKUPINA	LAD/Ao	E/Ar	Val E (m/s)	Val A (m/s)	TRp (mmHg)	FS (%)	LVEF	LVDd (cm/m ²)	LVDs (cm/m ²)	EDVtz (mL/m ²)	ESVtz (mL/m ²)
ISACHC I (n = 11) povprečje ± SD	2,01 ± 0,13	1,17 ± 0,32	1,00 ± 0,16	0,92 ± 0,38	33,15 ± 21,02	30,81 ± 8,61	0,63 ± 0,18	6,17 ± 0,89	4,13 ± 1,17	163,14 ± 99,09	85,41 ± 103,34
ISACHC II (n = 7) povprečje ± SD	2,40 ± 0,16	1,83 ± 0,63	1,46 ± 0,21	0,76 ± 0,11	35,21 ± 3,23	40,18 ± 5,76	0,79 ± 0,06	8,11 ± 3,78	4,61 ± 1,61	181,38 ± 9,32	47,77 ± 13,67
ISACHC III (n = 19) povprečje ± SD	2,66 ± 0,08	1,78 ± 0,16	1,33 ± 0,12	0,73 ± 0,11	40,26 ± 7,86	23,44 ± 27,21	0,51 ± 0,35	6,96 ± 2,73	5,17 ± 0,55	221,73 ± 69,07	131,02 ± 62,06

Legenda: n – število psov, SD – standardni odklon, ISACHC – mednarodni konzilij za srčna obolenja malih živali, LAD/Ao – razmerje med premerom levega preddvora in aorte, E/Ar – razmerje med valovoma E in A mitralnega priliva, Val E – zgodnji mitralni priliv, Val A – pozni mitralni priliv, TRp – trikuspidalni gradient, FS – sistolično skrajšanje levega prekata, LVEF – iztisni delež levega prekata, LVDd – končni premer levega prekata v diastoli, LVDs – končni premer levega prekata v sistoli, EDVtz – volumen ob koncu diastole po Teicholz formuli, ESVtz – volumen ob koncu sistole po Teicholz formuli

Legend: n – number of dogs, SD – Standard Deviation, ISACHC – International Small Animal Cardiac Health Council, LAD/Ao – ratio between diameter of left atrium and aorta, E/Ar – ratio between wave E and A of mitral flow, Wave E – Early mitral flow, Wave A – Late mitral flow, TRp – Tricuspidal Gradient, FS – Fractional Shortening, LVEF – Left Ventricular Ejection Fraction, LVDd – Left Ventricular Diastolic Dimension, LVDs – Left Ventricular Systolic Dimension, EDVtz – End Diastolic Volume of Left Ventricle calculated by Teicholz formula, ESVtz – End Systolic Volume of Left Ventricle calculated by Teicholz formula

11.6 ČLANEK (Verk in sod., 2017)

Markers of oxidative stress in dogs with heart failure

Barbara Verk, Alenka Nemec Svete, Janez Salobir, Vida Rezar, Aleksandra Domanjko Petrič¹

Abstract. We tested the hypothesis that indirect measures of oxidative stress (vitamin E, glutathione peroxidase, and malondialdehyde) differ in dogs in heart failure resulting from either myxomatous mitral valve disease or dilated cardiomyopathy. Dogs were classified according to the International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC) classification. Additionally, the effect of cardiac therapy on oxidative stress parameters and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in advanced stages of congestive heart failure was investigated. There were no significant differences in oxidative stress parameters between healthy dogs and the individual groups of cardiac patients. Significantly lower malondialdehyde (MDA) was observed in the ISACHC II group in comparison to ISACHC groups III and I. A significant positive correlation in treated patients was observed between NT-proBNP and MDA, NT-proBNP and vitamin E, as well as between MDA and vitamin E (and lipid-standardized vitamin E). No significant differences in any of the measured parameters were found between treated and non-treated cardiac patients. Our results suggest an association between MDA (the extent of lipid peroxidation) and NT-proBNP, vitamin E and NT-proBNP, as well as between MDA and vitamin E in treated canine patients. Plasma vitamin E concentration was maintained in all stages of cardiovascular disease in these canine patients.

Key words: Dogs; heart failure; malondialdehyde; N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; vitamin E.

Introduction

Oxidative stress in a living organism is primarily the result of increased production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) that dominate over endogenous enzymes, such as glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD), and exogenous antioxidant defense mechanisms (vitamins A, E, and C, polyphenols, carotenoids). In heart failure, excess ROS and RNS are produced by the respiratory chain in mitochondria, vascular nicotinamide dinucleotide (phosphate) oxidases, cytochrome P450, xanthine oxidases, auto-oxidation of catecholamines, or nitric oxide synthase activation.^{14,20,35} ROS-induced cellular injury has been involved in the development of many cardiovascular diseases, including myocardial infarction, coronary artery disease, dilated cardiomyopathy (DCM), congestive heart failure (CHF), and other cardiac diseases in people and animals.^{2,11,12,14,17,20,24,27,37,49} Besides their cytotoxic effect on myocardial cells, ROS also act as negative inotropes.¹⁴

ROS and RNS are highly reactive, short-lived, and, as such, cannot be practically and directly measured in human and animal *in vivo* studies.³³ A growing body of evidence suggests that many of the damaging effects of ROS and RNS on the cells of the cardiovascular system are mediated by products of non-enzymatic reactions such as lipid peroxidation, glycation, and amino acid oxidation.¹⁴ Malondialdehyde (MDA), a final product of lipid peroxidation, is the

most commonly measured biomarker of oxidative stress⁴⁵ and is significantly elevated in the blood in heart failure in humans and dogs.^{3,7,11,20,23,31,37,49}

Vitamin E or α -tocopherol is the main and most potent lipid-soluble antioxidant. It is only synthesized by plants and cyanobacteria and is essential in human and animal nutrition.³⁶ Vitamin E is one of the most powerful free-radical scavengers, particularly in cell membranes.²⁵ Vitamin E inhibits lipid peroxidation and hence provides enhanced stability to the cellular membrane.¹⁹ Fat-soluble vitamin E does not have a specific carrier in plasma; it occurs in all plasma lipoproteins. Standardization of vitamin E to lipids enables accurate assessment of serum or plasma vitamin E status.^{16,41,48} Vitamin E adjustment for the sum of cholesterol and triglycerides reduces the influence of concurrent lipids present in plasma and is highly effective in identifying vitamin E deficiency.^{16,41} A few studies have shown decreased plasma vitamin E concentrations in human patients with heart failure^{26,31,32,37} and in dogs with CHF resulting from DCM and myxomatous mitral valve

Small Animal Clinic, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia (Verk, Nemec Svete, Domanjko Petrič); and Institute of Nutrition, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Domžale, Slovenia (Salobir, Rezar).

¹Corresponding author: Aleksandra Domanjko Petrič, Small Animal Clinic, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia. aleksandra.domanjko@vf.uni-lj.si

disease (MVD).¹² However, there is also evidence of normal levels of vitamin E in human patients with heart failure^{5,18} (DCM, post-ischemic cardiomyopathy) and in canine patients with DCM^{10,11} and MVD (Reimann MJ, et al. Low-density lipoprotein oxidation is breed and gender dependent in dogs with myxomatous mitral valve disease. Proc Am Coll Vet Intern Med Forum 2016; June 2016; Denver, CO).

Glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) represent the primary intracellular enzymatic antioxidant defense against oxidative stress.²² Clinical trials have shown that human patients who suffer from heart failure have significantly decreased blood levels of GPX.^{18,23,32} In contrast, clinical studies on dogs with DCM showed significantly increased GPX activity.^{10,11} Erythrocyte SOD activity was found significantly lower in human chronic heart failure patients than in controls.²⁴ On the other hand, erythrocyte SOD activity did not differ significantly between dogs with DCM and control dogs.^{10,11} We found no information about blood catalase activity in human and canine CHF patients.

B-type natriuretic peptide (BNP) is produced primarily within the heart and released into the circulation in response to increased ventricular wall tension.³⁸ Studies in humans and dogs have shown that heart failure increases the level of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) in the blood, which represents a biomarker of the progression of heart failure.^{3,6,29,38,46}

We tested the hypothesis that indirect measures of oxidative stress (vitamin E, GPX, and MDA) differ among different classes of heart failure in dogs with MVD and DCM. Additionally, we investigated the effect of cardiac therapy on oxidative stress parameters and NT-proBNP in advanced stages of heart failure (International Small Animal Cardiac Health Council, ISACHC II and III). We were also interested in determining whether there is an association (correlation) between disease severity (as measured by NT-proBNP levels) and indirect measures of oxidative stress, as well as between MDA and antioxidants (vitamin E, GPX), in different stages of cardiovascular diseases and in groups of cardiac patients with and without therapy.

Materials and methods

Dogs

Client-owned dogs ($n = 47$) were used in this study: 37 dogs with confirmed cardiovascular disease and 10 healthy dogs. Dogs were judged to be healthy based on their history, a clinical examination including auscultation, the results of hematologic and biochemical analyses, and NT-proBNP levels. A diagnosis of cardiovascular disease and heart failure was confirmed by clinical examination; electrocardiography; 2-D, M-mode, and Doppler echocardiography (Vingmed System Five, General Electric Healthcare, Milwaukee, WI); and thoracic radiography by one experienced examiner (A

Table 1. Diet of dogs included in the oxidative stress study.*

	ISACHC I (n)	ISACHC II (n)	ISACHC III (n)	Healthy dogs (n)
Commercial food	2	2	6	2
Homemade food	1	1	0	2
Combination of commercial and homemade food	8	4	13	6

* ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; n = number of dogs.

Domanjko Petrič). Diagnoses of diseases were in accordance with European and American Colleges of Veterinary Internal Medicine guidelines.^{1,8} Criteria for the diagnosis of CHF were based on clinical signs and radiographic examination. An interstitial or alveolar pulmonary pattern compatible with pulmonary edema with left atrial enlargement and clinical signs of CHF were used to confirm CHF. Hematologic and biochemical analyses were performed (data not shown); dogs with concurrent diseases were excluded from the study. Disease severity was classified with the ISACHC classification for cardiac disease.⁹ According to this classification, patients were classified as asymptomatic (ISACHC I), mild-to-moderate heart failure (ISACHC II), or advanced heart failure (ISACHC III) group. The owners of healthy dogs and cardiac patients completed a questionnaire regarding their dogs' diet, intake of food supplements, treats, and medications. According to owners' answers, the dogs were fed commercial and/or homemade food (Table 1), and none of the dogs were given food supplements.

Written consent of the owners was obtained. All procedures were approved by the Ethical Committee of the Ministry of Agriculture, Forestry and Food, Veterinary Administration of the Republic of Slovenia (Animal Protection Act UL RS 43/2007).

Blood sampling and processing

Dogs were fasted at least 12 h, and blood samples were collected from all groups from the jugular or cephalic vein. Blood samples for determining plasma concentrations of NT-proBNP and MDA were collected into tubes containing the anticoagulant EDTA (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria). Samples were centrifuged immediately after collection ($1,500 \times g$, 15 min, 4°C). Blood samples for determination of plasma vitamin E and whole blood GPX were collected into tubes containing the anticoagulant lithium heparin (Vacuette, Greiner Bio-One). Samples were centrifuged immediately after collection ($1,500 \times g$, 15 min, 4°C). Plasma was separated and immediately frozen at -80°C until analyzed. Aliquots of heparinized whole blood were prepared and immediately frozen at -80°C until analyzed. All measured parameters were analyzed in batch by blinded analysts.

Determination of vitamin E in blood plasma

The procedure was based on analytical methods described elsewhere^{39,50}; 0.5 mL of plasma was placed in glass tubes and mixed with 1 mL of ethanol; 3 mL of n-hexane was added to the mixture and vortexed for 10 s. After the layers separated, 2 mL of the hexane phase was evaporated to dryness under vacuum (Syncore Reactor R-48, Büchi, Flawil, Switzerland) at ~60°C. The dry residue was re-dissolved in 0.5 mL of methanol, and the concentration of vitamin E was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection, using an external standard of α -tocopherol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The HPLC system (Waters, Milford, MA) was equipped with a C18 column, 10 μ m, 3.9 $\times$ 300 mm, a fluorescence detector (Waters), and a computer with the Millennium program for system control and data processing. Methanol at a flow rate of 2 mL/min was used as the mobile phase. The injection volume was 20 μ L. The column was kept at ambient temperature, and detection was carried out at an excitation wavelength of 295 nm and emission wavelength of 330 nm. Lipid-standardized vitamin E (LS-VE) was calculated as the ratio between concentrations of plasma vitamin E (μ mol/L) and the sum of concentrations of serum total cholesterol (mmol/L) and serum triglycerides (mmol/L).^{41,48}

Determination of GPX activity in whole blood

GPX activity was measured spectrophotometrically with an automated biochemistry analyzer (Randox, Crumlin, Great Britain) using a commercial kit (Ransel, Randox), based on a method described elsewhere.³⁰ GPX activity is determined indirectly by measuring the rate of formation of oxidized glutathione (GSSG). GPX catalyzes the reaction of glutathione with synthetic cumene hydroperoxide to GSSG. In the presence of NADPH and glutathione reductase, GSSG is transformed to glutathione, and NADPH is oxidized to NADP. The rate of oxidation of NADPH was measured spectrophotometrically as reduced absorbance at 340 nm and is proportional to the activity of GPX in the specimen. GPX activity was expressed as units/g of hemoglobin (U/g Hb). Hemoglobin concentration in the whole blood hemolysates was determined spectrophotometrically by the cyano-methemoglobin method using an automated biochemistry analyzer (Randox).

Determination of MDA concentration in plasma samples

The MDA concentration in the plasma samples was analyzed as described elsewhere.³⁴ MDA was derivatized with thiobarbituric acid (TBA). Two hundred μ L of plasma, 20 μ L of 0.2% butylated hydroxytoluene (BHT), and 200 μ L of 0.44 M H_3PO_4 were added into a 2-mL plastic microcentrifuge tube, mixed, and left for 15 min. Absolute ethanol (600 μ L)

was added to each sample, and samples were centrifuged (15,000 $\times$ g, 15 min, 4°C). In the glass tubes, 1.5 mL of 0.44 M H_3PO_4 , 700 μ L of centrifuged samples, 1.5 mL of 0.6% TBA, and 0.3 mL of ultrapure water were mixed and heated at 90°C for 60 min. The MDA-TBA₂ adduct was separated by an HPLC system (Waters) equipped with an ODS chromatographic column (C18, 120 A, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 μ m; Phenomenex HyperClone, Torrance, CA) and a fluorescence detector (Waters). The mobile phase consisted of 50 mmol/L of a 65% KH_2PO_4 buffer (pH 6.9) and 35% methanol; flow rate of the mobile phase was 1.0 mL/min. The instrument was calibrated using tetraethoxypropane as the external standard.

Determination of NT-proBNP

Plasma samples for determination of NT-proBNP concentrations were sent to IDEXX Laboratories (Westbrook, ME) and analyzed by ELISA.⁴

Statistical analysis

The data were analyzed with commercial software (SPSS 22.0, Chicago, IL). Descriptive statistics were used to describe the basic features of the data. The Shapiro–Wilk test was performed to test whether the data were normally distributed. A one-way analysis of variance with Tukey HSD post-hoc test in the case of normal distribution of the data (MDA, GPX, age), or Kruskal–Wallis analysis followed by the Mann–Whitney U test with Bonferroni adjustment in the case of non-normal distributed data (vitamin E, LS-VE, NT-proBNP), were used to test for statistically significant differences in the measured parameters between groups of cardiac patients (ISACHC I–III) and the group of healthy dogs. An independent *t*-test in the case of normal distribution of the data (vitamin E, LS-VE, GPX, MDA, age), and the Mann–Whitney U test in the case of non-normal distributed data (NT-proBNP, weight), were performed to test for statistically significant differences in the measured parameters (including age) between cardiac patients with and without therapy (ISACHC II+III), between DCM and MVD patients (ISACHC III) as well as between all cardiac patients and control group dogs (age, weight). The data that were normally distributed are presented as means $\pm$ standard deviations (SDs); the data not normally distributed are presented as median, minimum, and maximum values. According to the results of the normality tests, a Spearman rank correlation coefficient analysis or a Pearson correlation coefficient analysis was performed to determine the correlation between disease severity (NT-proBNP) and oxidative stress parameters (vitamin E, LS-VE, GPX, and MDA), and between MDA and antioxidants (GPX, vitamin E, LS-VE), respectively, in different stages of cardiovascular diseases and in groups of cardiac patients with and without therapy. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Table 2. Cardiovascular diseases of dogs included in the study.*

Cardiovascular disease	ISACHC I (n)	ISACHC II (n)	ISACHC III (n)
Dilated cardiomyopathy	4	1	11
MVD	7	6	8

* ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; MVD = myxomatous mitral valve disease; *n* = number of dogs.

Results

Dogs

Thirty-seven patients with confirmed cardiovascular disease (Table 2) were included in the study (6 Doberman Pinschers, 5 mixed-breed dogs, 5 Great Danes, 4 Cavalier King Charles Spaniels, 4 German Boxers, 2 Airedale Terriers, 2 Shi-Tzus, 2 Whippets, 1 Dalmatian, 1 Schipperke, 1 Irish Wolfhound, 1 Dachshund, 1 Cirneco dell'Etna, 1 Hovawart, 1 Pekinese). Among all cardiac patients were 6 females and 31 males (mean age 8.8 ± 2.8 y, mean weight 31.1 ± 21.5 kg). Ten healthy dogs were enrolled as controls in the study (2 Border Collies, 2 Labrador Retrievers, 1 Hovawart, 1 Rough Collie, 1 Irish Wolfhound, 1 mixed-breed, 1 White Swiss Shepherd Dog, 1 Afghan Hound; 7 females, 3 males, mean age 4.4 ± 2.5 y, mean weight 28.1 ± 9.1 kg). The ISACHC I group consisted of 11 dogs (2 females, 9 males, mean age 9.3 ± 3.6 y, mean weight 35.4 ± 24.7 kg), the ISACHC II group consisted of 7 dogs (7 males, mean age 10.6 ± 1.5 y, mean weight 17.7 ± 12.0 kg), and the ISACHC III group consisted of 19 dogs (4 females, 15 males, mean age 7.9 ± 2.4 y, mean weight 33.5 ± 21.2 kg).

The dogs in the ISACHC II and III groups were combined and then subdivided into a group already receiving cardiac therapy at the time of presentation (13 dogs; 2 females, 11 males, mean age 9.4 ± 2.8 y, mean weight 24.6 ± 22.8 kg) and into a group receiving no cardiac therapy (13 dogs; 2 females, 11 males, mean age 7.9 ± 1.9 y, mean weight 33.9 ± 17.0 kg). In the ISACHC II group, 6 of 7 patients were receiving cardiac therapy, and 1 had not been treated at the time of blood sampling. In the ISACHC III group, 7 of 19 dogs were receiving cardiac therapy; the other dogs in this group had not been treated with cardiac medication at the time of blood sampling. Medication regimens included diuretics (furosemide and spironolactone), beta-blockers (atenolol and sotalol), ACE inhibitors, an inodilator (pimobendan), and digoxin (Table 3). The ISACHC III group was further divided into DCM (11 dogs; 1 female, 10 males; mean age 6.8 ± 1.8 y, mean weight 44.0 ± 21.1 kg) and MVD (8 dogs; 3 females, 5 males; mean age 9.5 ± 2.4 y, mean weight 19.0 ± 10.4 kg) patients. There was no significant difference in weight between control group dogs and all cardiac

Table 3. Treatment used in dogs included in the International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC) II and III groups.*

Therapeutics	ISACHC II (n)	ISACHC III (n)
Furosemide		2
Furosemide and ACE inhibitor	2	1
Furosemide, ACE inhibitor, pimobendan	3	1
Furosemide, ACE inhibitor, pimobendan, beta-blocker	1	1
Furosemide, ACE inhibitor, digoxin, diltiazem		1
Furosemide, ACE inhibitor, pimobendan, digoxin		1
Total no. of dogs with therapy	6	7
Duration of therapy (d)		
Mean	120	44
Min–max	1–487	1–92

* ACE = angiotensin-converting enzyme; min–max = minimum to maximum days; *n* = number of dogs.

patients; however, control dogs were significantly younger in comparison to all cardiac patients ($p = 0.000$) and all ISACHC groups ($p = 0.001$, $p = 0.000$, $p = 0.007$, respectively to ISACHC I–III). Dogs in the individual ISACHC groups did not differ significantly in age. Additionally, there was no significant difference in age between dogs with and without therapy ($p = 0.109$). MVD dogs were significantly older ($p = 0.013$) and lighter ($p = 0.007$) than DCM dogs.

Oxidative stress parameters and NT-proBNP in cardiac patients and healthy dogs

Statistical analysis did not show any significant differences in the activity of GPX (Table 4), vitamin E (Table 4), and LS-VE (Table 4) between controls and individual ISACHC groups or between ISACHC groups. MDA concentration (Table 4) did not differ significantly between controls and individual ISACHC groups. However, MDA concentration (Table 4) in the ISACHC II group was significantly lower in comparison to the ISACHC I ($p = 0.004$) and ISACHC III ($p = 0.017$) groups. NT-proBNP concentrations were significantly higher in ISACHC III (median value: 5,173 pmol/L, minimum–maximum values: 2,047–18,631 pmol/L) in comparison to ISACHC II (median value: 2,569 pmol/L, min–max values: 1,340–8,238 pmol/L; $p = 0.006$) and ISACHC I (median value: 1,207 pmol/L, min–max values: 820–12,056 pmol/L; $p = 0.000$). NT-proBNP concentrations in control dogs (median value: 822 pmol/L, min–max values: 407–1,331 pmol/L) were significantly lower compared to ISACHC II ($p = 0.001$) and ISACHC III ($p = 0.000$), but not to ISACHC I ($p = 0.017$).

Statistical comparison between DCM and MVD patients in the ISACHC III group showed no significant differences

Table 4. Glutathione peroxidase (GPX), malondialdehyde (MDA), vitamin E, and lipid standardized vitamin E (LS-VE) in cardiac patients and healthy dogs.*

	GPX (U/g Hb)†	MDA ($\mu\text{mol/L}$)†	Vitamin E ($\mu\text{mol/L}$)‡	LS-VE $\times 10^{-3}$ ‡
ISACHC I ($n = 11$)	458 $\pm$ 44	1.77 $\pm$ 0.75	57.8; 25.8–117.0	8.91; 5.52–20.72
ISACHC II ($n = 7$)	466 $\pm$ 37	0.71 $\pm$ 0.58§	49.0; 35.2–107.5	7.64; 3.89–11.71
ISACHC III ($n = 19$)	414 $\pm$ 70	1.55 $\pm$ 0.64	71.7; 35.8–113.1	8.84; 6.16–14.00
Healthy dogs ($n = 10$)	394 $\pm$ 44	1.34 $\pm$ 0.31	56.8; 38.9–72.4	8.38; 6.77–10.59

* ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; n = number of dogs; U/g Hb = units per gram of hemoglobin.

† Mean $\pm$ standard deviation.

‡ Median; minimum to maximum values.

§ Significantly lower in comparison with ISACHC I ($p = 0.004$) and ISACHC III ($p = 0.017$).

Table 5. Oxidative stress parameters in canine myxomatous mitral valve disease (MVD) and dilated cardiomyopathy (DCM) patients (ISACHC III).*

	GPX (U/g Hb)†	MDA ($\mu\text{mol/L}$)†	Vitamin E ($\mu\text{mol/L}$)†	LS-VE $\times 10^{-3}$ †	NT-proBNP (pmol/L)‡
MVD ($n = 8$)	468 $\pm$ 57§	1.35 $\pm$ 0.47	69.6 $\pm$ 20.8	8.3 $\pm$ 1.07	5,005; 2,047–18,631
DCM ($n = 11$)	377 $\pm$ 52	1.69 $\pm$ 0.73	70.0 $\pm$ 22.4	9.55 $\pm$ 2.40	5,173; 4,088–16,704

* GPX = glutathione peroxidase; ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; LS-VE = lipid-standardized vitamin E; MDA = malondialdehyde; n = number of dogs; NT-proBNP = N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; U/g Hb = units per gram of hemoglobin.

† Mean $\pm$ standard deviation.

‡ Median; minimum to maximum values.

§ Significantly ($p = 0.004$) higher in comparison to DCM dogs.

in MDA, vitamin E, LS-VE, and NT-proBNP; however, GPX activity was significantly higher in MVD dogs than in DCM dogs ($p = 0.004$; Table 5).

The effect of cardiac therapy

Statistical analysis did not show significant differences in the measured parameters (MDA, GPX, vitamin E, LS-VE) and age between patients receiving cardiac therapy and those without therapy (Table 6). The median value of NT-proBNP in non-treated dogs (4,876 pmol/L, min–max values: 2,047–16,704 pmol/L) was not significantly different from the treated dogs (3,346 pmol/L, min–max values: 1,340–18,631 pmol/L).

Correlations

There were no significant correlations between NT-proBNP and oxidative stress parameters in any of the ISACHC groups. In treated cardiac patients, NT-proBNP showed significant correlation with vitamin E (Fig. 1; $r = 0.566$, $p = 0.044$) and MDA (Fig. 2; $r = 0.637$, $p = 0.019$). In addition, significant positive correlation was observed between MDA and vitamin E (Fig. 3; $r = 0.605$; $p = 0.028$) and LS-VE (Fig. 4; $r = 0.697$; $p = 0.008$) in treated patients. Correlations between NT-proBNP and GPX ($r = -0.573$, $p = 0.051$) and

LS-VE ($r = 0.549$, $p = 0.052$) were not significant in treated patients. No significant correlations between measured parameters were observed in non-treated patients.

Discussion

Results of our study showed no significant differences of measured oxidative stress parameters between ISACHC groups or in comparison with the control group. The lack of significant differences in GPX activity between control dogs and individual groups of cardiac patients, or between ISACHC groups, is in contrast to results from human studies that reported significantly decreased GPX activity in CHF patients.^{18,23,32} However, we found significantly higher GPX activity in MVD patients compared to DCM patients in the ISACHC III group. This might be ascribed to the effect of age, given that the MVD patients were significantly older than the DCM patients, or to disease etiology. A significant increase of whole blood GPX with aging was reported in Labrador Retrievers.⁴⁰ A recent study in healthy dogs reports a tendency of higher GPX activity in geriatric dogs.⁴³

MDA concentrations did not differ significantly between controls and individual ISACHC groups; however, significantly lower MDA concentrations were found in the ISACHC II group compared to the ISACHC I and ISACHC III groups. The latter might be the result of stochastic chance

Table 6. Oxidative stress parameters (mean $\pm$ standard deviation) in canine cardiac patients with and without therapy (ISACHC II and III).*

	GPX (U/g Hb)	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Vitamin E ($\mu\text{mol/L}$)	LS-VE $\times 10^{-3}$
Cardiac therapy ($n = 13$)	438 ± 65	1.31 ± 0.79	60.7 ± 22.8	8.31 ± 3.00
No therapy ($n = 13$)	420 ± 68	1.34 ± 0.68	70.6 ± 22.6	8.85 ± 1.30

* GPX = glutathione peroxidase; ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; LS-VE = lipid-standardized vitamin E; MDA = malondialdehyde; n = number of dogs; U/g Hb = units per gram of hemoglobin.

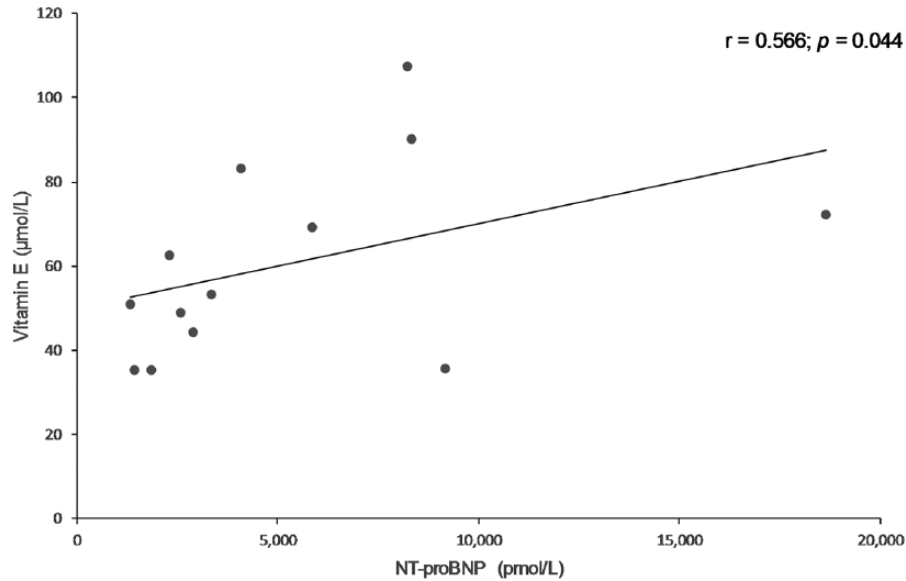


Figure 1. Scatter plot showing a significant positive correlation between plasma vitamin E and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) concentrations in cardiac patients with therapy (ISACHC II and III, 13 dogs). ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; r = Spearman correlation coefficient.

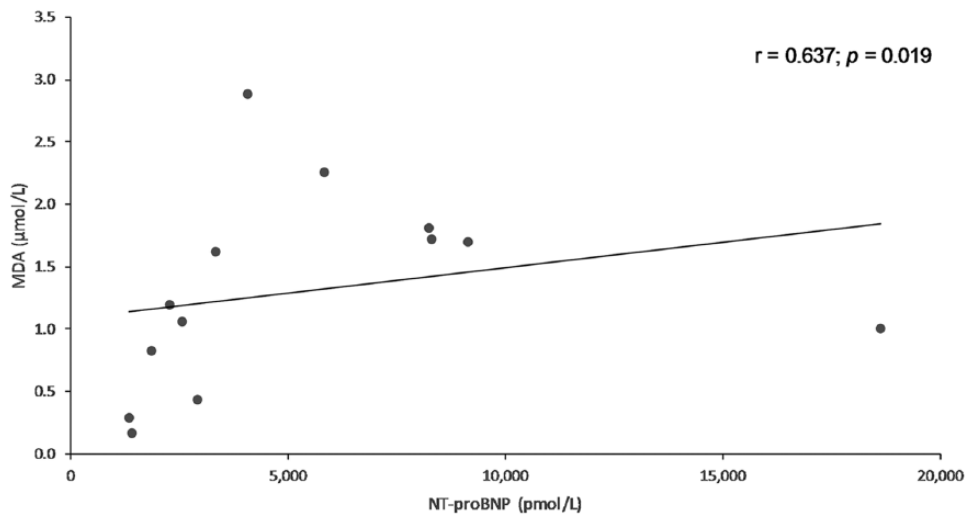


Figure 2. Scatter plot showing a significant positive correlation between plasma malondialdehyde (MDA) and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) concentrations in cardiac patients with therapy (ISACHC II and III, 13 dogs). ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; r = Spearman correlation coefficient.

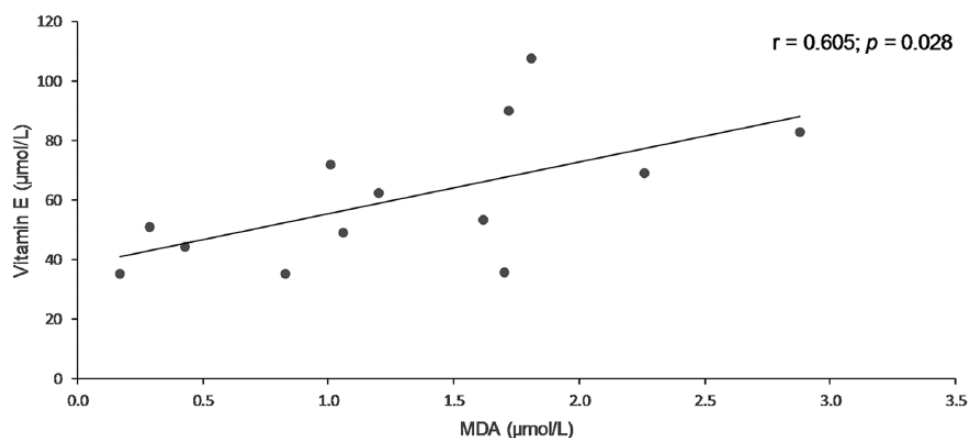


Figure 3. Scatter plot showing a significant positive correlation between plasma vitamin E and malondialdehyde (MDA) concentrations in cardiac patients with therapy (ISACHC II and III, 13 dogs). ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; r = Pearson correlation coefficient.

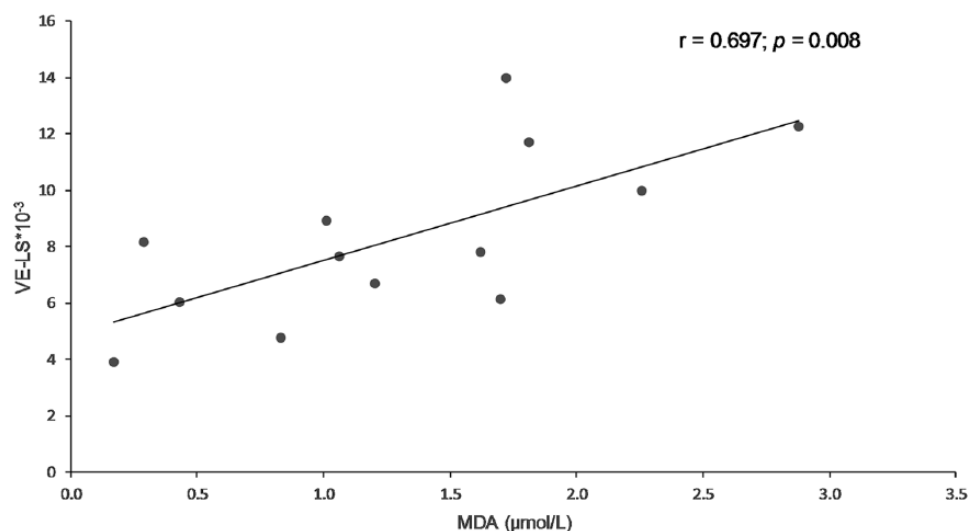


Figure 4. Scatter plot showing a significant positive correlation between plasma lipid-standardized vitamin E (LS-VE) and malondialdehyde (MDA) concentrations in cardiac patients with therapy (ISACHC II and III, 13 dogs). ISACHC = International Small Animal Cardiac Health Council classification for cardiac disease; r = Pearson correlation coefficient.

and may not be of biological significance. Several studies have demonstrated elevated plasma concentrations of MDA in human patients with CHF.^{2,7,20,31,37,49} It has also been shown that MDA increased with the stage of heart failure (New York Heart Association [NYHA] I or II to NYHA III or IV) in human patients.^{31,37} In contrast, in 2 canine studies, no significant difference in plasma MDA concentration was found between canine DCM patients¹¹ and controls and between CHF patients (MVD and DCM)¹² and controls. Additionally, plasma MDA concentration did not correlate to disease severity in DCM¹¹ and MVD patients¹² (Reimann MJ, et al. Low-density lipoprotein oxidation).

Cardiovascular drugs, such as beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium channel blockers, have been shown to have

antioxidant properties.^{15,21,27,28,47} Some of these drugs were shown to limit the extent of lipid peroxidation, which resulted in lower MDA concentrations.^{27,28,47} We expected lower plasma MDA concentrations in treated patients; however, no significant difference in MDA concentrations was found between treated and non-treated patients.

We found no significant differences in vitamin E and LS-VE between control dogs and individual groups of cardiac patients, or between ISACHC groups. Contrary to our results, significantly lower vitamin E concentrations have been found in dogs with CHF (DCM and MVD) in comparison to control dogs.¹² Moreover, in that study,¹² no significant difference was observed in vitamin E concentration between MVD and DCM patients, which is in accordance

with the results of our study. An inverse correlation between plasma vitamin E and LS-VE and mortality resulting from ischemic heart disease has been demonstrated in human patients.¹³ Although some human studies^{31,32,37} have shown decreased levels of vitamin E concentration, which decreased with severity of heart failure, other human studies^{5,18} and studies in canine patients^{10,11} (Reimann MJ, et al. Low-density lipoprotein oxidation) have shown no changes in vitamin E concentration in CHF.

In our study, significantly higher plasma NT-proBNP concentration was determined in the ISACHC III group in comparison to ISACHC II and ISACHC I. We observed a significant positive correlation in treated patients (ISACHC II and III) between NT-proBNP and MDA, which suggests an association between MDA and NT-proBNP. In human patients, MDA levels correlated significantly positively with heart failure class.³⁷ The lack of significant correlation between NT-proBNP and MDA in untreated patients might lie in the fact that this group consisted of all but one ISACHC II patient, whereas NT-proBNP concentration was more consistent in comparison with the group of treated patients. In our study, NT-proBNP also significantly positively correlated with vitamin E in treated patients. Moreover, we observed significant positive correlations between MDA and vitamin E and between MDA and LS-VE in treated patients. These results suggest that vitamin E concentration and LS-VE values increase with the extent of lipid peroxidation and with the increase of NT-proBNP in treated canine patients. It is possible that treatment might affect vitamin E homeostasis and MDA levels or that this is the result of wider variation of NT-proBNP in the treated group as mentioned above. Our results are in contrast to those of another study¹¹ in which a significant negative correlation between disease severity and plasma vitamin E concentration was found in a group of canine cardiac patients (DCM).¹¹ The difference between our study and the published study¹¹ might be attributed to differences in dogs included in the study and the use of different classification systems. DCM dogs with and without CHF were included in the published study,¹¹ and classified according to the modified NYHA classification.

Our study has several limitations. These include no age and sex match between the control group and the 3 groups of cardiac patients; no information regarding reproductive status; as well as the inclusion of 2 different diseases (MVD, DCM). An additional limitation might be that the healthy controls had no echocardiographic examination done. We cannot completely exclude the effect of age and/or sex on the measured parameters. There are only a few reports on the effect of age and/or sex on antioxidant enzyme activity,^{40,43,44} MDA,⁴² and vitamin E⁴⁰ in dogs. In addition, the effect of diet on our results cannot be excluded. No detectable differences in several oxidative stress parameters (vitamins E and C, antioxidant capacity, retinol, MDA, 8-F_{2α}-isoprostane, protein carbonyls, reduced and oxidized glutathione) were found between dogs eating antioxidant-enriched diets compared to

other diets.¹² According to owners' answers, the dogs in our study were fed random diets (home-made or commercial food or a combination of both); however, the information in the questionnaire may not have been a true reflection of food intake. Body condition score was not recorded because none of the dogs was extremely under- or overweight. The treatment protocol of dogs in CHF was based on diuretics, ACE inhibitors, an inodilator, and antiarrhythmics; however, the dose regimen and selected drugs were individually adjusted, potentially influencing the results of measured oxidative stress parameters. The ISACHC groups were not completely homogenized regarding the duration of therapy and combination of drugs, which might also have affected our results.

Acknowledgments

We thank Dr. Peter B. Connolly from IDEXX Laboratories (Westbrook, ME) for the analysis of NT-proBNP.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: We acknowledge the financial support of the Slovenian Research Agency (research program P4-0053).

References

1. Atkins C, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* 2009;23:1142–1150.
2. Belch JJ, et al. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 1991;65:245–248.
3. Boswood A, et al. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 2008;49:26–32.
4. Cahill RJ, et al. Analytical validation of a second-generation immunoassay for the quantification of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in canine blood. *J Vet Diagn Invest* 2015;27:61–67.
5. de Lorgeril M, et al. Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure. Insights into the potential importance of selenium in heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001;3:661–669.
6. DeFrancesco TC, et al. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. *J Vet Intern Med* 2007;21:243–250.
7. Díaz-Vélez CR, et al. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131:146–152.
8. Dukes-McEwan J, et al.; ESVC Taskforce for Canine Dilated Cardiomyopathy. Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2003;5:7–19.
9. Fox PR, et al. International Small Animal Cardiac Health Council. Appendix A—Recommendations for diagnosis of

- heart disease and treatment of heart failure in small animals. In: Fox PR, et al., eds. *Textbook of Canine and Feline Cardiology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999:883–896.
10. Freeman LM, et al. Antioxidant status in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Nutr* 1998;128(Suppl):S2768–S2770.
 11. Freeman LM, et al. Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc* 1999;215:644–646.
 12. Freeman LM, et al. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2005;19:537–541.
 13. Gey KF, et al. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991;53(Suppl 1):S326–S334.
 14. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest* 2005;3:500–508.
 15. Hornig B, et al. Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation* 2001;103:799–805.
 16. Jordan P, et al. Vitamin E and vitamin A concentrations in plasma adjusted for cholesterol and triglycerides by multiple regression. *Clin Chem* 1995;41:924–927.
 17. Kaul N, et al. Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993;30:55–67.
 18. Keith M, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1352–1356.
 19. Kohen R, Nyska A. Invited review. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002;30:620–650.
 20. Mak IT, Weglicki WB. Comparative antioxidant activities of propranolol, nifedipine, verapamil and diltiazem against sarcolemmal membrane lipid peroxidation. *Circ Res* 1990;66:1449–1452.
 21. Mak S, Newton GE. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. *Chest* 2001;120:2035–2046.
 22. Mates JM. Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species. *Toxicology* 2000;153:83–104.
 23. McMurray J, et al. Evidence for enhanced free radical activity in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65:1261–1262.
 24. McMurray J, et al. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur Heart J* 1993;14:1493–1498.
 25. Meydani M. Vitamin E. *Lancet* 1995;345:170–175.
 26. Meydani M. Vitamin E modulation of cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:271–279.
 27. Nakamura K, et al. Beta-blockers and oxidative stress in patients with heart failure. *Pharmaceuticals* 2001;4:1088–1100.
 28. Napoli C, et al. Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am Heart J* 2004;148:e5.
 29. Oyama MA, et al. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *J Am Vet Med Assoc* 2008;232:1496–1503.
 30. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–169.
 31. Polidori MC, et al. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure. *Free Radic Biol Med* 2002;32:148–152.
 32. Polidori MC, et al. Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Fail* 2004;10:334–338.
 33. Prasad K, et al. Cardiac depressant effects of oxygen free radicals. *Angiology* 1993;44:257–270.
 34. Rezar V, et al. Dose-dependent effects of T-2 toxin on performance, lipid peroxidation, and genotoxicity in broiler chickens. *Poult Sci* 2010;86:1155–1160.
 35. Sagols E, Priymenko N. Oxidative stress in dog with heart failure: the role of dietary fatty acids and antioxidants. *Vet Med Int* 2011;2011:180206.
 36. Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:7–30.
 37. Serdar A, et al. Relation of functional capacity with the oxidative stress and antioxidants in chronic heart failure. *Congest Heart Fail* 2001;7:309–311.
 38. Serres F, et al. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J Vet Cardiol* 2009;11:103–121.
 39. Sivertsen T, et al. Plasma vitamin E and blood selenium concentration in Norwegian dairy cows: Regional differences and relations to feeding and health. *Acta Vet Scand* 2005;46:177–191.
 40. Stowe HD, et al. Antioxidant status of pair-fed labrador retrievers is affected by diet restriction and aging. *J Nutr* 2006;136:1844–1848.
 41. Thurnham DI, et al. The use of different lipids to express serum tocopherol: lipid ratios for the measurement of vitamin E status. *Ann Clin Biochem* 1986;23:514–520.
 42. Todorova I, et al. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comp Clin Path* 2005;13:190–194.
 43. Tomsic K, et al. Plasma total antioxidant capacity, and activities of blood glutathione peroxidase and superoxide dismutase determined in healthy dogs by using commercially available kits. *Acta Vet (Beogr)* 2016;66:534–548.
 44. Vajdovich P, et al. Changes in some red blood cell and clinical laboratory parameters in young and old Beagle dogs. *Vet Res Commun* 1997;21:463–470.
 45. Valko M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84.
 46. van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr. Emerging biomarkers in heart failure. *Clin Chem* 2012;58:127–138.
 47. Weglicki WB, et al. Mechanisms of cardiovascular drugs as antioxidants. *J Mol Cell Cardiol* 1990;22:1199–1208.
 48. Winbauer AN, et al. Evaluating serum α -tocopherol (vitamin E) in terms of a lipid ratio. *Ann Clin Lab Sci* 1999;29:185–9:1.
 49. Wojciechowska C, et al. Oxidative stress markers and C-reactive protein are related to severity of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. *Mediators Inflamm* 2014;2014:147040.
 50. Zhao B, et al. Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Sci* 2004;7:200–204.