Martina Cimerman

VNETNI IN IMUNSKI ODZIV PRI PSIH Z MIKSOMATOZNO DEGENERACIJO MITRALNE ZAKLOPKE

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2025

UNIVERZA V LJUBLJANI | VF Veterinarska fakulteta

Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina

Veterinarska medicina

UDK 611.018.1:616-092:616.126.42:632.161:636.7(043.3)

Martina Cimerman, dr. vet. med.

VNETNI IN IMUNSKI ODZIV PRI PSIH Z MIKSOMATOZNO DEGENERACIJO MITRALNE ZAKLOPKE

Doktorska disertacija

INFLAMMATORY AND IMMUNE RESPONSE IN DOGS WITH MYXOMATOUS MITRAL VALVE DEGENERATION

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2025

Martina Cimerman

Vnetni in imunski odziv pri psih z miksomatozno degeneracijo mitralne zaklopke

Delo je bilo opravljeno na:

- Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

- Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

- Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

- Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

- Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani

Javni zagovor je bil opravljen:
Mentorica: prof. dr. Aleksandra Domanjko Petrič, dr. vet. med.
Somentorica: prof. dr. Alenka Nemec Svete, univ. dipl. inž. kem. inž.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:
Predsednik: prof. dr. Robert Frangež, dr. vet. med.
Članica: prof. dr. Mojca Narat, univ. dipl. biol.
Zunanji član: izr. prof. dr. Marin Torti, dr. vet. med.

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.

IZVLEČEK

Ključne besede: miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke; pes; celice naravne ubijalke; regulacijske celice T; monociti; citokini; kemokini

Namen raziskave je bil proučiti razlike v deležih imunskih celic psov pri različnih stopnjah miksomatozne degeneracije mitralne zaklopke (MDMZ) ter v primerjavi z zdravimi psi in ugotoviti, ali imajo izbrani vnetni in imunski parametri napovedno vrednost. V prvem delu raziskave smo s Coxovo regresijsko analizo pri 62 psih z MDMZ ugotovili, da nevtrofilni granulociti, monociti in limfociti niso imeli napovedne vrednosti. Višja koncentracija citotoksičnih celic T je bila negativno povezana s preživetjem, medtem ko je bil delež celic T pomagalk pozitivno povezan s preživetjem v skupini psov z nestabilnim kongestivnim srčnim popuščanjem (KSP) ter skupini vseh psov z MDMZ. V prospektivnem delu raziskave smo pri 64 psih z MDMZ in 17 zdravih psih z metodo pretočne citometrije določili deleže podvrst limfocitov T, celic naravnih ubijalk ter monocitov in izmerili koncentracije citokinov in kemokinov (interlevkin (IL) 1β, IL-2, IL-6, IL-10, dejavnika tumorske nekroze α (TNF-α), keratinocitnega kemokina in monocitnega kemotaktičnega proteina 1 (MCP-1)). Delež aktiviranih celic T pomagalk je bil značilno nižji v skupini stabilnega KSP v primerjavi z ostalimi skupinami, medtem ko razlik v deležu citotoksičnih celic T ter regulacijskih celic T med skupinami ni bilo. Delež monocitov je bil značilno višji v skupini stabilnega in nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično skupino, medtem, ko razlik v zastopanosti posameznih monocitnih podvrst med preiskovanimi skupinami ni bilo. Prav tako ni bilo razlik v deležih celic naravnih ubijalk. Za oceno medsebojnih povezav smo izračunali Spearmanove korelacijske koeficiente v skupini vseh psov z MDMZ in ugotovili negativno povezavo med monocitno podvrsto $CD14^{-}MHC\ II^{+}$ in MCP-1 ter pozitivno povezavo med monociti in MCP-1. Delež celic T pomagalk je bil negativno povezan s koncentracijami IL-6 ter TNF-α, medtem ko je bil delež citotoksičnih celic T pozitivno povezan s koncentracijo TNF-α. Slednje ugotovitve nakazuje vpletenost monocitov in citotoksičnih celic T pri vnetnem procesu MDMZ ter pozitivno vlogo celic T pomagalk v patogenezi MDMZ. Rezultati naše študije potrjujejo pomembno vlogo imunskega sistema pri patofiziologiji MDMZ.

ABSTRACT

Keywords: myxomatous mitral valve degeneration; dog; natural killer cells; regulatory T cells; monocytes; cytokines; chemokines

The aim of the study was to investigate differences in the proportions of immune cells in dogs at different stages of myxomatous mitral valve degeneration (MMVD) and in comparison with healthy dogs, and to determine whether selected inflammatory and immune parameters have predictive value. In the first part of the study, using Cox regression analysis in 62 dogs with MMVD, we found that neutrophil granulocytes, monocytes, and lymphocytes had no predictive value. Higher concentrations of cytotoxic T cells were negatively associated with survival, while the proportion of T helper cells was positively associated with survival in the group of dogs with unstable congestive heart failure (CHF) and in the group of all dogs with MMVD. In the prospective part of the study, we used flow cytometry to determine the proportions of T lymphocyte subtypes, natural killer cells, and monocytes in 64 dogs with MMVD and 17 healthy dogs, and measured the concentrations of cytokines and chemokines (interleukin (IL) 1β, IL-2, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor α (TNF-α), keratinocyte chemotactic-like, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)). The proportion of activated T helper cells was significantly lower in the stable CHF group compared to the other groups, while there were no differences in the proportion of cytotoxic T cells and regulatory T cells between the groups. The proportion of monocytes was significantly higher in the stable and unstable CHF groups compared to the preclinical group, while there were no differences in the representation of individual monocyte subtypes between the groups studied. There were also no differences in the population of natural killer cells. To assess the interrelationships, we calculated Spearman's correlation coefficients in the group of all dogs with MMVD and found a negative correlation between the monocyte subtype $CD14^{-}$MHC $II^{+}$and MCP-1 and a positive correlation between monocytes and MCP-1. The proportion of T helper cells was negatively correlated with IL-6 and TNF-α concentrations, while the proportion of cytotoxic T cells was positively correlated with TNF-α concentration. These findings indicate the involvement of monocytes and cytotoxic T cells in the inflammatory process of MMVD and the positive role of T cells in the pathogenesis of MMVD. The results of our study confirm the important role of the immune system in the pathophysiology of MMVD.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD 17

1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE 17

1.2 Namen raziskave 19

1.3 Hipoteze 19

2 PREGLED LITERATURE 20

2.1 Miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke 20

2.2 Vnetni in imunski odziv pri MDMZ in srčnem popuščanju 21

2.3 Nevtrofilni granulociti 24

2.4 Monociti 25

2.5 Limfociti T 26

2.5.1 Celice T pomagalke 26

2.5.2 Regulacijske celice T 27

2.5.3 Citotoksične celice T 28

2.5.4 Dvojno pozitivne celice T 29

2.5.5 Dvojno negativne celice T 29

2.6 Celice naravne ubijalke 30

2.7 Vnetje kot prognostični dejavnik pri obolenjih srca 31

3 MATERIALI IN METODE 33

3.1 RETROSPEKTIVNA ŠTUDIJA POVEZAVE IMUNSKIH IN VNETNIH CELIC S PREŽIVETJEM PSOV Z MDMZ 33

3.1.1 Živali 33

3.1.2 Podatki ehokardiografskih pregledov 34

3.1.3 Podatki krvnih analiz 35

3.1.4 Statistične analize 35

3.2 PROSPEKTIVNA ŠTUDIJA PERIFERNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PRI PSIH Z MDMZ 37
3.2.1 Živali 37
3.2.2 Ehokardiografija 38
3.2.3 Odvzem in priprava vzorcev krvi 39
3.2.4 Hematološke in biokemijske preiskave 39
3.2.5 C-reaktivni protein 40
3.2.6 Citokini in kemokini 40
3.2.7 N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B 40
3.2.8 Pretočna citometrija 41
3.2.9 Statistična analiza 42
4 REZULTATI 44
4.1 POVEZAVA IMUNSKIH,VNETNIH IN EHOKARDIOGRAFSKIH PARAMETROV S PREŽIVETJEM PSOV Z MDMZ 44
4.1.1 Povezava celic diferencialne bele krvne slike s preživetjem psov z MDMZ 45
4.1.2 Povezava imunskih celic s preživetjem psov z MDMZ 45
4.1.3 Povezava krvnih označevalcev s preživetjem psov z MDMZ 45
4.1.4 Povezava ehokardiografskih parametrov s preživetjem psov z MDMZ 46
4.1.5 Korelacije med izbranimi imunskimi celicami, citokini ter ehokardiografskimi spremenljivkami in krvnimi biomarkerji 57
4.2 PROSPEKTIVNA ŠTUDIJA IMUNSKIH IN VNETNIH CELIC V RAZLIČNIH FAZAH MDMZ IN V PRIMERJAVI Z ZDRAVO SKUPINO PSOV 60
4.2.1 Primerjava hematoloških parametrov med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi 60
4.2.2 Primerjava krvnih biooznačevalcev med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi 61
4.2.3 Primerjava deležev imunskih celic med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi 63

4.2.4 Primerjava koncentracij citokinov in kemokinov v krvi med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi 65

4.2.5 Korelacije med izbranimi preiskovanimi parametri 67

5 RAZPRAVA 72

6 SKLEPI 83

7 POVZETEK 84

9 ZAHVALE 90

10 LITERATURA 91

11 NAČRT RAVNANJA RAZISKOVALNIH PODATKOV (NRRP) 112

11.1 Obrazec NRRP – končna različica 112

11.2 Dostopnost do raziskovalnih podatkov doktorske raziskave 113

12 PRILOGE 114

12.1 Priloga 1: Izviren znanstveni članek s področja doktorske disertacije 114

KAZALO SLIK

Slika 1: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja v treh stopnjah MDMZ (z vrednostjo P testa log-rank in tabelo tveganja). 44
Figure 1: Kaplan-Meier survival curve in three MMVD stages (with log-rank test P-value and risk table). 44
Slika 2: Spearmanovi korelacijski koeficienti statistično značilnih spremenljivk v skupini vseh psov z MDMZ. S križcem so označene neznačilne korelacije (P > 0,1). 58
Figure 2: Spearman correlation coefficients of statistically significant variables in the group of all dogs with MMVD. A cross indicates non-significant correlations (P > 0.1). 58
Slika 3: Prikaz primerjav koncentracije levkocitov in diferencialne bele krvne slike med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi. 61
Figure 3: Comparison of white blood cell count and differential white blood cell counts between groups of dogs with MMVD and healthy dogs. 61
Slika 4: Prikaz primerjav koncentracije NT-proBNP in CRP med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi. 62
Figure 4: Figure 4: Comparison of NT-proBNP and CRP levels between groups of dogs with MMVD and healthy dogs. 63
Slika 5: Prikaz primerjav imunskih celice, izmerjenih s pretočno citometrijo, med različnimi skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi. 64
Figure 5: Comparison of immune cell counts measured by flow cytometry between different groups of dogs with MMVD and healthy dogs. 64
Slika 6: Prikaz primerjav koncentracij citokinov in kemokinov med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi. 66
Figure 6: Comparison of cytokine and chemokine concentrations between groups of dogs with MMVD and healthy dogs. 66
Slika 7: Korelacije med izbranimi imunskimi celicami ter citokini in kemokini. 67
Figure 7: Correlations between selected immune cells and cytokines and chemokines. 68
Slika 8: Slika 8: Korelacije med imunskimi celicami in izbranimi ehokardiografskimi parametri. 69
Figure 8: Figure 8: Correlations between immune cells and selected echocardiographic parameters. 69

Slika 9: Korelacije krvnih biomarkerjev (NT-proBNP in CRP) z imunskimi celicami, citokini in kemokini ter izbranimi ehokardiografskimi parametri. 70
Figure 9: Correlations of blood biomarkers (NT-proBNP and CRP) with immune cells, cytokines and chemokines and selected echocardiographic parameters. 71

KAZALO TABEL

Tabela 1: Demografski podatki psov, vključenih v retrospektivno študijo preživetja 33

Table 1: Demographic data of dogs included in the retrospective survival study 33

Tabela 2: Demografski podatki vključenih psov v prospektivno študijo 38

Table 2: Demographic data of dogs included in the prospective study 38

Tabela 3: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, predklinična skupina 46

Table 3: Results of univariate Cox regression analysis, preclinical group 46

Tabela 4: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, skupina stabilnega KSP 49

Table 4: Results of univariate Cox regression analysis, stable KSP group 49

Tabela 5: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, skupina nestabilnega KSP 51

Table 5: Results of univariate Cox regression analysis, unstable KSP group 51

Tabela 6: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, združena skupina psov z MDMZ 54

Table 6: Results of univariate Cox regression analysis, combined group of dogs with MMVD 54

SEZNAM ČLANKOV

1. Cimerman M, Druzhaeva N, Nemec Svete A, et al. Inflammatory and immune variables as predictors of survival in dogs with myxomatous mitral valve disease. BMC Vet Res 2024; 20(1): 431.
   doi: 10.1186/s12917-024-04266-7
   - Faktor vpliva: 2,3 (Q1)

SEZNAM OKRAJŠAV

A – pozni mitralni priliv (val A)

ACVIM – Ameriški kolidž veterinarske interne medicine; angl. American College of Veterinary Internal Medicine

Ang – angiotenzin

AT – angiotenzinski receptor; angl. angiotensin receptor

CD - označevalec pripadnosti; cluster of differentiation

CM – klasični monociti; angl. classical monocytes

CRP – C-reaktivni protein

cTnI – srčni troponin I

E – zgodnji mitralni priliv (val E)

E/A – razmerje med zgodnjim (val E) in poznim (val A) mitralnim prilivom

GLS – globalna vzdolžna sistolična deformacija; angl. global longitudinal strain

GLS aplax – globalna apikalna vzdolžna sistolična deformacija; angl. global longitudinal strain in apical long-axis

GLS Avg – povprečna globalna vzdolžna sistolična deformacija; angl. average global longitudinal strain

GLS 2-ch – globalna vzdolžna sistolična deformacija v dvovotlinskem pogledu; angl. global longitudinal strain in two-chamber view

GLS 4-ch – globalna vzdolžna sistolična deformacija v štirivotlinskem pogledu; angl. global longitudinal strain in four-chamber view

HR – razmerje tveganja; angl. hazard ratio

IL – interlevkin

IM – vmesni monociti; angl. intermediate monocytes

INFγ – interferon γ

IQR – interkvartilni razpon; angl. interquartile range

KC-like – keratinocitni kemokin

KSP – kongestivno srčno popuščanje

LAN – premer levega preddvora, normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,309}$); angl. left atrial diameter normalized for body weight

LA/Ao – razmerje med premerom levega preddvora in aorte; angl. left atrial to aortic ratio

LVIDd – premer levega prekata ob koncu diastole; angl. left ventricular end-diastolic diameter

LVIDdN – premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); angl. left ventricular end-diastolic diameter normalized for body weight

LVIDs – premer levega prekata ob koncu sistole; angl. left ventricular end-systolic diameter

LVIDsN – premer levega prekata ob koncu sistole, normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); angl. left ventricular end-systolic diameter normalized for body weight

MCP-1 – monocitni kemotaktični protein 1

MDMZ – miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke

MHC II – glavni histokompatibilni kompleks II

MLR – razmerje med koncentracijo monocitov in limfocitov; angl. monocyte-to-lymphocyte ratio

NCM – neklasični monociti; angl. non-classical monocytes

NETs – zunajcelične nevtrofilne pasti; angl. neutrophil extracellular traps

NK – celice naravne ubijalke; angl. natural killer cell

NLR – razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; angl. neutrophil-to-lymphocyte ratio

NT - proBNP – N-terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B

PRRs – vzorčno prepoznavni receptorji; angl. pattern recognition receptors

RAAS – renin angiotenzin aldosteron sistem; angl. renin-angiotenzin-aldosteron system

ROS – reaktivne kisikove zvrsti; angl. reactive oxygen species

TGF-β – transformirajoči rastni dejavnik β

Th – celice T pomagalke

TNF-α – dejavnik tumorske nekroze α

Treg – regulacijske celice T

TRPG – transtrikuspidalni tlačni gradient; angl. transtricuspid pressure gradient

WBC – koncentracija levkocitov; angl. white blood cell count

1 UVOD

1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE

Miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke (MDMZ) je najpogostejša bolezen srca pri psih, katere prevalenca se viša s starostjo ter lahko znaša vse do 90 % pri psih nad 8 leti starosti. Veliko psov z MDMZ živi brez očitnih znakov bolezni, medtem ko v približno 30 % ta vodi v kongestivno srčno popuščanje (KSP) in posledično smrt (Borgarelli in Haggstrom, 2010). Namen sodobne terapije MDMZ in KSP je vzdrževanje hemodinamike srca, upočasnitev napredovanja bolezni, podaljšanje preživetja in izboljšanje kakovosti življenja. Zdravljenje vključuje pozitivna inotropna zdravila, zaviralce angiotenzinske konvertaze in diuretično terapijo (Keene in sod., 2019). Kljub vsemu pa MDMZ ostaja progresivno obolenje z visokim deležem smrti. To nakazuje, da trenutne smernice zdravljenja morda ne naslovijo vseh pomembnih patofizioloških mehanizmov, ki so vpleteni v napredovanje bolezni.

Pri razvoju KSP sodeluje več patofizioloških mehanizmov, med drugim simpatični živčni sistem ter renin-angiotenzin-aldosteronski sistem (RAAS) (Schwinger, 2021). Produkti RAAS prispevajo k aktivaciji različnih signalnih poti, kar vodi v povečano produkcijo vnetnih citokinov, nastanku reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) ter mobilizacijo vnetnih celic (Griendling in sod., 2000; Suzuki in sod., 2005; Hunyady in Catt, 2006).

Psi z MDMZ imajo zlasti v napredovalem stadiju bolezni povišane koncentracije vnetnih citokinov, kot so interlevkin (IL) 1β, IL-6 in dejavnik tumorske nekroze α (TNF-α) (Nemec Svete in sod., 2021; Piantedosi in sod., 2022). Poleg tega so pri psih z MDMZ opisane tudi višje koncentracije določenih kemokinov, kot sta monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1) (Zois in sod., 2012) in keratinocitni kemokin (KC-like) (Rubio in sod., 2020).

Pri psih z MDMZ je zlasti v fazi KSP ugotovljena tudi povišana koncentracija levkocitov (WBC) kot posledica povišane koncentracije nevtrofilnih granulocitov in monocitov (Domanjko Petrič in sod., 2018; Hamilton-Elliot in sod., 2018; Nemec Svete in sod., 2021; Kocaturk in sod., 2024). Dodatno so pri ljudeh s kroničnim popuščanjem srca ugotovili spremenjeno zastopanost različnih monocitnih podvrst v primerjavi z zdravo populacijo (Amir

in sod., 2012; Van Craenenbroeck in sod., 2014; Elchinova in sod., 2018). Pri psih zastopanost monocitnih podvrst v povezavi s srčno-žilnimi obolenji še ni bila raziskana.

Poleg opisanih sprememb belih krvnih celic so pri psih z MDMZ ugotovili tudi razlike v podvrstah limfocitov T. V študiji avtorice Druzhaeva in sod. (2021) so našli povišano koncentracijo in povečan delež citotoksičnih celic T (CD8+) ter manjši delež celic T pomagalk (CD4+) pri psih pri katerih je bolezen napredovala v fazo KSP. Nasprotno pa so v študiji avtorja Piantedosi in sod. (2022) pri psih z MDMZ poročali o povečanem deležu celic T pomagalk ter zmanjšanem deležu citotoksičnih celic T. Ugotovili so tudi, da imajo ti psi v vseh stopnjah bolezni povečan delež regulacijskih celic T (Treg) v primerjavi z zdravimi psi.
Nasprotno pa študije pri ljudeh s kroničnim popuščanjem srca poročajo o zmanjšanem deležu regulacijskih celic T ter o izgubi njihove imunsko regulacijske funkcije (Tang in sod., 2010; Martins in sod., 2023).

Celice naravne ubijalke (NK) pri ljudeh s koronarnim obolenjem izražajo manjšo aktivnost, kar se lahko kaže kot zmanjšan delež celic NK ali kot zmanjšana citotoksična sposobnost, ki vključuje manjšo produkcijo interferona γ (INFγ) (Hak in sod., 2007).
Pri psih vpliv KSP na delež celic NK še ni dobro raziskan. Trenutno ni objavljenih študij, ki bi proučevale zastopanost celic NK pri psih z MDMZ.

Vnetni označevalci lahko služijo tudi kot napovedni dejavniki preživetja. Pri ljudeh s popuščanjem srca so ugotovili, da povišana koncentracija C-reaktivnega proteina (CRP), ki je protein akutne faze vnetja, predstavlja negativen napovedni dejavnik (Ostrowska in sod., 2017, Matsumoto in sod., 2019; Lima in sod., 2022; Hartmann in sod., 2024; Zhou in Du, 2025). Višji sistemski imunsko-vnetni indeks, ki je sestavljen vnetni kazalnik in združuje tri pomembne imunske celice, vključno z nevtrofilnimi granulociti, limfociti in trombociti, je bil povezan z večjo verjetnostjo hospitalizacije ter smrti pri pacientih s kardiovaskularnimi obolenji (Tang in sod., 2021).
Pri psih z MDMZ je v fazi KSP opisana negativna povezava med WBC in časom preživetja (Brložnik in sod., 2023). Tako pri ljudeh (Cho in sod., 2020; Delcea in sod., 2024) kot pri psih (Jung in Kim, 2023; Ku in sod., 2023; DeProspero in sod., 2023; Kocaturk in sod., 2024) predstavlja povišano razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov (NLR)

negativni prognostični dejavnik pri KSP. Prav tako povišano razmerje med koncentracijo monocitov in limfocitov (MLR) predstavlja negativen napovedni dejavnik pri psih z MDMZ (Jung in Kim, 2023; Ku in sod., 2023).

1.2 NAMEN RAZISKAVE

Namen raziskave je bil pridobiti podrobnejši vpogled v vnetni in imunski odziv psov z MDMZ v različnih stopnjah bolezni v primerjavi z zdravimi psi ter povezavo med deleži vnetnih in imunskih celic in preživetjem psov z MDMZ:

1. Z retrospektivno študijo, izvedeno na psih z MDMZ v različnih stopnjah bolezni, smo želeli ugotoviti, ali so koncentracije in deleži posameznih vnetnih in imunskih celic povezani s preživetjem pri teh psih.

2. V okviru prospektivne študije smo želeli ugotoviti, ali se deleži preiskovanih imunskih celic psov z MDMZ razlikujejo glede na napredovanje bolezni ter v primerjavi z zdravimi psi, ter ali so te spremembe v povezavi s koncentracijami citokinov in kemokinov ter parametri napredovanja bolezni.

1.3 HIPOTEZE

1. Psi v različnih stopnjah MDMZ imajo v primerjavi z zdravimi psi ter z napredovanjem bolezni povečan delež celic Treg v povezavi z manjšo koncentracijo IL-2 in IL-10, manjši delež celic NK ter spremenjeno razmerje monocitnih podvrst.

2. Večja koncentracija nevtrofilnih granulocitov, monocitov in CD8+ ter manjša koncentracija CD4+ predstavlja dejavnik tveganja za zgodnjo smrt pri psih z MDMZ.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 MIKSOMATOZNA DEGENERACIJA MITRALNE ZAKLOPKE

Miksomatozno degeneracijo opredeljuje zadebelitev lističev zaklopk, primarno mitralne, lahko pa sta prizadeti tudi trikuspidalna in aortna zaklopka, kar povzroči insuficienco zaklopk ter volumsko preobremenitev levega prekata in preddvora. Bolezenski proces ne prizadene le lističev zaklopk, patološki proces prizadene tudi tendinozne horde, kar lahko z napredovanjem bolezni vodi do njihove rupture in nenadnega poslabšanja bolezni (Fox, 2012).

Napredovanje bolezni ugotavljamo na podlagi povečanja ehokardiografskih parametrov, kjer so kot pomembne potrdili premer levega preddvora, razmerje med premerom levega preddvora in aorte, premer levega prekata ob koncu diastole ter hitrost zgodnjega mitralnega priliva (val E), ki odraža višino tlaka v levem preddvoru (Borgarelli in sod., 2008).

Poleg morfoloških in funkcionalnih sprememb so za oceno napredovanja bolezni srca pomembni tudi krvni pokazatelji obremenitve (N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B (NT-proBNP)) in poškodbe srca (srčni troponin I (cTnI)) (Chanmongkolpanit in sod., 2024). Natriuretični peptidi se primarno sintetizirajo v miokardu preddvorov ter prekatov. Glavni stimulus za njihovo sintezo in sproščanje je mehanski stres miokarda, ki nastane kot posledica volumske in tlačne obremenitve srca. Koncentracija NT-proBNP je zato klinično uporabna tako pri diagnostiki kot tudi prognostični oceni srčnega popuščanja (Panagopoulou, in sod., 2013). Srčni troponin I je regulacijski protein, ki ima ključno vlogo pri krčenju srčne mišice in je sestavni del troponinskega kompleksa (troponin C, troponin I in troponin T), ki uravnava interakcijo med aktinom in miozinom, proteini, odgovornimi za krčenje mišičnih vlaken. V fizioloških pogojih se cTnI nahaja izključno znotraj kardiomiocitov, njegovo povišano koncentracijo v krvnem obtoku zato povezujemo z miokardno poškodbo (Langhorn in Willesen, 2016).

MDMZ klasificiramo v skladu s smernicami Ameriškega kolidža veterinarske interne medicine (ACVIM) (Keene in sod., 2019) v naslednje kategorije:

1. ACVIM A

· V tej fazi obstaja pasemska predispozicija za razvoj bolezni, vendar brez vidnih in funkcionalnih sprememb na srcu.

2. ACVIM B1 (Predklinična faza bolezni)

· Predklinična faza bolezni z ehokardiografskimi spremembami zaklopk, insuficienco, a brez sekundarnega povečanja votlin srca.

3. ACVIM B2 (Predklinična faza bolezni)

· Predklinična faza bolezni z ehokardiografskimi spremembami zaklopk, insuficienco ter sekundarno povečanimi dimenzijami votlin srca, zlasti levega preddvora in prekata v fazi diastole.

4. ACVIM C (Faza popuščanja srca)

· V tej kategoriji so pacienti, ki so v kroničnem srčnem popuščanju, in tudi tisti, v akutni (dekompenzirani) fazi popuščanja.

6. ACVIM D (Refraktarna faza popuščanja srca)

· V tej fazi standardna terapija za popuščanje srca ne zadostuje, kar vodi v ponavljajoče epizode kongestije.

2.2 VNETNI IN IMUNSKI ODZIV PRI MDMZ IN SRČNEM POPUŠČANJU

Patofiziologija popuščanja srca je izjemno kompleksna in vključuje številne medsebojno povezane mehanizme, ki še vedno niso v celoti raziskani. V zadnjih letih se vedno več raziskav osredotoča na vlogo imunskega sistema pri razvoju in nastanku srčnega popuščanja (Li in sod., 2025). Prekomerna hemodinamska obremenitev srca vodi v aktivacijo prirojenega in pridobljenega imunskega odziva. Pri prirojenem imunskem odzivu ob poškodbi miokarda je odziv nespecifičen, pri pridobljenem je odziv specifičen, za katerega so odgovorni limfociti B in T (Frantz in sod., 2018).

Prirojen imunski sistem se aktivira preko transmembranskih in citosolnih receptorjev, imenovanih vzorčno prepoznavni receptorji (PRRs), ki prepoznajo molekulske vzorce patogenov, endogenega materiala, ki se sprosti iz apoptotičnih celic, ali molekulske vzorce

mikroorganizmov, ki izvirajo iz črevesne mikrobiote (Mann, 2011; Brown in Hazen, 2018). Slednje izražajo celice v srcu, kot so kardiomiociti, endotelijske celice ter lokalno prisotne imunske celice. Aktivacija PRRs sproži povečano prepisovanje genov, odgovornih za izražanje vnetnih citokinov in kemokinov (Mann, 2011). Med najpomembnejše PPRs spadajo tolični receptorji, prek katerih se aktivirajo številni transkripcijski dejavniki, kot sta jedrni faktor kappa B in interferon regulacijski dejavniki, ki vodijo v povečano produkcijo vnetnih citokinov (Kumar in sod., 2009).

V akutni fazi vnetja prihaja do povečane produkcije vnetnih citokinov s sočasno migracijo nevtrofilnih granulocitov in monocitov iz krvnega obtoka na mesto poškodbe. Temu sledi proliferacijska faza, ki jo karakterizira fagocitoza nekrotičnih celic s strani tkivnih makrofagov ter povečan priliv limfocitov T in B. V tej fazi prav tako prihaja do aktivacije miofibroblastov s povečano produkcijo kolagena ter sintezo protivnetnih mediatorjev, kot so lipoksini, transformirajoči rastni dejavnik β (TGF-β) in IL-10. V zadnji maturacijski fazi se formira brazgotinsko tkivo, kar ima za posledico preoblikovanje miokarda (Prabhu in Frangogiannis, 2016; Swirski in Nahrendorf, 2018).

Pomembno vlogo pri aktivaciji imunskega odziva pri obolenju srca ima aktivacija nevrohormonskih mehanizmov, predvsem RAAS. Zaradi zmanjšanega iztisnega volumna in padca arterijskega tlaka se zmanjša prekrvavitev ledvic in ultrafiltracija kar vodi v povečano produkcijo renina, ki katalizira pretvorbo plazemskega angiotenzinogena v angiotenzin (Ang) I. Angiotenzinska konvertaza je encim, ki katalizira pretvorbo Ang I v Ang II (Álvarez-Zaballos in Martínez-Sellés, 2023). Angiotenzin II je glavni efektor RAAS, in medtem ko njegova akutna aktivacija poveča sistemski tlak z regulacijo ravnovesja vode in soli v telesu ter vazokonstrikcijo, kronična stimulacija Ang II prispeva k hipertrofiji levega prekata ter zmanjšani fibrinolizi tako v srcu kot ledvicah (He in Anderson, 2013). Poleg tega lahko presežek aldosterona – hormona nadledvičnih žlez, katerega produkcijo stimulira Ang II – vodi v napredovanje bolezni srca s stimulacijo razraščanja fibroznega tkiva, kar prispeva k večji togosti miokarda in slabši krčljivosti srca (Xanthakis in Vasan, 2013). Angiotenzin II se lahko veže na dva receptorja, in sicer na angiotenzinski receptor (AT) tipa 1 ali tipa 2. Razmerje med receptorjema AT2 in AT1 v srcu je 2:1, vendar ob prisotnosti srčno-žilnih obolenj prihaja do večje ekspresije AT1, prek katerega se aktivirajo nekatere serin/treonin kinaze, vključno s

proteinsko kinazo C ter z mitogenom aktivirano proteinsko kinazo (Mirzoyev in sod., 2005; Suzuki in sod., 2005; Hunyady in Catt, 2006). Poleg tega Ang II vodi do aktivacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfatne oksidaze in produkcije ROS (Griendling in sod., 2000). Aktivacija omenjenih signalnih poti prispeva k vnetnemu procesu v miokardu, preoblikovanju miokarda in napredovanju bolezni srca.

Pri pacientih s kroničnim popuščanjem srca – ne glede na etiologijo bolezni – opisujejo vztrajajoče vnetno stanje. To je povezano s povišanimi koncentracijami vnetnih citokinov, kot so IL-1, IL-6 ter TNF-α (Yndestead in sod., 2007). Povišane koncentracije vnetnih citokinov (Nemec Svete in sod., 2021; Piantedosi in sod., 2022) kot tudi nekaterih kemokinov, kot sta MCP-1 (Zois in sod., 2012) in KC-like (Rubio in sod., 2020), ugotavljamo tudi pri psih z MDMZ.

IL-1 predstavlja osrednjo skupino citokinov, ki igrajo ključno vlogo pri uravnavanju akutnih kot kroničnih vnetnih procesov. Znotraj te skupine je IL-1β prepoznan kot ena izmed najpomembnejših terapevtskih tarč, saj njegova specifična inhibicija vodi v zmanjšanje klinične aktivnosti številnih avtoimunskih obolenj (Dinarello, 2011). Dokazano je, da IL-1β zmanjšuje beta-adrenergično odzivnost L-tipa kalcijevih kanalov (Liu in sod., 1999). Poleg tega zavira prepisovanje ključnih genov, vpletenih v homeostazo kalcija, kot sta fosfolamban in Ca-ATP-aza sarkoplazemskega retikuluma (Combes in sod., 2002). Interlevkin 1β prav tako inducira izražanje sintaze dušikovega oksida v kardiomiocitih, kar vodi v zmanjšanje mitohodrijske kemične energije ter posledično zmanjšano krčljivost miokarda (Tatsumi in sod., 2000).

IL-6 je v sodelovanju s TNF-α in v odzivu na stimulacijo IL-1β odgovoren za sintezo nekaterih proteinov akutne faze vnetja, kot sta CRP in fibrinogen (Kalogeropoulos in sod., 2010; Chia in sod., 2021). Tako IL-6 kot TNF-α zmanjšujeta izražanje Ca-ATP-aza sarkoplazemskega retikuluma, ki posreduje pri prenosu kalcija v sarkoplazemski retikulum in je bistvena za učinkovito relaksacijo kardiomiocitov v času diastole (Wu in sod., 2011). Kot posledica tega je bila opisana povezava med povišano koncentracijo IL-6 ter TNF-α in ehokardiografskimi parametri diastolične disfunkcije (Torre-Amione in sod., 1996; Raymond in sod., 2001).

MCP-1 spada v družino C-C kemokinov in deluje kot močan kemotaktični dejavnik za monocite. Uravnava migracijo in infiltracijo monocitov, spominskih limfocitov T ter celic NK (Deshmane in sod., 2009). Podobno vlogo ima tudi kemokin KC-like, član družine C-X-C kemokinov, ki sodeluje pri privabljanju nevtrofilnih granulocitov na mesto poškodbe (Karlsson in sod., 2016).

2.3 NEVTROFILNI GRANULOCITI

Nevtrofilni granulociti so prve celice, ki infiltrirajo miokard po poškodbi in so ključni za pravilno celjenje ran, kar vključuje fagocitozo poškodovanih celic ter polarizacijo makrofagov z reparacijskim fenotipom (Prabhu in Frangogiannis, 2016; Horckmans in sod., 2017). Kljub svoji pomembni vlogi pri odstranjevanju posledic poškodbe ima njihova dolgotrajna aktivacija lahko citotoksične učinke, kar vključuje sproščanje ROS in različnih komponent iz citoplazmatskih zrnc, kot so mieloperoksidaze, matriksne metaloproteinaze, serinske proteaze in laktoferin (Faurschou in Borregaard, 2003), kot tudi nastajanje zunajceličnih nevtrofilnih pasti (NETs) (Soehnlein in sod., 2009). Zunajcelične nevtrofilne pasti so velike tridimenzionalne strukture, sestavljene iz tanke kromatinske DNA, povezane s histoni, zrnatini encimi in peptidi, ki predstavljajo obliko načrtovane apoptoze nevtrofilnih granulocitov oz. NETozo (Soehnlein in sod., 2009; Kruger in sod., 2015). Novejše študije kažejo, da NETs pomembno prispevajo k sterilnemu vnetju pri krvnožilnih obolenjih (Franck in sod., 2018; Perdomo in sod., 2019).

Pri kroničnem popuščanju srca se poveča število nevtrofilnih granulocitov v miokardu, pa tudi v periferni krvi, vranici in kostnem mozgu. V krvi so koncentracije kemotaktičnih dejavnikov povišane. Med pomembnimi sta denimo kemokina C-X-C motivni ligand 1 (CXCL1) in C-X-C motivni ligand 5 (CXCL5), odgovorna za aktivacijo in mobilizacijo nevtrofilnih granulocitov na mesto poškodbe (Antipenko in sod., 2024).

Študije na psih z MDMZ so pokazale, da imajo psi v fazi KSP v krvi značilno višjo koncentracijo nevtrofilnih granulocitov v primerjavi s psi s predklinično boleznijo ter zdravimi psi (Domanjko Petrič in sod., 2018, Hamilton-Elliot in sod., 2018, Nemec Svete in sod., 2021).

2.4 MONOCITI

Monociti so pomemben sestavni del prirojenega imunskega sistema, pri čemer uravnavajo sintezo tako vnetnih kot protivnetnih citokinov in prispevajo k homeostazi endotelija. V začetnem stadiju bolezni srca monociti sodelujejo predvsem pri odstranitvi vnetnih ligandov ter fagocitozi nekrotičnih celic. Dolgotrajna aktivacija monocitov lahko privede do intersticijske fibroze, zmanjšane krčljivosti miokarda in posledično preoblikovanja srca (Wrigley in sod., 2011).

Monociti predstavljajo heterogeno populacijo celic in jih v humani medicini delimo na tri glavne podvrste glede na izražanje označevalca pripadnosti (CD) 14 in CD16, in sicer na klasične monocite ($CD14^{+}CD16^{-}$; CM), vmesne monocite ($CD14^{+}CD16^{+}$; IM) ter neklasične monocite ($CD14^{-}CD16^{+}$; NCM) (Sraeyes in sod., 2018).

Klasični monociti izražajo visoko fagocitno aktivnost in proizvajajo vnetne citokine, kot so IL-1, IL-6, MCP-1 ter TNF-α. Vmesni monociti imajo visoko izražanje angiogenih receptorjev ter nizko produkcijo citokinov. Neklasični monociti pretežno migrirajo v nevnetna tkiva in so odgovorni za nadzor homeostaze tkiva, kljub temu pa izražajo visoko produkcijo citokinov, kot so TNF-α, IL-1, IL-6 in IL-12 (Shantsila in Lip, 2009; Ziegler-Heitbrock in sod., 2010; Shantsila in sod., 2011).

Podobno gre tudi pri psih za heterogeno populacijo celic, ki jih lahko razdelimo na tri podvrste na podlagi izražanja CD14 in glavnega histokompatibilnega kompleksa II (MHC II), in sicer na: $CD14^{+}$MHC II^{-}, $CD14^{+}$MHC II^{+} in $CD14^{-}$MHC II^{+} (Gibbons in sod., 2017; Rzepecka in sod., 2019). Pri zdravih psih predstavlja podvrsta $CD14^{+}$MHC II^{+} večinski delež monocitov. Na elektronskih mikroskopskih slikah je možno opaziti značilne morfološke razlike med posameznimi podvrstami monocitov, kjer so bile pri $CD14^{+}$MHC II^{-} podvrsti vidne večje in bolj številčnejše granule ter vakuole v primerjavi z drugima dvema podvrstama, kar nakazuje na možnost večje fagocitne vloge $CD14^{+}$MHC II^{-} (Gibbons in sod., 2017).

Študije na ljudeh so pokazale, da se zastopanost monocitnih podvrst razlikuje pri pacientih s srčno-žilnimi obolenji, pri čemer se porazdelitev spreminja glede na etiologijo bolezni (Oh in sod., 2021).

V raziskavi avtorja Amir in sod. (2012) so pri pacientih s kroničnim popuščanjem srca ugotovili povečanje deleža NCM ter zmanjšanje deleža CM , medtem ko je delež IM ostal nespremenjen. V drugi študiji pa so ugotovili povečanje deležev IM kot tudi NCM, ob hkratnem znižanju deleža NCM v fazi dekompenziranega popuščanja srca. Ob primerjavi podatkov ob sprejemu pacientov v bolnišnično oskrbo in ob odpustu je bilo ugotovljeno zmanjšanje deleža IM ter povečanje deleža CM (Goonewardena in sod., 2016). Povečan delež IM pri popuščanju srca so potrdili tudi v študiji avtorice Elchinova in sod. (2018), kjer so ugotovili tudi povezavo med višjo koncentracijo IM ter slabšim prognostičnim izidom bolezni. Pri pacientih z miokardnim infarktom naj bi bil večji delež IM povezan tudi z višjimi koncentracijami cTnI in IL-6 ter slabšo sistolično funkcijo levega prekata (Tapp in sod., 2012).

2.5 LIMFOCITI T

Limfociti T so ključni del pridobljene (specifične) imunosti. Izvirajo iz kostnega mozga in dokončno dozorijo v timusu, kjer se nato delijo na dve glavni podvrsti: celice T pomagalke ($CD3^+CD4^+$) in citotoksične celice T ($CD3^+CD8^+$) (Sun in sod., 2023). Limfociti T imajo dvojno vlogo pri obolenjih srca, saj sodelujejo pri obnovi v primeru akutne poškodbe, medtem ko v primeru dolgotrajne aktivacije pripomorejo k preoblikovanju prekatov (Martín in Sánchez-Madrid, 2025). V študijah na miših, kjer so zmanjšali število limfocitov T, so opazili ohranjeno sistolično funkcijo. Poleg tega je bilo prisotno manj fibroznega tkiva in manjša hipertrofija miokarda. Zmanjšanje števila limfocitov T je preprečilo napredovanje v popuščanje srca, kar nakazuje, da ima aktivacija limfocitov T pomembno vlogo pri preoblikovanju levega prekata in napredovanju bolezni (Nevers in sod., 2015). Infiltracija limfocitov T v miokard je ugotovljena tudi pri pacientih s kroničnim popuščanjem srca tako ishemične kot neishemične etiologije (Blanton in sod., 2019).

2.5.1 Celice T pomagalke

Celice T pomagalke (Th, $CD3^+CD4^+$) so heterogena populacija, ki vključuje različne podskupine, kot so Th1, Th2, Th17 in regulacijske celice T. Celice Th1 so odgovorne za sintezo vnetnih citokinov, kot sta INF-γ ter IL-2 (Chen in sod., 2000), medtem ko celice Th2 sintetizirajo protivnetne citokine, kot so IL-4, IL-5 in IL-13 (Paul in Zhu, 2010). Celice Th17 so ključne za produkcijo vnetnega citokina IL-17 (Korn in sod., 2009), medtem ko igrajo

regulacijske celice T pomembno vlogo pri uravnavanju imunskega odziva s pomočjo protivnetnih citokinov (Schmetterer in sod., 2012).

Na modelu kronične ishemične kardiomiopatije pri miših so ugotovili povečano izražanje vseh podvrst celic T pomagalk s spremembo v razmerju Th1/Th2 in Th17/Treg celicami v miokardu, v prid celicam Th2 in Th17 (Bansal in sod., 2017). Pri psih z MDMZ, kjer so primerjali delež celotne populacije celic T pomagalk v periferni krvi, so v eni študiji ugotovili značilno manjši delež celic T pomagalk pri psih s popuščanjem srca v primerjavi z zdravimi psi (Druzhaeva in sod., 2021). Nasprotno pa je druga študija pokazala značilno večji delež celic T pomagalk pri psih s popuščanjem srca v primerjavi s starostno primerljivo zdravo populacijo psov (Piantedosi in sod., 2022).

2.5.2 Regulacijske celice T

Regulacijske celice T karakterizira izražanje transkripcijskega faktorja FoxP3. Celice imajo ključno vlogo pri regulaciji imunskega sistema. Imunosupresivni učinek dosegajo prek visoke produkcije inhibitornih citokinov, kot so IL-10, IL-35 in TGF-β (Plitas in Rudensky, 2016).

Študije na miših so pokazale, da pomanjkanje izražanja TGF-β močno zmanjša sposobnost organizma za učinkovito zaviranje pretiranega vnetnega odziva (Kanamori in sod., 2016; Turner in sod., 2020). Interlevkin 10, ki ga proizvajajo regulacijske celice T, ima pomembno vlogo pri preprečevanju ateroskleroze in nastajanju aterosklerotičnih plakov (Kuan in sod., 2021). Poleg tega IL-10 zmanjšuje izražanje adhezijskih molekul na endotelijskih celicah, kar vodi v zmanjšano adhezijo in migracijo vnetnih celic (Sawant in sod., 2019). Interlevkin 35 spodbuja delovanje in diferenciacijo regulacijskih celic T. Pri miših, ki jim primanjkuje IL-35, so opazili zmanjšano sposobnost zaviranja vnetnega odziva (Shao in sod., 2021). Dodaten citokin, ki je ključnega pomena za pravilen razvoj in delovanje regulacijskih celic T, je IL-2. Regulacijske celice T same sicer ne proizvajajo IL-2, vendar lahko njegovo pomanjkanje ali mutacije gena za IL-2 v povezavi z njim vodijo do nastanka nekaterih avtoimunih obolenj (Harris in sod., 2023). Študije na miših so pokazale, da je povečano izražanje IL-2 povezano z večjo produkcijo regulacijskih celic T, kar je prispevalo k boljšemu celjenju in obnovi srčne funkcije po ishemični poškodbi miokarda (Xiao in sod., 2017).

Pri ljudeh s kroničnim popuščanjem srca je bilo ugotovljeno, da imajo manjši delež regulacijskih celic T v primerjavi z zdravo populacijo (Tang in sod., 2010; Martins in sod., 2023). Zaradi posledično manjše produkcije protivnetnih citokinov prihaja do manjšega zaviranja vnetnih citokinov, kot sta TNF-α in IFN-γ ter večjega vnetnega odziva (Tang in sod., 2010). Nasprotno so v nedavni študiji na psih z MDMZ dokazali višji delež regulacijskih celic T v vseh skupinah obolelih (ACVIM B1-D) v primerjavi z zdravimi psi (Piantedosi in sod., 2023).

2.5.3 Citotoksične celice T

Citotoksične celice T so pomembne pri uničevanju znotrajceličnih patogenov, kot so virusi in nekateri bakterijski povzročitelji, ki jih protitelesa zaradi znotrajcelične lokacije ne morejo doseči. Apoptozo tarčne celice sprožene s strani citotoksičnih celic T omogoča prepoznavanje antigenov na površini okužene celice, ki so predstavljeni na molekulah MHC (Anderson in sod., 2006). Njihov mehanizem delovanja temelji na od kalcija odvisnem sproščanju litičnih snovi iz granul ob prepoznavanju specifičnega MHC I antigena na površini celic. Litične granule so modificirani lizosomi, ki vsebujejo dve glavni vrsti citotoksičnih efektorskih proteinov, ki so izraženi v citotoksičnih celicah T in vključujejo perforin in serinske proteaze, predvsem Grancim B (Janeway in sod., 2001). Perforin omogoča tvorbo transmembranskih por v plazmalemi tarčne celice, kar omogoči vstop grancimov v citoplazmo. Slednji aktivirajo kaskado znotrajceličnih signalov, ki vodijo v aktivacijo cisteinskih proteaz, in razpad ključnih celičnih proteinov, kar vodi v apoptozo celice (Trapani in Sutton, 2003).

Ostanki Grancima B so bili najdeni tudi v območju infarkta miokarda, pri ekperimentalni okluziji koronarne žile pri miših, prisotnost tega pa je sovpadala z infiltracijo citotoksičnih celic T (Santos-Zas, 2021). V študiji avtorja Varda-Bloom in sod. (2000) so opisali, da bi citotoksične celice T po infarktu miokarda lahko vodile tudi do apoptoze normalnih kardiomiocitov prek interakcije z MHC I, ki se izražajo na površini kardiomiocitov. Večina razpoložljivih podatkov o vlogi citotoksičnih celic T temelji na raziskavah ishemične poškodbe miokarda, medtem ko je njihova vloga pri kroničnem popuščanja srca še slabo raziskana (Varda Bloom in sod., 2000; Zhang in sod., 2018; Santos Zas in sod., 2021). Pri psih z MDMZ je vloga citotoksičnih celic

T prav tako še slabo razjasnjena, saj so rezultati dosedanjih raziskav neenotni. Ena izmed raziskav je pokazala, da imajo psi z MDMZ v fazi KSP povišano koncentracijo in delež citotoksičnih celic T v primerjavi z zdravimi kontrolnimi psi (Druzhaeva in sod., 2021). Nasprotno pa so rezultati druge študije, prav tako izvedene na populaciji psov z MDMZ, pokazali, da je delež citotoksičnih celic T pri psih v stopnji KSP značilno nižji v primerjavi s starostno primerljivo zdravo skupino psov (Piantedosi in sod., 2022).

2.5.4 Dvojno pozitivne celice T

Limfociti T so običajno bodisi CD4 pozitivni (celice T pomagalke) bodisi CD8 pozitivni (citotoksične celice T). V perifernem krvnem obtoku pa so našli tudi celice, ki so pozitivne na oba označevalca, tako imenovane dvojno pozitivne celice T (DPT). Te celice so bile prvič odkrite pri ljudeh, kasneje pa so bile opisane tudi pri drugih vrstah, kot so miši, podgane, kokoši, primati in prašiči (Overgaard in sod., 2015).

Vloga celic DPT je še vedno slabo raziskana, vendar novejša študija, izvedena na zdravih psih, nakazuje, da bi te celice lahko izražale funkcionalne značilnosti celic Th1, Th2 ter Th17 s produkcijo različnih citokinov, kot so IL-4, IL-13 ter IL-17A (Protschka in sod., 2024). Podatki o vlogi celic DPT v kontekstu srčno-žilnih obolenj so zelo omejeni; večina obstoječih raziskav se osredotoča na kronično obliko Chagasove bolezni (Giraldo in sod., 2011). Gre za parazitarno okužbo, ki jo povzroča *Trypanosoma cruzi* in se prenaša preko krvosesnih žuželk v regijah Srednje in Južne Amerike. V kronični fazi lahko povzroča resnejše zaplete, kot je npr. Chagasova kardiomiopatija (Coura in Borges-Pereira, 2010). Do danes je bila izvedena zgolj ena študija, ki je preučevala zastopanost celic DPT pri psih z MDMZ, pri čemer niso ugotovili značilnih razlik v populaciji celic med obolelimi in zdravimi psi (Druzhaeva in sod., 2021).

2.5.5 Dvojno negativne celice T

V perifernem krvnem obtoku so prisotne tudi dvojno negativne celice T (DNT, $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{-}$), ki ne izražajo označevalcev za CD4 in CD8, vendar pa kot vsi limfociti T izražajo T-celični receptor, kar jim omogoča prepoznavanje in aktivacijo ob stiku s patogenom (Li in Tsokos, 2021). Te celice lahko delujejo bodisi kot celice T pomagalke bodisi kot

citotoksične celice T, pri tem pa igrajo pomembno vlogo v prirojenem in pridobljenem imunskem odzivu ter uravnavajo funkcijo makrofagov, citotoksičnih celic T in limfocitov B. Dvojno negativne celice T se aktivirajo predvsem pri patologijah, povezanih z vnetnimi obolenji, avtoimunskimi boleznimi ter neoplastičnimi obolenji (Wu in sod., 2022).

Nedavna študija je prvič karakterizirala celice DNT ter raziskala njihovo potencialno vlogo v imunskem odzivu pri zdravih psih. Ugotovljeno je bilo, da imajo celice DNT sposobnost izražanja faktorjev, značilnih za skupino Th2 celic, z visokim izražanjem mRNA za protivnetne citokine, kot so IL-4, IL-5 ter IL-13 (Protschka in sod., 2024). Interlevkin 4 je ključen za indukcijo produkcije imunoglobulina E, ki je osrednji mediator v alergijskem odzivu, medtem ko IL-5 uravnava aktivacijo eozinofilnih granulocitov. Interlevkin 13 sodeluje pri indukciji hiperplazije čašastih celic, spodbuja povečano produkcijo sluzi in kontrakcijo gladkomišičnih celic (Finkelman in sod., 2010). Te ugotovitve prikazujejo pomembno vlogo DNT celic pri alergijskih ali parazitnih obolenjih (Protschka in sod., 2024).

Do danes še ni bilo objavljenih študij, ki bi proučevale vlogo celic DNT pri popuščanju srca. V članku avtorice Druzhaeva in sod. (2021) so te populacije celic prvič karakterizirali pri psih z MDMZ, vendar niso ugotovili značilnih razlik v koncentraciji in deležu med zdravo in bolno populacijo psov.

2.6 CELICE NARAVNE UBIJALKE

Celice naravne ubijalke so veliki granulirani limfociti, ki ne spadajo pod limfocite B ali T ter se na splošno štejejo za CD21 in CD3 negativne (Ringler in Krakowka, 1985). Igrajo ključno vlogo pri omejevanju virusnih okužb in zaviranju razvoja neoplastičnih obolenj. Njihovo delovanje temelji predvsem na citolitični aktivnosti prek sproščanja grancimov ter perforinov. Celice prepoznajo in uničijo na podlagi zmanjšane prezentacije molekule MHC I na celični površini, kar je tipično za virusne in neoplastične celice (Vivier in sod., 2008). Poleg tega celice NK izločajo številne citokine, med katerimi sta najpomembnejša TNF-α in INF-γ (Fauriat in sod., 2010).

Označevanje populacije celic NK je bila v zadnjih desetletjih obsežno raziskana pri ljudeh in miših, medtem ko karakterizacija teh celic pri psih še vedno predstavlja velik izziv (Razmara

in sod., 2024). V raziskavi avtorja Huang in sod. (2008) so prvič opisali označevanje celic NK pri psih na podlagi izražanja površinskega označevalca CD5, ki sicer velja za označevalca limfocitov T. Ugotovili so, da so celice s šibkim izražanjem $CD5^{dim}$ večje, vsebujejo več citoplazemskih zrn in izkazujejo na antigen neodvisno citotoksičnost, ki je značilna za celice NK (Huang in sod., 2008). Kasnejše študije so preučevale razliko med populacijama $CD3^{+}CD5^{dim}CD21^{-}$ in $CD3^{+}CD5^{-}CD21^{-}$, pri čemer so imele celice $CD5^{dim}$ bolj izraženo produkcijo INF-γ ter niso izražale T-celičnih receptorjev. Na podlagi teh rezultatov so raziskovalci predlagali, da gre za heterogeno populacijo celic in da bi različne podskupine lahko predstavljale stopnje v dozorevanju celic NK (Shin in sod., 2013). Kljub temu pa ostajajo razvojne stopnje celic NK pri psih slabo raziskane v primerjavi s podatki, ki so na voljo pri ljudeh in miših (Kim in sod., 2002; Freud in sod., 2014). Zaenkrat tudi ni na voljo publikacije, ki bi opisala karakterizacijo in primerjavo populacije celic NK pri psih s srčno-žilnimi obolenji, medtem ko pri ljudeh s koronarnim obolenjem opisujejo, da prihaja pri teh pacientih do značilno nižjega deleža celic NK v primerjavi z zdravo populacijo, opazili pa so tudi zmanjšano funkcionalno aktivnost, kar se odraža v zmanjšani citotoksični sposobnosti ter znižani produkciji INF-γ (Jonasson, 2005).

2.7 VNETJE KOT PROGNOSTIČNI DEJAVNIK PRI OBOLENJIH SRCA

Miksomatozna degeneracija je kronično, počasi napredujoče obolenje, ki praviloma zajema daljšo predklinično fazo. Velik delež psov zato pogine zaradi drugih, nepovezanih vzrokov (Borgarelli in Buchanan, 2012). Pri določenem deležu pacientov bolezen napreduje v KSP, pri čemer sta hitrost napredovanja in čas preživetja odvisna od več dejavnikov, kot so na primer starost (Olsen in sod., 1999; Nemec Svete in sod., 2020), spol (Olsen in sod., 1999), intenzivnost srčnega šuma (Haggstrom in sod., 1995), obseg mitralne regurgitacije (Olsen in sod., 2003) ter velikost levega preddvora (Borgarelli in sod., 2008).

Novejše študije nakazujejo, da imajo lahko tudi vnetni parametri napovedno vrednost pri srčnem popuščanju, kjer so tako pri ljudeh (Matsumo in sod., 2019; Lima in sod., 2022; Zhou in Du, 2025) kot pri psih (Domanjko Petrič in sod., 2019) ugotovili, da ima povišana koncentracija CRP negativno prognostično vrednost.

Pri psih z MDMZ so ugotovili negativno povezavo med WBC in časom preživetja (Brložnik in sod., 2023). Tako pri ljudeh (Cho in sod., 2020; Delcea in sod., 2024; Zhou in Du, 2025) kot tudi pri psih (Jung in sod., 2023, Ku in sod., 2023) je bilo potrjeno, da NLR predstavlja pomemben prognostični dejavnik, kjer povišano razmerje v prid nevtrofilnim granulocitom nakazuje slabši izid bolezni. Prav tako je bilo ugotovljeno, da je MLR negativen prognostični dejavnik psov z MDMZ (Jung in sod., 2023; Ku in sod., 2023).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RETROSPEKTIVNA ŠTUDIJA POVEZAVE IMUNSKIH IN VNETNIH CELIC S PREŽIVETJEM PSOV Z MDMZ

3.1.1 Živali

Retrospektivno analizo smo opravili na podatkih 62 lastniških psov v različnih fazah MDMZ, ki so bili zdravljeni na kardiološkem oddelku Univerzitetne klinike za male živali v Ljubljani med avgustom 2018 in novembrom 2019. Ti psi so bili predhodno vključeni v klinično študijo doktorandke Natalie Druzhaeve, ki je preučevala koncentracije in deleže perifernih imunskih celic (Druzhaeva in sod., 2021). Podatke o statusu psov (živ/poginul) smo pridobili na podlagi kartotečnih podatkov ali telefonskega klica z lastnikom živali.

Pse smo razvrstili v tri skupine: predklinični stadij bolezni (ACVIM B2; 19 psov), stabilno KSP (ACVIM C; 24 psov) in nestabilno KSP (ACVIM C in D; 19 psov). V času pregleda podatkov je bilo 12 psov (63,2 %) v predklinični skupini še živih ter 7 (36,8 %) poginulih. Od slednjih jih je 5 (71,4 %) poginilo ali bilo evtanaziranih zaradi KSP. V skupini psov s stabilnim KSP je bilo 6 psov (25 %) še živih in 18 (75 %) poginulih. Od slednjih jih je 15 (83,3 %) poginilo ali bilo evtanaziranih zaradi KSP. V skupini psov z nestabilnim KSP je bilo v času študije 18 (94,7 %) psov poginulih, od tega jih je 17 (94,4 %) poginilo ali bilo evtanaziranih zaradi KSP. Drugi vzroki smrti ali evtanazije so bile neoplazije (4), piometra (1) in obstrukcija sečnice (1).

Tabela 1: Demografski podatki psov, vključenih v retrospektivno študijo preživetja

Table 1: Demographic data of dogs included in the retrospective survival study

Skupina psov	**Predklinična**	**Stabilno KSP**	**Nestabilno KSP**	**Vsi**
Število psov	19	24	19	62
Spol (ženski/moški)	6/13	9/15	10/9	25/37
Starost (leta)				
Povprečje ± SD	10,0 ± 2,1	11,0 ± 1,9	10,7 ± 1,6	10,4 ± 1,9
Teža (kg)				
Mediana	7,6	7,7	7,6	7,6

IQR	6,0–12,4	5,5–10,9	4,9–11,0	5,1–11,9
Pasma	1 AST, 2 CHI, 3 KCŠ, 1 KŠ, 1 KGP, 2 M, 1 ML, 1 PEK, 2 SHI, 2 TT, 1 YT, 2 WH	1 CHI, 5 KCŠ, 3 KOS, 1 KŠ, 7 M, 1 ML, 1 MNŠ, 1 NO, 2 PEK, 1 TT, 1 YT	1 AST, 2 CHI, 1 COT, 1 JČ, 1 JRT, 6 KCŠ, 3 M, 1 ML, 1 NO, 1 PEK, 1 YT	2 AST, 5 CHI, 1 COT, 1 JČ, 1 JRT, 14 KCŠ, 2 KŠ, 1 KGP, 3 KOS, 12 M, 3 ML, 1 MNŠ, 2 NO, 4 PEK, 2 SHI, 3 TT, 3 YT, 2 WH

AS, ameriški stafford terier; CHI, čivava; COT, coton de tulear; IQR, interkvartilni razmik (25. do 75. percentil); JČ, japonski čin; JRT, jack russel terier; KCŠ, king Charles španjel; KOS, koder srednji; KSP, kongestivno srčno popuščanje; KŠ, angleški koker španjel; KGP, kitajski goli pes; M, mešanec; ML, maltežan; MNŠ, mali nemški špic; NO, nemški ovčar; PEK, pekinčan; SD, standardna deviacija; SHI, shih tzu; TT, tibetanski terier; YT, yorkshirski terier; WH, whippet.

AS, American Stafford terrier; CHI, Chihuahua; COT, Coton de tulear; IQR, interquartile range (25 to 75. percentile); JČ, Japanese chin; JRT, Jack Russell terrier; KCŠ, King Charles spaniel; KOS, Poodle medium; KSP, congestive heart failure; KŠ, English Cocker spaniel; KGP, Chinese crested; M, Mix; ML, Maltese; MNŠ, Pomeranian; NO, German shepherd; PEK, Pekingese; SD, standard deviation; SHI, Shih Tzu; TT, Tibetan terrier; YT, Yorkshire terrier; WH, Whippet.

3.1.2 Podatki ehokardiografskih pregledov

Za namene statistične analize povezave imunskih in vnetnih celic s preživetjem in korelacij med imunskimi celicami ter izbranimi spremenljivkami smo na podlagi arhiviranih ehokardiografskih podatkov uporabili naslednje meritve: premer levega preddvora, normaliziranega na telesno maso (LAN cm/kg^{0,309}), premer levega prekata ob koncu diastole (LVIDd), premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziranega na telesno maso (LVIDdN cm/kg^{0,387}), premer levega prekata ob koncu sistole (LVIDs), premer levega prekata ob koncu sistole, normaliziranega na telesno maso (LVIDsN cm/kg^{0,387}) (Visser in sod., 2019), razmerje med premerom levega preddvora in aorte (LA/Ao), zgodnji mitralni priliv (val E), pozni mitralni priliv (val A) in njuno razmerje (E/A) ter transtrikuspidalni tlačni gradient (TRPG).

Dodatno smo na arhiviranih ehokardiografskih posnetkih izvedli meritve globalne vzdolžne sistolične deformacije (GLS) za oceno sistolične funkcije levega prekata v treh pogledih: apikalni pogled (GLS aplax), štirivotlinski pogled (GLS 4-ch) in dvovotlinski pogled (GLS 2-ch). Ročno smo sledili robu endokarda za vsakega izmed treh pogledov in za izračune uporabili programsko opremo Automated Function Imaging, GE Healthcare (GE Healthcare Technologies Inc., Illinois, ZDA). Z uporabo vsaj dveh pogledov (če vsi trije pogledi niso bili na voljo) smo s pomočjo programa izračunali povprečni GLS (GLS Avg). V izogib variabilnosti med preiskovalci smo vse meritve izvedli z istim operaterjem (A.D.P.).

3.1.3 Podatki krvnih analiz

V času klinične študije doktorandke Natalie Druzhaeve so bile opravljene krvne analize, ki so obsegale rutinske hematološke in biokemijske preiskave, meritve koncentracij NT-proBNP (pmol/L), cTnI (µg/L), CRP (mg/L) ter merjenje deležev in koncentracij limfocitov T ter njihovih podvrst (celice T pomagalke ($CD3^+CD4^+$), citotoksične celice T ($CD3^+CD8^+$), DPT ($CD3^+CD4^+CD8^+$) in DNT ($CD3^+CD4^-CD8^-$) ter limfocite B ($CD45^+CD21^+$) (Druzhaeva in sod., 2021).

3.1.4 Statistične analize

Pri psih z MDMZ smo izvedli Kaplan-Meierjevo analizo preživetja, da bi ugotovili čas preživetja od vstopa v študijo do smrti. Psi, ki so bili v času telefonskega klica še živi, so bili cenzurirani. Verjetnost preživetja smo ocenili z neparametrično metodo Kaplan-Meierjeve preživetvene funkcije, krivulje psov v različnih stadijih bolezni pa smo primerjali z neparametričnim log-rank testom (Klein in Moeschberger, 2003).

V vsaki od treh skupin pacientov (predklinični stadij, stabilno KPS, nestabilno KPS) in v skupini vseh pacientov smo izvedli univariatno Coxovo regresijsko analizo sorazmernega tveganja (Collet, 2003). Razmerje tveganja (HR), večje od 1, pomeni, da je kovariata pozitivno povezana z verjetnostjo dogodka (smrtjo) in posledično negativno povezana s preživetjem. Statistično pomembnost Coxovih modelov smo preverili s testom razmerja verjetnosti (likelihood ratio test). Model smo šteli kot statistično pomemben, če je bil ocenjeni *P* manjši od izbrane ravni pomembnosti. Glede na to, da so vrednosti *P* pri majhnih vzorcih (kot v našem

primeru) običajno višje, smo kot pomembne upoštevali vrednosti $P < 0,1$ znotraj posameznih skupin in $P < 0,05$ za skupino vseh pacientov skupaj.

Za preverjanje veljavnosti Coxovih modelov smo preverili:

(a) linearno povezavo med logoritmom časa preživetja in kovariatami, tako da smo ocenili *P*-vrednosti Coxovih regresijskih modelov ter izračunali Spearmanove korelacijske koeficiente med časom preživetja in posameznimi kovariatami;

(b) izpolnjenost predpostavke sorazmernega tveganja (ang. proportional hazard, PH) za kovariate, tako da smo testirali neodvisnost ($P > 0,05$) med pripadajočimi standardiziranimi Schoenfeldovimi reziduali in časom.

Omeniti velja tudi, da so bile kovariate pred izvedbo Coxove regresijske analize sorazmernega tveganja normalizirane v obliki z-vrednosti (z-score normalizacija), tj. standardizirane tako, da smo od vsake vrednosti odšteli povprečje in rezultat delili s standardnim odklonom, saj so bile njihove srednje vrednosti in razpršenosti zelo različne. Z-normalizacija podatke preoblikuje tako, da imajo povprečje 0 in standardni odklon 1. Ker normalizacija ne vpliva na statistično značilnost (P-vrednosti) napovednih spremenljivk, temveč samo na točkovne ocene (HR) regresijskih koeficientov, in povzroči manjšo standardno napako ocene, temelji naša interpretacija rezultatov Coxovih regresijskih analiz predvsem na vrednostih *P*. Kadar so vrednosti HR ali pripadajočega tveganja smrti podane v odstotkih, se te vedno nanašajo na normalizirane vrednosti, torej na lestvico [-1,1].

Spearmanove korelacijske koeficiente med pomembnimi kovariatami smo izračunali za oceno medsebojnih povezav med spremenljivkami. Jakost ugotovljene korelacije rho smo interpretirali na naslednji način: 0,00–0,10: zanemarljiva; 0,10–0,39: šibka; 0,40–0,69: zmerna; 0,70–0,89: močna; in 0,90–1,00: zelo močna (Schober in sod., 2018).

Vse statistične analize smo izvedli z uporabo programa R, verzija 4.3.2 (R Core Team 2013, Dunaj, Avstrija).

3.2 PROSPEKTIVNA ŠTUDIJA PERIFERNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PRI PSIH Z MDMZ

3.2.1 Živali

Klinična raziskava je potekala med 21.9.2022 in 30.1.2024 na Kliniki za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Med potekom klinične študije smo skupno pregledali 253 psov z MDMZ za morebitno vključitev v raziskavo, od tega 189 psov ni izpolnjevalo vključitvenih kriterijev. Psi s pridruženimi sistemski obolenji, neoplastičnimi obolenji ali vnetnimi stanji, ki bi lahko vplivali na interpretacijo rezultatov, niso bili vključeni v raziskavo, kot tudi ne psi, ki so v zadnjem mesecu prejemali antibiotično ali imunosupresivno terapijo. V študijo smo vključili 64 psov z MDMZ, ki smo jih razdelili v 3 skupine glede na napredovalost bolezni: predklinični stadij (ACVIM B2; 23 psov), psi s stabilnim KSP (ACVIM C; 22 psov) in psi z nestabilnim KSP (ACVIM C in D; 19 psov). Psi v predklinični stopnji so bili zdravljeni s pimobendanom ali pa ob vključitvi niso prejemali terapije. Psi s KSP so prejemali pimobendan, zaviralce angiotenzinske konvertaze ter diuretike ali pa ob vključiti v študijo še niso prejemali terapije. V študijo smo vključili tudi 17 zdravih psov, starejših od 5 let, ki na podlagi kliničnega in laboratorijskega pregleda ter ehokardiografske preiskave niso imeli znakov bolezni srca ali druge bolezni. Med preiskovanimi skupinami (predklinična, stabilno KSP, nestabilno KSP, zdravi) nismo ugotovili značilnih razlik v telesni masi (P = 0,078), vendar pa so med skupinam bile značilne razlike v spolu (P = 0,016, Fisherjev test) in starosti (P < 0,001), pri čemer je v skupini zdravih prevladoval ženski spol, slednja pa je tudi značilno mlajša v primerjavi s skupinami bolnih. Demografski podatki vključenih psov so podani v Tabeli 2.

Pri vseh psih smo opravili natančen klinični pregled, krvne preiskave, ehokardiografijo srca in elektrokardiografijo, pri psih s kliničnimi znaki bolezni (dispneja, kašelj) tudi rentgensko slikanje prsnega koša.

Vsi lastniki so pred vključitvijo v raziskavo podali pisno soglasje o sodelovanju. Vsi postopki so bili v skladu z veljavnimi državnimi predpisi (Zakon o zaščiti živali, Uradni list Republike Slovenije, 43/2007). Študijo je odobrila Komisija za dobrobit živali v poskusne namene Veterinarske fakultete (Št. dovoljenja: 25-01/2023-1).

Tabela 2: Demografski podatki vključenih psov v prospektivno študijo

Table 2: Demographic data of dogs included in the prospective study

Skupina psov	Predklinična	Stabilno KSP	Nestabilno KSP	Zdravi
Število psov	23	22	19	17
Spol (ženski/moški)	9/14	6/16	7/12	13/4
Starost (leta)				
Mediana	10,6	11,4	12,2	6,8
IQR	8,2−12,8	10,3−13,1	9,2−12,7	5,6−7,8
Masa (kg)				
Mediana	10,7	7,3	7,5	6,8
IQR	7,0−12,4	5,6−9,5	6,2−11,6	5,5−7,7
Pasma	1 BIG, 1 BRP, 10 KCŠ, 1 JRT, 1 PP, 5 M, 1 PA, 1 PŠ, 1 TŠ, 1 WH	3 CHI, 1 JAZ, 1 JRT, 3 KCŠ, 3 KOP, 3 M, 1 ML, 1 PP, 2 SHI, 2 TŠ, 1 VIZ, 1 WH	1 BIG, 4 CHI, 1 JČ, 6 KCŠ, 3 M, 1 ML, 1 NKP, 1 PEK, 1 SHI	1 BAS, 2 JRT, 1 KCŠ, 1 KOP, 1 RVD, 3 M, 2 ML, 1 PP, 1 SHE, 1 SHI, 3 TŠ

BAS, basenji; BIG, beagle; BRP, bretonski ptičar; CHI, čivava; JAZ, jazbečar; JČ, japonski čin; JRT, jack russell terier; KCŠ, king Charles španjel; KOP, koder pritlikavi; KSP, kongestivno srčno popuščanje; M, mešanec; ML, maltežan; MP, miniaturni pinč; NKP, nemški kratkodlaki ptičar; IQR, interkvartilni razpon (25. do 75. percentil); PA, papillon; PEK, pekinčan; PŠ, pritlikavi šnavcer; RVD; romanski vodni pes; SHE, šetlandski ovčar; SHI, shih tzu; TŠ, tibetanski španjel; VIZ, vižla; WH, whippet.

BAS, Basenji; BIG, Beagle; BRP, Brittany spaniel; CHI, Chihuahua; JAZ, Dachshund; JČ, Japanese chin; JRT, Jack Russell terrier; KCŠ, King Charles spaniel; KOP, Miniature Poodle; KSP, congestive heart failure; M, mixed breed; ML, Maltese; MP, Miniature pinscher; NKP, German shorthaired pointer; IQR, interquartile range (25th to 75th percentile); PA, Papillon; PEK, Pekingese; PŠ, Miniature schnauzer; RVD, Romanian water dog; SHE, Shetland sheepdog; SHI, Shih-Tzu; TŠ, Tibetan spaniel; VIZ, Vizsla; WH, Whippet.

3.2.2 Ehokardiografija

Pse smo pregledali z ultrazvočnim aparatom GE Vivid E9 (GE Healthcare Technologies Inc., Illinois, ZDA) z uporabo standardnih dvodimenzionalnih presekov ter barvnim in spektralnim Dopplerjem. Za namene statistične analize smo uporabili rezultate naslednjih ehokardiografskih meritev: LAN, LVIDdN, LVIDd, LA/Ao, val E, val A, E/A ter TRPG, pri psih s prisotno insuficienco trikuspidalne zaklopke.

3.2.3 Odvzem in priprava vzorcev krvi

Vsem psom smo na tešče odvzeli 10 mL krvi iz leve ali desne *v. cephalice antebrachii* ali *v. jugularis*. Uporabili smo tri 0,5-mL epruvete z antikoagulantom etilendiaminotetraocetno kislino (EDTA) (BD Microtainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, ZDA) za izvedbo hematoloških preiskav in pretočno citometrijo. Za merjenje koncentracije NT-proBNP smo uporabili 2-mL epruveto z EDTA (Greiner Bio–One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija). Za biokemijske preiskave ter določanje koncentracije CRP, citokinov in kemokinov (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, MCP-1, KC-like) smo uporabili dve 4-mL epruveti z aktivatorjem koagulacije in separacijskim gelom (Greiner Bio–One Vacuette, Kremsmunster, Avstrija).

Hematološke preiskave smo izvedli v diagnostičnem laboratoriju Klinike za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Preostalo kri v dveh 0,5 mL EDTA epruvetah smo shranili na temnem, na sobni temperaturi ter v roku 24 ur izvedli pretočno citometrijo.

Vzorce krvi za pridobitev seruma smo po končanem strjevanju (20 min) centrifugirali 10 minut pri 1300 × g pri 22 °C in opravili biokemijske preiskave. Preostali serum smo razdelili na šest delov (3 x 2 paralelki) ter shranili na –80 °C za merjenje koncentracije CRP, citokinov in kemokinov.

Vzorce krvi za merjenje plazemske koncentracije NT-proBNP smo po odvzemu centrifugirali 15 minut pri 1500 × g pri 4 °C ter jih do analize v dvojniku shranili na –80 °C.

3.2.4 Hematološke in biokemijske preiskave

Celotno krvno sliko in diferencialno belo krvno sliko smo neposredno po odvzemu izvedli s pomočjo avtomatskega laserskega hematološkega analizatorja Advia 120 (SIEMENS, München, Nemčija).

Biokemijske analize smo z izjemo elektrolitov izvedli v roku 1 ure po odvzemu z avtomatskim biokemijskim analizatorjem RX Daytona+ za naslednje parametre: glukoza, sečnina, kreatinin, alkalna fosfataza in alanin–aminotransferaza (RANDOX, Crumlin, Velika Britanija). Elektrolite (natrij, kalij in klorid) smo določali z elektrolitskim analizatorjem Ilyte (IL – Instrumentation Laboratory, Massachusetts, ZDA).

3.2.5 C-reaktivni protein

Koncentracijo CRP smo analizirali na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Za merjenje serumske koncentracije CRP (ng/mL) smo uporabili komercialno dostopni, vrstno specifični (pasji) encimsko imunski test ELISA; VetLine Canine C-reactive Protein (CCRP) ELISA (Gold Standard Diagnostics, Dietzenbach, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca.

3.2.6 Citokini in kemokini

Koncentracije citokinov in kemokinov (IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, KC-like, MCP-1) smo izmerili na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani z uporabo komercialnega multipleksnega imunskega testa na osnovi magnetnih kroglic (MILLIPLEX MAP canine Cytokine/Chemokine Panel Magnetic Bead Kit, Millipore, Darmstadt, Nemčija). Imunske teste smo analizirali z uporabo sistema Luminex MAGPIX, rezultate pa smo interpretirali s programsko opremo xPONENT 4.2.

Dodatno smo na Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani izmerili koncentracijo IL-1β z uporabo komercialno dostopnega vrstno specifičnega ELISA testa (Interleukin-1 beta ELISA Kit, Merck, Darmstadt, Nemčija). Absorbanco smo izmerili pri 450 nm z uporabo čitalca mikrotitrskih plošč Sunrise (Tecan, Männedorf, Švica).

Oba testa smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca.

3.2.7 N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B

Plazemsko koncentracijo NT-proBNP (pmol/L) so izmerili v komercialnem laboratoriju (IDEXX, Leipzig, Nemčija) z ELISA testom (IDEXX BioAnalytics Europe).

3.2.8 Pretočna citometrija

Vzorce za pretočno citometrijo smo v roku 24 ur po odvzemu krvi analizirali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani s pretočnim citometrom FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, Kalifornija, ZDA) in uporabo programske opreme FACSDiva, različica 8.0.1 (BD Biosciences).

3.2.8.1 Protitelesa

Za označevanje smo uporabili specifična mišja in podganja monoklonska protitelesa proti pasjim CD3 (klon CA17.2A12, FITC, kat. št. MA516605), CD4 (klon YKIX302.9, PE-Cyanine7, kat. št. 25-5040-42), CD5 (klon YKIX322.3, PE, kat. št. 12-5050-42), CD8 (klon YCATE55.9, APC, kat. št. 17-5080-42), CD11b (klon M1/70, PE, kat. št. 12-0112-82), CD14 (klon TüK4, FITC, Kat. št. MA182074), CD21 (klon LT21, Alexa Fluor 647, kat. št. MA518131), CD25 (klon P4A10, PE, kat. št. 12-0250-42), CD45 (klon YKIX716.13, eFluor 450, kat. št. 48-5450-42), MHC-II (Klon YKIX334.2, APC, kat. št. 17-5909-42), FoxP3 (klon FJK-16s, APC, kat. št. 17-5773-82). Vsa monoklonska protitelesa smo kupili pri podjetju eBioscience San Diego, Kalifornija, ZDA.

3.2.8.2 Preiskovane imunske celice

Z metodo pretočne citometrije smo določali deleže skupnih monocitov ($CD11b^+$) in njihovih podtipov ($CD14^+MHC\ II^-$, $CD14^+MHC\ II^+$, $CD14^-MHC\ II^+$), populacije celic NK, ki smo jo označili na tri različne načine (NK1, $CD21^-CD5^-CD3^-$; NK2, $CD21^-CD5^{dim}CD3^-$; NK3, $CD21^-CD5^{dim}CD3^+$), delež skupnih limfocitov T ($CD3^+$) in njihove aktivirane oblike z uporabo označevalca aktivacije CD25 ($CD3^+CD25^+$) in njihove podtipe (celice T pomagalke, $CD3^+CD4^+$; aktivirane celice T pomagalke, $CD3^+CD4^+CD25^+$; citotoksične celice T, $CD3^+CD8^+$; aktivirane citotoksične celice T, $CD3^+CD8^+CD25^+$; regulacijske celice T, $CD4^+FoxP3^+CD25^+$; DNT, $CD4^-CD8^-$; DPT, $CD4^+CD8^+$) in delež limfocitov B ($CD3^-CD21^+$).

3.2.8.3 Postopek označevanja

<u>Zunajcelično barvanje</u>

Pripravili smo štiri različne epruvete s 100 µL polne krvi in vzorce obarvali z monoklonskimi protitelesi za površinske označevalce ter jih inkubirali 30 minut pri 2–8 °C v temi. Vzorec krvi za limfocite T in njihove podtipe smo obarvali s 5 µL CD45 eFlour 450, 5 µL CD4 PE-Cyanine7, 5 µL CD25 PE, 5 µL CD8 APC in 10 µL CD3 FITC. Regulacijske celice T smo obarvali v ločeni epruveti z uporabo 5 µL CD45 eFlour 450, 5 µL CD4 PE-Cyanine7, 5 µL CD25 PE in 10 µL CD3 FITC. Vzorec za limfocite B in celice NK smo obarvali v isti epruveti s 5 µL CD45 eFlour 450, 10 µL CD3 FITC, 5 µL CD5 PE in 4 µL CD21 Alexa Flour 647. V epruveto za monocite in njihove podtipe smo dodali 5 µL CD45 eFlour 450 , 5 µL MHC II APC, 10 µL CD14 FITC in 0,63 µL CD11b PE. Po končani inkubaciji s protitelesi smo eritrocite lizirali z 1 % formaldehidom in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi v temi. Vzorce smo centrifugirali pri 480 × g 5 minut pri sobni temperaturi in supernatant zavrgli ter nato epruvete sprali z 1 % govejim serumskim albuminom v fiziološki raztopini s fosfatnim pufrom (1 % BSA v PBS), resuspendirali v 1 % BSA v PBS in analizirali s pretočnim citometrom.

Znotrajcelično barvanje

Pri epruveti za regulacijske celice T smo nadaljevali s postopkom po protokolu znotrajceličnega barvanja z uporabo seta FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer (eBioscience, kat. št. 00-5523-00) po navodilih proizvajalca. Celice smo fiksirali s fiksacijskim pufrom in inkubirali v temi pri 2–8 °C za 30 minut. Po fiksaciji smo celice dvakrat sprali z 1X permeabilizacijskim pufrom, nato dodali konjugirano primarno protitelo (FoxP3) in vzorce inkubirali 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo celice še dvakrat sprali z 1X permeabilizacijskim pufrom, resuspendirali v 1 % BSA v PBS in analizirali s pretočnim citometrom.

3.2.9 Statistična analiza

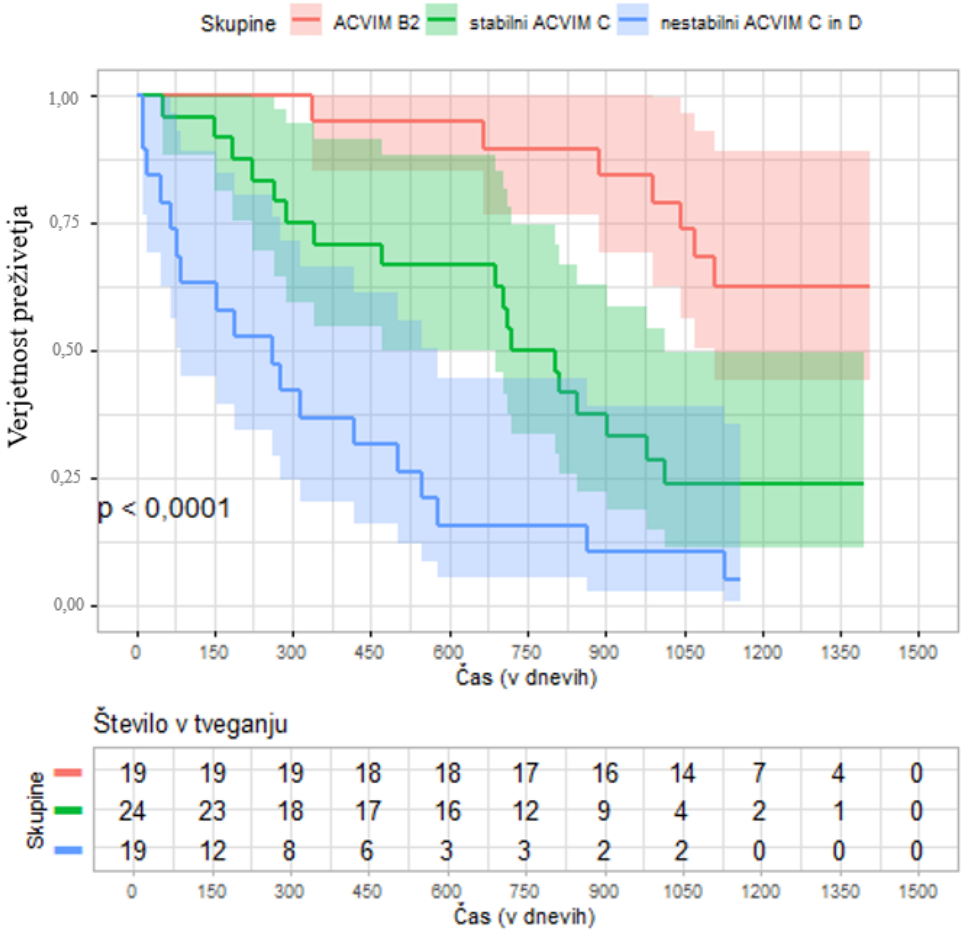
Podatke smo analizirali z uporabo programske opreme Jamovi (The Jamovi Project 2024, Avstralija) in programskega jezika R, različica 4.3.3 (R core Team 2024, Dunaj, Avstrija). Normalnost porazdelitve smo v kombinaciji s Q-Q grafi ocenili s pomočjo Shapiro-Wilkovega testa. Na podlagi ugotovitev smo uporabili parametrične ali neparametrične teste. Glede na pretežno nenormalno porazdeljenost spremenljivk in zaradi jasnosti predstavitve je razpršenost podatkov na vseh grafih prikazana kot mediana in interkvartilni razpon (IQR). Poleg tega smo

za levo cenzurirane podatke (citokine) izračunali ocene opisne statistike z uporabo regresijske analize vrstnega reda (ang. ranked order statistics, ROS) s pomočjo funkcije cenboxplot paketa NADA (Lee, 2020). Posledično kvantilni grafikoni citokinov pod označeno mejo zaznavnosti prikazujejo ocene vrednosti, ki so bile pridobljene z ROS metodo. Meja zaznavnosti je na grafih označena rdeče. V skladu s priporočili iz literature (Helsel, 2012) smo pri inferenčni statistični analizi vrednosti pod mejo zaznavnosti nadomestili s spodnjo mejo detekcije in izvedli neparametrične teste. Prvotno smo za oceno medskupinskih razlik uporabili enosmerno analizo variance (ang. analysis of variance, ANOVA) ali Kruskal-Wallisov test. Glede na število primerjav smo z namenom zmanjšanja tveganja lažnih odkritij dobljene p-vrednosti popravili z Benjamini-Hochbergovo metodo. Na podlagi popravljenih p-vrednosti smo nato določili potrebo po post-hoc testiranju. Nato smo s Kruskal-Wallisovim in Fischerjevim natančnim testom preverili medskupinske razlike pri morebitnih motečih sovplivajočih dejavnikih, kot so spol, telesna masa in starost. Zaradi potencialnega motečega sovplivanja spola in starosti smo za oceno medskupinskih razlik uporabili splošni linearni in cenzuriran regresijski model, kjer smo lahko upoštevali vpliv teh dejavnikov. Kasnejšo parno primerjavo smo izvedli z uporabo prilagojenih povprečij (ang. Estimated marginal means) in Tukey korekcijo.

4 REZULTATI

4.1 POVEZAVA IMUNSKIH,VNETNIH IN EHOKARDIOGRAFSKIH PARAMETROV S PREŽIVETJEM PSOV Z MDMZ

Kaplan-Meierjeve krivulje preživetja za posamezne skupine psov so prikazane na Sliki 1. Vsak dogodek (smrt) je predstavljen z navpičnim padcem krivulje. Izrisane krivulje preživetja skupaj z izračunano vrednostjo *P* testa log-rank, ki je nižja od 0,0001, potrjujejo pričakovani rezultat, in sicer, da se tri skupine psov značilno razlikujejo glede verjetnosti smrti v dani časovni točki.



Slika 1: Kaplan-Meierjeva krivulja preživetja v treh stopnjah MDMZ (z vrednostjo P testa log-rank in tabelo tveganja).

Kaplan-Meierjeve krivulje prikazujejo, da je verjetnost preživetja 750 dni, kar je približno 25 mesecev, 89,5 % za predklinično skupino (17 od 19 pacientov), le 50,0 % za skupino s stabilnim KSP (12 od 24 pacientov) in le 15,8% za skupino z nestabilnim KSP (3 od 19 pacientov).

Figure 1: Kaplan-Meier survival curve in three MMVD stages (with log-rank test P-value and risk table).

Kaplan-Meier curves show that the probability of survival of 750 days, i.e. approximately 25 months, is 89.5% for the preclinical group (17 out of 19 patients), only 50.0% for the stable KSP group (12 out of 24 patients) and only 15.8% for the unstable KSP group (3 out of 19 patients).

4.1.1 Povezava celic diferencialne bele krvne slike s preživetjem psov z MDMZ

Med WBC, relativnim in absolutnim številom nevtrofilnih granulocitov, monocitov ter skupnih limfocitov in preživetjem nismo ugotovili značilne povezave v preiskovanih skupinah psov z MDMZ (Tabela 3–6).

4.1.2 Povezava imunskih celic s preživetjem psov z MDMZ

Koncentracija limfocitov T je bila značilno negativno povezana s preživetjem v skupini z nestabilnim KSP (Tabela 5), medtem ko v drugih skupinah ni bilo značilne povezave. Koncentracija citotoksičnih celic T je bila značilno negativno povezana s preživetjem, pri čemer je višja koncentracija citotoksičnih celic T povečala tveganje za smrt za 56,2 % v skupini z nestabilnim KSP in za 50,2 % v združeni skupini vseh psov z MDMZ (Tabela 6). Nasprotno pa je bil delež celic T pomagalk značilno pozitivno povezan s časom preživetja tako v skupini z nestabilnim KSP kot v združeni skupini vseh MDMZ psov. V skupini z nestabilnim KSP je višji delež celic T pomagalk zmanjšal tveganje za smrt za 39,6 %. V skupini vseh psov pa je višji delež celic T pomagalk zmanjšal tveganje za smrt za 26,7 %. Delež celic DPT je bil značilno negativno povezan s preživetjem v predklinični skupini (Tabela 3), pri čemer je višji delež celic DPT povečal tveganje za smrt za 132,8 %. Poleg tega sta bili koncentraciji celic DPT in DNT značilno negativno povezani s preživetjem v skupini z nestabilnim KSP, pri čemer je višja koncentracija celic DPT povečala tveganje smrti za 75,1 % in višja koncentracija celic DNT za 61,3 %.

4.1.3 Povezava krvnih označevalcev s preživetjem psov z MDMZ

Ugotovili smo značilno povezavo med koncentracijo cTnI in povečanim tveganjem za smrt, pri čemer je višja koncentracija cTnI znatno povečala tveganje za smrt v skupini s stabilnim KSP (Tabela 4), skupini z nestabilnim KSP (Tabela 5) kot tudi v skupini vseh psov z MDMZ (Tabela 6). Koncentracija NT-proBNP je bila značilno negativno povezana s preživetjem le v skupini s

stabilnim KSP (Tabela 4). Koncentracija CRP je bila značilno negativno povezana s preživetjem v združeni skupini vseh psov z MDMZ (Tabela 6).

4.1.4 Povezava ehokardiografskih parametrov s preživetjem psov z MDMZ

Ehokardiografski parametri, kot so LA/Ao, LVIDd, LVIDdN, val E in E/A, so bili značilno negativno povezani s preživetjem v združeni skupini vseh psov z MDMZ (Tabela 6). Pri tem sta bila E/A in LVIDd prav tako značilno negativno povezana s preživetjem v skupini z nestabilnim KSP (Tabela 5).

Ugotovili smo tudi, da so bili GLS aplax, GLS 4-ch ter GLS Avg značilno pozitivno povezani s preživetjem v predklinični skupini (Tabela 3). Podobno so bili v skupini stabilnega KSP GLS aplax, GLS 2-ch in GLS Avg pozitivno povezani s preživetjem (Tabela 4). Poleg tega so bili v združeni skupini vseh psov z MDMZ, GLS aplax in GLS Avg pozitivno povezane s preživetjem (Tabela 6). Nasprotno pa sta bila v skupini nestabilnega KSP GLS 2-ch in GLS Avg značilno negativno povezana s preživetjem (Tabela 5).

Tabela 3: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, predklinična skupina

Table 3: Results of univariate Cox regression analysis, preclinical group

Spremenljivka	N	Spearmanova statistika ρ	*P* vrednost Spearmanove ρ statistike	*P* vrednost PH - predpostavke	*P* vrednost testa razmerja verjetnosti	Cox HR exp (koef)	Cox HR 95% CI	*P* vrednost Coxove regresije
Starost (meseci)*	19	-0,469	0,043	0,61	0,002	3,849	1,539, 9,627	**0,004**
BCS	18	-0,019	0,941	0,53	0,9	0,973	0,492, 1,923	0,936
Frekvenca srčnega utripa	19	0,064	0,796	0,25	0,5	0,789	0,398, 1,564	0,497
Intenzivnost šuma	19	-0,193	0,430	0,07	0,4	1,396	0,646, 3,015	0,396
Spol	19	0,165	0,499	0,12	0,6	1,212	0,599, 2,453	0,593
Terapija	19	0,231	0,342	0,23	0,6	0,821	0,382, 1,764	0,612
Masa (kg)	19	0,206	0,397	0,59	0,8	0,898	0,426, 1,893	0,777
LA/Ao	19	-0,013	0,957	0,46	0,6	0,834	0,413, 1,684	0,613
LVIDd	19	-0,068	0,783	0,51	0,9	0,952	0,426, 2,129	0,905
LVIDdN	19	-0,165	0,498	0,56	0,8	0,925	0,428, 1,998	0,843
A (m/s)	19	-0,002	0,994	0,87	0,6	0,829	0,382, 1,799	0,636

E (m/s)$^{+}$	19	-0,396	0,093	0,76	0,3	1,486	0,709. 3,114	0,295
E/A^{+}	19	-0,442	0,058	0,25	0,1	1,713	0,878, 3,342	0,114
TRPG (mmHg)	14	-0,359	0,208	0,99	0,3	1,457	0,731, 2,905	0,285
CRP (mg/L)	19	0,026	0,920	0,07	0,8	1,087	0,481, 2,454	0,841
cTnI (ug/L)	19	-0.011	0,966	0,59	0,2	1,500	0,789, 2,851	0,216
NT-proBNP (pmol/L)	19	-0,302	0,209	0,88	0,2	1,665	0,886, 3,129	0,113
WBC	19	0,314	0,190	0,14	0,2	0,549	0,231, 1,305	0,174
Nevtrofilni granulociti (%)	19	0,357	0,134	0,92	0,6	0,840	0,434, 1,629	0,606
Nevtrofilni granulociti (×10^{9}/L)$^{+}$	19	0,402	0,089	0,17	0,1	0,496	0,180, 1,362	0,173
Monociti (%)	19	-0,101	0,681	0,23	0,8	1,099	0,543, 2,224	0,793
Monociti (×10^{9}/L)	19	0,149	0,541	0,10	0,7	0,836	0,365, 1,915	0,671
Limfociti (%)	19	-0,349	0,143	0,51	0,2	1,591	0,740, 3,420	0,234
Limfociti (×10^{9}/L)	19	-0,086	0,726	0,73	1	0,999	0,473, 2,111	0,998
NLR	19	0,351	0,141	0,78	0,2	0,561	0,230, 1,368	0,204
CD3^{+} (%)	19	0,161	0,511	0,75	0,7	1,148	0,520, 2,534	0,733
CD3^{+} (×10^{9}/L)	19	0.014	0,957	0,63	1	1,004	0,493, 2,045	0,992
CD3^{+}CD4^{+} (%)	19	-0,207	0,394	0,08	0,7	1,172	0,471, 2,917	0,734
CD3^{+}CD4^{+} (×10^{9}/L)	19	-0,105	0,668	0,27	0,7	1,148	0,564, 2,338	0,703
CD3^{+}CD8^{+} (%)	19	0,175	0,471	0,05	0,9	1,065	0,474, 2,390	0,879
CD3^{+}CD8^{+} (×10^{9}/L)	19	0,174	0,475	0,35	0,8	0,918	0,436, 1,931	0,822
CD4/CD8	19	-0,188	0,440	0,06	0,2	1,922	0,774, 4,774	0,159
DPT (%)*	19	-0,457	0,049	0,85	0,04	2,328	0,996, 5,444	**0,051**
DPT (×10^{9}/L)	19	-0,361	0,129	0,59	0,4	1,339	0,715, 2,507	0,362
DNT(%)	19	0,276	0,252	0,50	0,2	0,523	0,193, 1,416	0,202
DNT (×10^{9}/L)	19	0,142	0,560	0,45	0,5	0,766	0,324, 1,813	0,545
Limfociti B (%)$^{+}$	19	-0,404	0,086	0,84	0,4	1,352	0,749, 2,439	0,317
Limfociti B (×10^{9}/L)	19	-0,275	0,253	0,95	0,3	1,445	0,739, 2,826	0,282
GLS aplax (%)*	19	0,414	0,078	0,06	0,03	0,444	0,213, 0,928	**0,031**

GLS 4-ch (%)*	19	0,737	0,000	0,55	0,004	0,367	0,184, 0,734	**0,005**
GLS 2-ch (%)	19	0,219	0,369	0,11	0,4	0,734	0,369, 0,462	0,379
GLS Avg (%)*	19	0,553	0,016	0,82	0,004	0,216	0,061, 0,768	**0,018**

*Spremenljivke s *P* vrednostjo Coxove regresije < 0,1 in *P* vrednost PH – predpostavke > 0,05 so mišljene kot značilne v Coxovi analizi.

$^{+}$ Spremenljivke s *P* vrednostjo Spearmanove ρ statistike < 0,1 bi lahko bile monotono povezane z dolžino preživetja.

A, zgodnji mitralni priliv; BCS, ocena telesne kondicije; $CD3^{+}$, Limfociti T; $CD3^{+}CD4^{+}$, celice T pomagalke; $CD3^{+}CD8^{+}$, citotoksične celice T; CD4/CD8, razmerje med celicami T pomagalkami in citotoksičnimi celicami T; CI, interval zaupanja; cTnI, srčni troponin I; CRP, C-reaktivni protein; E, zgodnji mitralni priliv; E/A, razmerje med zgodnjim in poznim mitralnim valom; DNT, dvojno negativne T celice T; DPT, dvojno pozitivne T celice; GLS aplax, globalna apikalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS Avg, povprečna globalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS 2-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v dvovotlinskem pogledu; GLS 4-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v štirivotlinskem pogledu; HR, razmerje tveganja; LA/Ao, razmerje med premerom levega preddvora in aorto; LVIDd, premer levega prekata ob koncu diastole; LVIDdN, premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); N, število psov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; NT-proBNP, N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B; PH, sorazmerno tveganje; TRPG, transtrikuspidalni tlačni gradient; WBC, koncentracija levkocitov.

* Covariate with Cox P value < 0.1 and PH-assumption P value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

+ Covariates with Spearman's ρ statistic P value < 0.1, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

A, late transmitral flow; BCS, body condition score; $CD3^{+}$, T lymphocytes; $CD3^{+}CD4^{+}$, T helper cells; $CD3^{+}CD8^{+}$, cytotoxic T cells; CD4/CD8, T helper cell to cytotoxic T cell ratio; CI, confidence interval; cTnI, cardiac troponin I; CRP, C-reactive protein; E, early transmitral flow; E/A, early to late mitral flow ratio; DNT, double negative T cells; DPT, double positive T cells; GLS aplax, global longitudinal strain in apical long axis view; GLS Avg, average global longitudinal strain; GLS 2-ch, global longitudinal strain in two chamber view; GLS 4-ch, global longitudinal strain in four chamber view; HR, hazard ratio; LA/Ao, left atrial to aortic ratio; LVIDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVIDdN, left ventricular end-diastolic diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,387}$); N, number of dogs; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; PH, proportional hazard; TRPG, transtricuspid pressure gradient; WBC, white blood cell count.

Tabela 4: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, skupina stabilnega KSP

Table 4: Results of univariate Cox regression analysis, stable KSP group

Spremenljivka	N	Spearmanova statistika ρ	*P* vrednost Spearmanove ρ statistike	*P* vrednost PH - predpostavke	*P* vrednost testa razmerja verjetnosti	Cox HR exp (koef)	Cox HR 95% CI	*P* vrednost Coxove regresije
Starost (meseci)˙	24	-0,440	0,032	0,04	0,2	1,438	0,847, 2,440	0,178
BCS*	20	0,346	0,135	0,83	0,07	0,588	0,327, 1,057	**0,076**
Frekvenca srčnega utripa	24	-0,369	0,076	0,50	0,05	1,705	1,003, 2,897	0,049
Intenzivnost šuma	23	0,071	0,749	0,30	0,5	0,825	0,501, 1,359	0,450
Spol	24	-0,536	0,007	0,04	0,02	1,796	1,121, 2,878	0,015
Terapija	23	-0,207	0,344	0,63	0,1	1,559	0,843, 2,882	0,157
Masa (kg)	24	0,030	0,889	0,67	0,8	1,063	0,667, 1,694	0,798
LA/Ao	23	-0,270	0,212	0,85	0,2	1,478	0,777, 2,811	0,234
LVIDd	23	0,021	0,925	0,26	0,8	1,066	0,592, 1,921	0,832
LVIDdN	23	-0,077	0,726	0,11	0,6	1,172	0,595, 2,309	0,646
A (m/s)	22	0,214	0,338	0,04	0,7	0,892	0,534, 1,490	0,663
E (m/s)	23	0,242	0,267	0,13	0,3	0,756	0,440, 1,311	0,323
E/A	22	-0,022	0,924	0,34	0,5	0,786	0,385, 1,606	0,510
TRPG (mmHg)	21	-0,063	0,786	0,47	0,7	1,120	0,626, 2,003	0,704
CRP (mg/L)	24	-0,220	0,300	0,45	0,4	0,832	0,530, 1,306	0,424
cTnI (ug/L)*	24	-0,278	0,187	0,95	0,1	1,592	0,979, 2,588	**0,061**
NT-proBNP (pmol/L)*	24	-0,253	0,232	0,28	0,04	1,887	1,067, 3,337	**0,029**
WBC	24	0,296	0,168	0,30	0,4	0,816	0,531, 1,253	0,352
Nevtrofilni granulociti (%)	24	0,094	0,661	0,58	0,4	0,828	0,524, 1,308	0,418
Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9$/L)	24	0,270	0,201	0,46	0,3	0,793	0,516, 1,219	0,291
Monociti (%)	24	-0,146	0,495	0,64	0,7	1,097	0,700, 1,719	0,687
Monociti ($\times 10^9$/L)	24	0,070	0,746	0,86	0,7	0,909	0,564, 1,466	0,696
Limfociti (%)	24	-0,140	0,513	0,64	0,3	1,306	0,799, 2,134	0,287

Limfociti (×10⁹/L)	24	-0,112	0,601	0,54	0,8	1,069	0,712, 1,605	0,748
NLR	24	0,126	0,556	0,73	0,4	0,807	0,496, 1,313	0,387
$CD3^+$ (%)	24	-0,164	0,441	0,99	0,4	1,228	0,780, 1,933	0,376
$CD3^+$ (×10⁹/L)	24	-0,309	0,142	0,68	0,2	1,459	0,871, 2,444	0,151
$CD3^+CD4^+$ (%)	24	0,117	0,586	0,89	0,5	0,845	0,520, 1,372	0,495
$CD3^+CD4^+$ (×10⁹/L)	24	-0,188	0,378	0,96	0,4	1,280	0,762, 2,147	0,351
$CD3^+CD8^+$ (%)	24	-0,110	0,609	0,65	0,7	1,108	0,712, 1,725	0,650
CD3+CD8+ (×10⁹/L)	24	-0,145	0,497	0,32	0,3	1,289	0,812, 2,048	0,282
CD4/CD8	24	0,103	0,632	0,52	0,9	0,949	0,523, 1,720	0,863
DPT (%)	24	0,011	0,961	0,43	1,0	1,001	0,589, 1,702	0,996
DPT (×10⁹/L)	24	-0,189	0,376	0,44	0,2	1,481	0,826, 2,654	0,188
DNT (%)	24	-0,130	0,546	0,72	0,9	1,039	0,679, 1,588	0,861
DNT $(×10^9/L)^+$	24	-0,375	0,072	0,84	0,3	1,257	0,829, 1,906	0,281
Limfociti B (%)	24	-0,146	0,496	0,08	0,7	1,112	0,684, 1,806	0,669
Limfociti B (×10⁹/L)	24	-0,106	0,621	0,94	0,9	1,014	0,685, 1,500	0,946
GLS aplax (%)*	15	0,307	0,265	0,71	0,06	0,457	0,195, 1,069	**0,071**
GLS 4-ch (%)	16	0,229	0,391	0,86	0,5	0,756	0,363, 1,575	0,455
GLS 2-ch (%)*	15	0,511	0,054	0,93	0,05	0,480	0,221, 1,041	**0,063**
GLS Avg (%)*	16	0,341	0,196	0,60	0,04	0,391	0,151, 1,013	**0,053**

*Spremenljivke s *P* vrednostjo Coxove regresije < 0,1 in *P* vrednost PH – predpostavke > 0,05 so mišljene kot značilne v Coxovi analizi.

$^+$ Spremenljivke s *P* vrednostjo Spearmanove ρ statistike < 0,1 bi lahko bile monotono povezane z dolžino preživetja.

A, zgodnji mitralni preliv; BCS, ocena telesne kondicije; $CD3^+$, Limfociti T; $CD3^+CD4^+$, celice T pomagalke; $CD3^+CD8^+$, citotoksične celice T; CD4/CD8, razmerje med celicami T pomagalkami in citotoksičnimi celicami T; CI, interval zaupanja; cTnI, srčni troponin I; CRP, C-reaktivni protein; E, zgodnji mitralni priliv; E/A, razmerje med zgodnjim in poznim mitralnim valom; DNT, dvojno negativne T celice T; DPT, dvojno pozitivne T celice; GLS aplax, globalna apikalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS Avg, povprečna globalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS 2-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v dvovotlinskem pogledu; GLS 4-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v štirivotlinskem pogledu; HR, razmerje tveganja; KSP, kongestivno srčno popuščanje; LA/Ao, razmerje med premerom levega preddvora in aorto; LVIDd, premer levega prekata ob koncu diastole; LVIDdN, premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); N, število psov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; NT-proBNP, N–terminalni

fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B; PH, sorazmerno tveganje; TRPG, transtrikuspidalni tlačni gradient; WBC, koncentracija levkocitov.

* Covariate with Cox P value < 0.1 and PH-assumption P value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

+ Covariates with Spearman's ρ statistic P value < 0.1, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

A, late transmitral flow; BCS, body condition score; $CD3^+$, T lymphocytes; $CD3^+CD4^+$, T helper cells; $CD3^+CD8^+$, cytotoxic T cells; CD4/CD8, T helper cell to cytotoxic T cell ratio; CI, confidence interval; CHF, congestive heart failure; cTnI, cardiac troponin I; CRP, C-reactive protein; E, early transmitral flow; E/A, early to late mitral flow ratio; DNT, double negative T cells; DPT, double positive T cells; GLS aplax, global longitudinal strain in apical long axis view; GLS Avg, average global longitudinal strain; GLS 2-ch, global longitudinal strain in two chamber view; GLS 4-ch, global longitudinal strain in four chamber view; HR, hazard ratio; KSP, congestive heart failure; LA/Ao, left atrial to aortic ratio; LVIDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVIDdN, left ventricular end-diastolic diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,387}$); N, number of dogs; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; PH, proportional hazard; TRPG, transtricuspid pressure gradient; WBC, white blood cell count.

Tabela 5: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, skupina nestabilnega KSP

Table 5: Results of univariate Cox regression analysis, unstable KSP group

Spremenljivka	N	Spearmanova statistika ρ	*P* vrednost Spearmanove ρ statistike	*P* vrednost PH - predpostavke	*P* vrednost testa razmerja verjetnosti	Cox HR exp (koef)	Cox HR 95% CI	*P* vrednost Coxove regresije
Starost (meseci)+	19	-0,429	0,067	0,016	0,2	1,488	0,807, 2,743	0,203
BCS+	16	0,539	0,031	0,047	0,1	0,627	0,355, 1,106	0,107
Frekvenca srčnega utripa	19	-0,210	0,388	0,37	0,5	1,215	0,724, 2,038	0,462
Intenzivnost šuma	19	-0,326	0,173	0,71	0,1	1,572	0,863, 2,862	0,139
Spol	19	0,000	1,000	0,74	0,8	0,955	0,593, 1,537	0,850
Terapija+	19	-0,407	0,084	0,18	0,2	1,303	0,829, 2,047	0,251
Masa (kg)*	19	0,131	0,594	0,29	0,1	1,758	0,938, 3,294	0,079
LA/Ao	19	-0,345	0,148	0,77	0,1	1,461	0,927, 2,302	0,103
LVIDd*	18	-0,072	0,775	0,10	0,05	1,939	0,972, 3,867	**0,060**

LVIDdN	18	-0,240	0,338	0,35	0,1	1,651	0,885, 3,082	0,115
A (m/s)	16	0,354	0,179	0,15	0,1	0,542	0,259, 1,133	0,103
E (m/s)	18	0,214	0,393	0.01	0,7	1,090	0,662, 1,796	0,734
E/A*	16	-0,288	0,278	0,86	0,02	2,593	1,143, 5,881	**0,023**
TRPG (mmHg)	17	0,218	0,400	0,20	0,5	0,834	0,500, 1,391	0,487
CRP (mg/L)	19	-0,335	0,160	0,04	0,06	1,775	1,045, 3,013	0,034
cTnI (ug/L)*	19	-0,533	0,019	0,14	0,01	2,108	1,227, 3,620	**0,007**
NT-proBNP (pmol/L)	19	-0,236	0,331	0,10	0,1	1,465	0,895, 2,398	0,129
WBC	19	-0,010	0,969	0,52	0,8	1,071	0,602, 1,905	0,816
Nevtrofilni granulociti (%)	19	0,148	0,545	0,76	0,5	0,848	0,500, 1,437	0,540
Nevtrofilni granulociti ($\times 10^9$/L)	19	0,036	0,884	0,44	0,9	1,043	0,574, 1,896	0,891
Monociti (%)	19	-0,253	0,297	0,01	0,8	1,050	0,662, 1,666	0,835
Monociti ($\times 10^9$/L)	19	-0,198	0,416	0,05	0,7	1,105	0,634, 1,927	0,725
Limfociti (%)	19	-0,157	0,521	0,69	0,5	1,230	0,717, 2,108	0,453
Limfociti ($\times 10^9$/L)	19	-0,102	0,678	0,40	0,5	1,175	0,730, 1,891	0,508
NLR	19	0,136	0,579	0,38	1,0	0,987	0,528, 1,845	0,968
$CD3^+$ $(\%)^+$	19	-0,641	0,003	0,004	0,1	1,688	0,865, 3,294	0,125
$CD3^+$ ($\times 10^9$/L)*	19	-0,480	0,038	0,41	0,1	1,613	0,936, 2,779	**0,085**
$CD3^+CD4^+$ (%)*	19	0,448	0,054	0,70	0,05	0,604	0,363, 1,006	**0,053**
$CD3^+CD4^+$ ($\times 10^9$/L)	19	-0,264	0,275	0,46	0,8	0,939	0,601, 1,469	0,784
$CD3^+CD8^+$ (%)	19	-0,365	0,124	0,79	0,2	1,435	0,875, 2,353	0,152
$CD3^+CD8^+$ ($\times 10^9$/L)*	19	-0,509	0,026	0,76	0,1	1,562	1,003, 2,433	**0,048**

CD4/CD8 $^{+}$	19	0,413	0,079	0,68	0,1	0,638	0,362, 1,126	0,121
DPT (%)	19	0,017	0,944	0,32	0,7	1,080	0,699, 1,670	0,729
DPT (×10⁹/L) *	19	-0,351	0,141	0,94	0,05	1,751	1,021, 3,003	**0,042**
DNT (%)	19	-0,068	0,783	0,77	0,6	1,223	0,630, 2,371	0,552
DNT (×10⁹/L) *	19	-0,389	0,100	0,98	0,1	1,613	0,918, 2,834	0,096
Limfociti B (%)$^{+}$	19	0,447	0,055	0,01	0,3	0,738	0,436, 1,249	0,257
Limfociti B (×10⁹/L)	19	0,384	0,105	0,003	0,6	0,874	0,503, 1,520	0,634
GLS aplax (%)	14	0,218	0,454	0,19	0,7	0,886	0,486, 1,617	0,694
GLS 4-ch (%)	14	-0,301	0,295	0,15	0,2	1,588	0,841, 3,001	0,154
GLS 2-ch (%)*	14	-0,560	0,040	0,70	0,03	2,465	1,000, 6,076	**0,050**
GLS Avg (%)*	14	-0,402	0,155	0,13	0,06	2,237	0,861, 5,815	**0,098**

*Spremenljivke s *P* vrednostjo Coxove regresije < 0,1 in *P* vrednost PH – predpostavke > 0,05 so mišljene kot značilne v Coxovi analizi.

$^{+}$ Spremenljivke s *P* vrednostjo Spearmanove ρ statistike < 0,1 bi lahko bile monotono povezane z dolžino preživetja.

A, zgodnji mitralni preliv; BCS, ocena telesne kondicije; $CD3^{+}$, Limfociti T; $CD3^{+}CD4^{+}$, celice T pomagalke; $CD3^{+}CD8^{+}$, citotoksične celice T; CD4/CD8, razmerje med celicami T pomagalkami in citotoksičnimi celicami T; CI, interval zaupanja; cTnI, srčni troponin I; CRP, C-reaktivni protein; E, zgodnji mitralni priliv; E/A, razmerje med zgodnjim in poznim mitralnim valom; DNT, dvojno negativne T celice T; DPT, dvojno pozitivne T celice; GLS aplax, globalna apikalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS Avg, povprečna globalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS 2-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v dvovotlinskem pogledu; GLS 4-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v štirivotlinskem pogledu; HR, razmerje tveganja; KSP, kongestivno srčno popuščanje; LA/Ao, razmerje med premerom levega preddvora in aorto; LVIDd, premer levega prekata ob koncu diastole; LVIDdN, premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); N, število psov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; NT-proBNP, N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B; PH, sorazmerno tveganje; TRPG, transtrikuspidalni tlačni gradient; WBC, koncentracija levkocitov.

* Covariate with Cox P value < 0.1 and PH-assumption P value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

+ Covariates with Spearman's ρ statistic P value < 0.1, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

A, late transmitral flow; BCS, body condition score; $CD3^+$, T lymphocytes; $CD3^+CD4^+$, T helper cells; $CD3^+CD8^+$, cytotoxic T cells; CD4/CD8, T helper cell to cytotoxic T cell ratio; CI, confidence interval; cTnI, cardiac troponin I; CRP, C-reactive protein; E, early transmitral flow; E/A, early to late mitral flow ratio; DNT, double negative T cells; DPT, double positive T cells; GLS aplax, global longitudinal strain in apical long axis view; GLS Avg, average global longitudinal strain; GLS 2-ch, global longitudinal strain in two chamber view; GLS 4-ch, global longitudinal strain in four chamber view; HR, hazard ratio; KSP, congestive heart failure; LA/Ao, left atrial to aortic ratio; LVIDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVIDdN, left ventricular end-diastolic diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,387}$); N, number of dogs; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; PH, proportional hazard; TRPG, transtricuspid pressure gradient; WBC, white blood cell count.

Tabela 6: Rezultati univariatne Coxove regresijske analize, združena skupina psov z MDMZ

Table 6: Results of univariate Cox regression analysis, combined group of dogs with MMVD

Spremenljivka	N	Spearmanova statistika ρ	*P* vrednost Spearmanove ρ statistike	*P* vrednost PH - predpostavke	*P* vrednost testa razmerja verjetnosti	Cox HR exp (koef)	Cox HR 95% CI	*P* vrednost Coxove regresije
Starost (meseci)*	62	-0,385	0,002	0,63	0,002	1,667	1,200, 2,316	**0,002**
BCS	54	0,180	0,194	0,12	0,20	0,797	0,576, 1,104	0,172
Frekvenca srčnega utripa+	62	-0,469	0,000	0,02	0,0006	1,776	1,273, 2,478	0,001
Intenzivnost šuma+	61	-0,424	0,001	0,03	0,004	1,663	1,174, 2,356	0,004
Terapija+	61	-0,315	0,013	0,04	0,02	1,465	1,047, 2,050	0,026
Spol	62	-0,220	0,086	0,18	0,08	1,304	0,971, 1,753	0,078
Starost (kg)	62	0,092	0,479	0,80	0,40	1,161	0,814, 1,655	0,410
LA/Ao*	61	-0,522	0,000	0,39	0,00008	1,998	1,449, 2,754	**0,000**
LVIDd*	60	-0,257	0,048	0,95	0,01	1,625	1,137, 2,323	**0,008**
LVIDdN*	60	-0,425	0,001	0,63	0,0007	1,898	1,296, 2,779	**0,001**
A (m/s)	57	0,054	0,689	0,05	0,6	0,918	0,662, 1,272	0,606
E (m/s)*	60	-0,346	0,007	0,26	0,006	1,553	1,137, 2,121	**0,006**
E/A*	57	-0,374	0,004	0,24	0,0006	2,023	1,387, 2,951	**0,000**
TR PG (mmHg)	52	-0,246	0,079	0,74	0,1	1,282	0,951, 1,729	0,103
CRP (mg/L)*	62	-0,327	0,010	0,92	0,006	1,688	1,248, 2,284	**0,001**
cTnI (ug/L)*	62	-0,526	0,000	0,30	0,0001	1,846	1,432, 2,380	**0,000**

NT-proBNP (pmol/L)	62	-0,675	0,000	0,03	0,000001	2,219	1,667, 2,953	0,000
WBC	62	-0,088	0,496	0,15	0,3	1,186	0,839, 1,677	0,335
Nevtrofilni granulociti (%)	62	0,101	0,437	0,56	0,4	0,895	0,674, 1,189	0,445
Nevtrofilni granulociti (×10⁹/L)	62	-0,041	0,754	0,13	0,5	1,134	0,797, 1,614	0,486
Monociti (%)	62	-0,231	0,071	0,08	0,3	1,171	0,887, 1,546	0,265
Monociti (×10⁹/L)	62	-0,179	0,164	0,02	0,2	1,273	0,923, 1,754	0,141
Limfociti (%)	62	-0,147	0,255	0,32	0,2	1,235	0,905, 1,685	0,184
Limfociti (×10⁹/L)	62	-0,231	0,071	0,96	0,1	1,235	0,941, 1,621	0,128
NLR	62	0,132	0,307	0,23	0,5	0,882	0,618, 1,258	0,487
$CD3^+$ (%)	62	-0,063	0,625	0,13	0,8	1,051	0,760, 1,454	0,762
$CD3^+$ (×10⁹/L)	62	-0,251	0,049	0,14	0,1	1,297	0,955, 1,762	0,096
$CD3^+CD4^+$ (%)*	62	0,270	0,034	0,52	0,05	0,733	0,542, 0,991	**0,044**
$CD3^+CD4^+$ (×10⁹/L)	62	-0,071	0,582	0,58	1	1,008	0,747, 1,361	0,956
$CD3^+CD8^+$ (%)	62	-0,195	0,130	0,86	0,1	1,290	0,962, 1,731	0,089
$CD3^+CD8^+$ (×10⁹/L) *	62	-0,224	0,081	0,67	0,01	1,502	1,116, 2,022	**0,007**
CD4/CD8	62	0,229	0,074	0,93	0,3	0,832	0,574, 1,207	0,332
DPT (%)	62	0,014	0,914	0,63	0,8	1,047	0,763, 1,436	0,777
DPT (×10⁹/L)	62	-0,173	0,179	0,99	0,3	1,205	0,884, 1,641	0,238
DNT (%)	62	-0,050	0,702	0,33	1	0,992	0,705, 1,397	0,964
DNT (×10⁹/L)	62	-0,209	0,103	0,13	0,4	1,158	0,845, 1,586	0,362
Limfociti B (%)	62	-0,063	0,628	0,37	0,5	1,122	0,831, 1,515	0,453
Limfociti B (×10⁹/L)	62	-0,129	0,318	0,21	0,3	1,151	0,892, 1,485	0,279
GLS aplax (%)*	48	0,325	0,024	0,31	0,006	0,594	0,412, 0,857	**0,005**
GLS 4-ch (%)	49	0,259	0,073	0,05	0,5	0,709	0,506, 0,994	0,046
GLS 2-ch (%)	48	0,216	0,140	0,80	0,08	0,735	0,524, 1,029	0,073

GLS Avg (%)*	49	0,247	0,087	0,21	0,007	0,578	0,383, 0,872	**0,009**

*Spremenljivke s *P* vrednostjo Coxove regresije < 0,05 in *P* vrednost PH – predpostavke > 0,05 so mišljene kot značilne v Coxovi analizi.

[+] Spremenljivke s *P* vrednostjo Spearmanove ρ statistike < 0,1 bi lahko bile monotono povezane z dolžino preživetja.

A, zgodnji mitralni preliv; BCS, ocena telesne kondicije; $CD3^+$, Limfociti T; $CD3^+CD4^+$, celice T pomagalke; $CD3^+CD8^+$, citotoksične celice T; CD4/CD8, razmerje med celicami T pomagalkami in citotoksičnimi celicami T; CI, interval zaupanja; cTnI, srčni troponin I; CRP, C-reaktivni protein; E, zgodnji mitralni priliv; E/A, razmerje med zgodnjim in poznim mitralnim valom; DNT, dvojno negativne T celice T; DPT, dvojno pozitivne T celice; GLS aplax, globalna apikalna vzdolžna sistolična deformacija GLS Avg, povprečna globalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS 2-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v dvovotlinskem pogledu; GLS 4-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v štirivotlinskem pogledu; HR, razmerje tveganja; LA/Ao, razmerje med premerom levega preddvora in aorto; LVIDd, premer levega prekata ob koncu diastole; LVIDdN, premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); MDMZ, miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke; N, število psov; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; NT-proBNP, N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B; PH, sorazmerno tveganje; TRPG, transtrikuspidalni tlačni gradient; WBC, koncentracija levkocitov.

* Covariate with Cox P value < 0.05 and PH-assumption P value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

+ Covariates with Spearman's ρ statistic P value < 0.05, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

A, late transmitral flow; BCS, body condition score; $CD3^+$, T lymphocytes; $CD3^+CD4^+$, T helper cells; $CD3^+CD8^+$, cytotoxic T cells; CD4/CD8, T helper cell to cytotoxic T cell ratio; CI, confidence interval; cTnI, cardiac troponin I; CRP, C-reactive protein; E, early transmitral flow; E/A, early to late mitral flow ratio; DNT, double negative T cells; DPT, double positive T cells; GLS aplax, global longitudinal strain in apical long axis view; GLS Avg, average global longitudinal strain; GLS 2-ch, global longitudinal strain in two chamber view; GLS 4-ch, global longitudinal strain in four chamber view; HR, hazard ratio; LA/Ao, left atrial to aortic ratio; LVIDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVIDdN, left ventricular end-diastolic diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,387}$); N, number of dogs; MMVD, myxomatous mitral valve degeneration; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; PH, proportional hazard; TRPG, transtricuspid pressure gradient; WBC, white blood cell count.

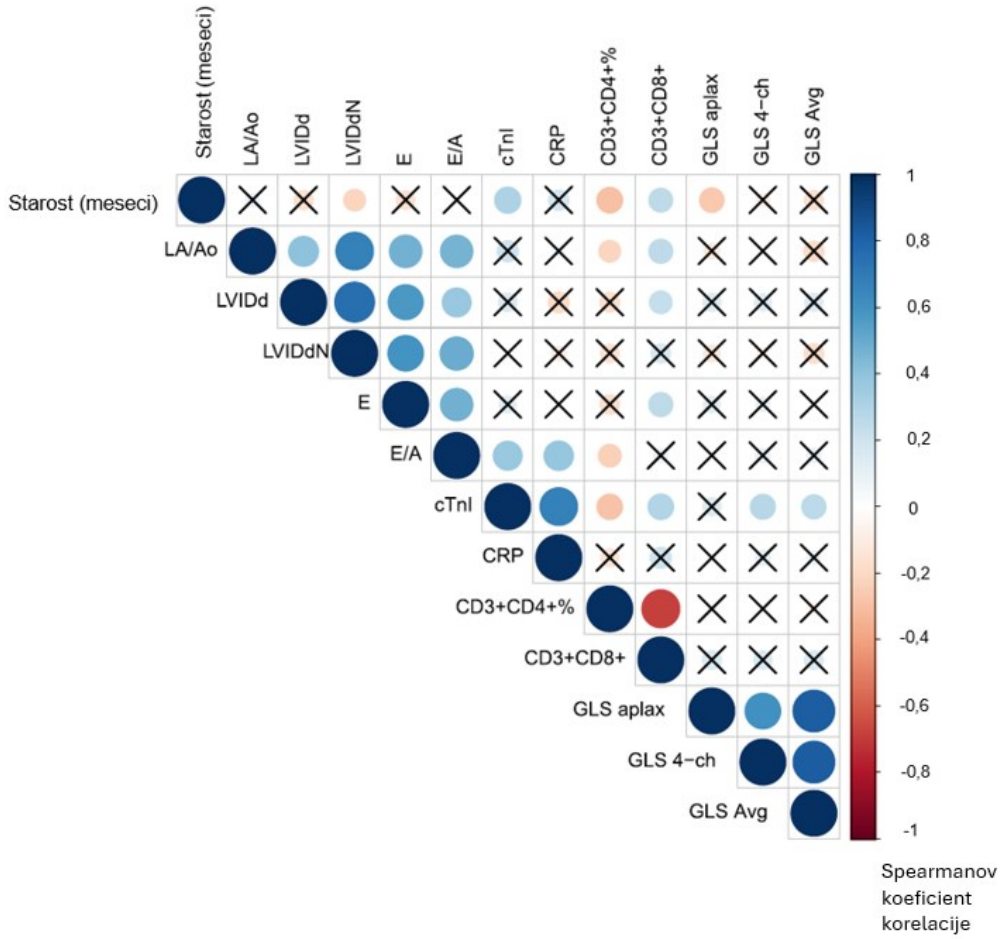
4.1.5 Korelacije med izbranimi imunskimi celicami, citokini ter ehokardiografskimi spremenljivkami in krvnimi biomarkerji

Za oceno medsebojnih povezav smo izračunali Spearmanove korelacijske koeficiente (rho) med značilnimi spremenljivkami. Zaradi majhne velikosti vzorca v posameznih skupinah smo se odločili poročati le o Spearmanovih korelacijskih koeficientih v združeni skupini vseh psov z MDMZ, kot je prikazano na Sliki 2.

Analiza je pokazala, da je bila starost šibko pozitivno povezana s koncentracijami cTnI (rho = 0,307; $P = 0,012$) in citotoksičnih celic T (rho = 0,254; $P = 0,040$) ter šibko negativno z deležem celic T pomagalk (rho = -0,293, $P = 0,017$).

Delež celic T pomagalk je bil šibko negativno povezan z LA/Ao (rho = -0.212, P = 0,090), E/A (rho = -0,232, $P = 0,072$) in cTnI (rho = -0,288, $P = 0,019$). Nasprotno pa je bila koncentracija citotoksičnih celic šibko pozitivno povezana z LA/Ao (rho = 0,259, $P = 0,037$), LVIDd (rho = 0,231, $P = 0,067$), E (rho = 0,259, $P = 0,039$) in cTnI (rho = 0,293, $P = 0,017$).

Poleg tega je koncentracija cTnI bila zmerno pozitivno povezana s koncentracijo CRP (rho = 0,673, $P < 0,001$).



Slika 2: Spearmanovi korelacijski koeficienti značilnih spremenljivk v skupini vseh psov z MDMZ. S križcem so označene neznačilne korelacije (P > 0,1).

$CD3^+CD4^+$ %, delež celic T pomagalk; $CD3^+CD8^+$, koncentracija citotoksičnih celic T; cTnI, srčni troponin I; CRP, C-reaktivni protein; E, zgodnji mitralni priliv; E/A, razmerje med zgodnjim in poznim mitralnim valom; GLS aplax, globalna vzdolžna sistolična deformacija v apikalnem vzdolžnem pogledu; GLS Avg, povprečna globalna vzdolžna sistolična deformacija; GLS 4-ch, globalna vzdolžna sistolična deformacija v štirivotlinskem pogledu; LA/Ao, razmerje med premerom levega preddvora in aorto; LVIDd, premer levega prekata ob koncu diastole; LVIDdN, premer levega prekata ob koncu diastole normaliziranega na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); MDMZ, miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke.

Figure 2: Spearman correlation coefficients of statistically significant variables in the group of all dogs with MMVD. A cross indicates non-significant correlations (P > 0.1).

$CD3^+CD4^+$ %, percentage of T helper cells; $CD3^+CD8^+$, cytotoxic T cell concentration; cTnI, cardiac troponin I; CRP, C-reactive protein; E, peak velocity of early diastolic mitral flow; E/A, early to late mitral flow ratio; GLS aplax, global longitudinal strain in apical long axis view; GLS Avg, average global longitudinal strain; GLS 4-ch, global longitudinal strain in four-chamber view; LA/Ao, left atrial to aortic ratio; LVIDd, left ventricular end-

diastolic diameter; LVIDdN, indexed left ventricular internal end-diastolic diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,387}$); MMVD, myxomatous mitral valve degeneration.

4.2 PROSPEKTIVNA ŠTUDIJA IMUNSKIH IN VNETNIH CELIC V RAZLIČNIH FAZAH MDMZ IN V PRIMERJAVI Z ZDRAVO SKUPINO PSOV

4.2.1 Primerjava hematoloških parametrov med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi

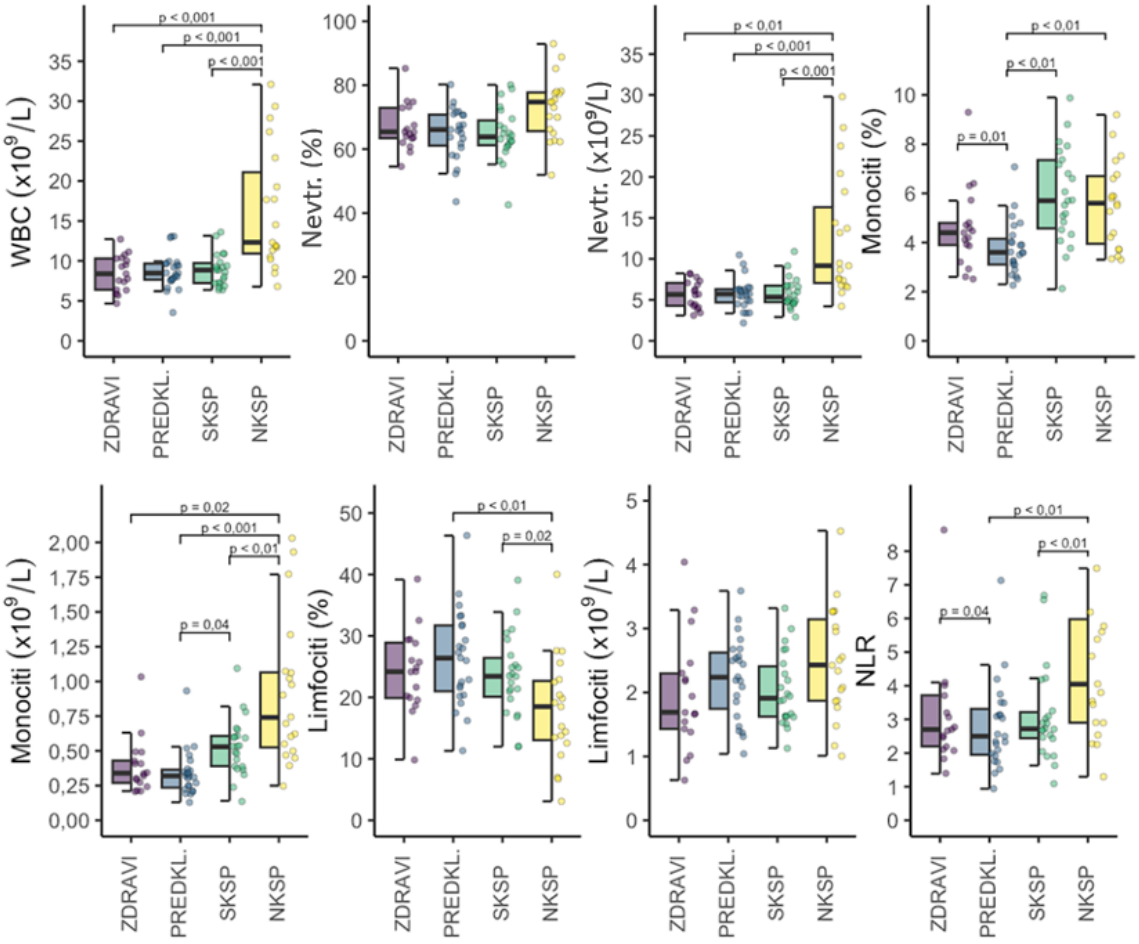
Primerjava rezultatov diferencialne bele krvne slike med skupinami je prikazana na Sliki 3.

Skupina nestabilnega KSP je imela značilno višjo WBC v primerjavi z vsemi drugimi skupinami ($P < 0,001$) med drugim tudi višjo koncentracijo nevtrofilnih granulocitov v primerjavi s predklinično skupino ($P < 0.001$), skupino stabilnega KSP ($P < 0,001$) in zdravimi psi ($P = 0,004$).

Delež ($P = 0,001$) in koncentracija ($P = 0,043$) monocitov sta bila značilno višja pri psih s stabilnim KSP kot v predklinični fazi bolezni. Poleg tega je bila koncentracija monocitov značilno višja v skupini nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično ($P < 0,001$), skupino stabilnega KSP ($P = 0,002$) in zdravo skupino ($P = 0,019$). Dodatno je bil delež monocitov značilno višji v skupini nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično skupino ($P = 0,001$). Poleg tega je bil delež monocitov značilno nižji v predklinični skupini psov kot v zdravi skupini ($P = 0,01$).

Delež limfocitov je bil značilno nižji v skupini psov z nestabilnim KSP kot v predklinični skupini ($P = 0,004$) in skupini stabilnega KSP ($P = 0,022$).

Razmerje med nevtrofilnimi granulociti in limfociti je bilo značilno višje v skupini psov z nestabilnim KSP kot v predklinični in skupini stabilnega KSP ($P = 0,003$).



Slika 3: Prikaz primerjav koncentracije levkocitov in diferencialne bele krvne slike med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi.

MDMZ, miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke; Nevtr., nevtrofilni granulociti; NKSP, skupina nestabilnega kongestivnega popuščanja srca; NLR, razmerje med koncentracijo nevtrofilnih granulocitov in limfocitov; Predklin, predklinična skupina; SKSP, skupina stabilnega kongestivnega popuščanja srca; WBC, koncentracija levkocitov.

Figure 3: Comparison of white blood cell count and differential white blood cell counts between groups of dogs with MMVD and healthy dogs.

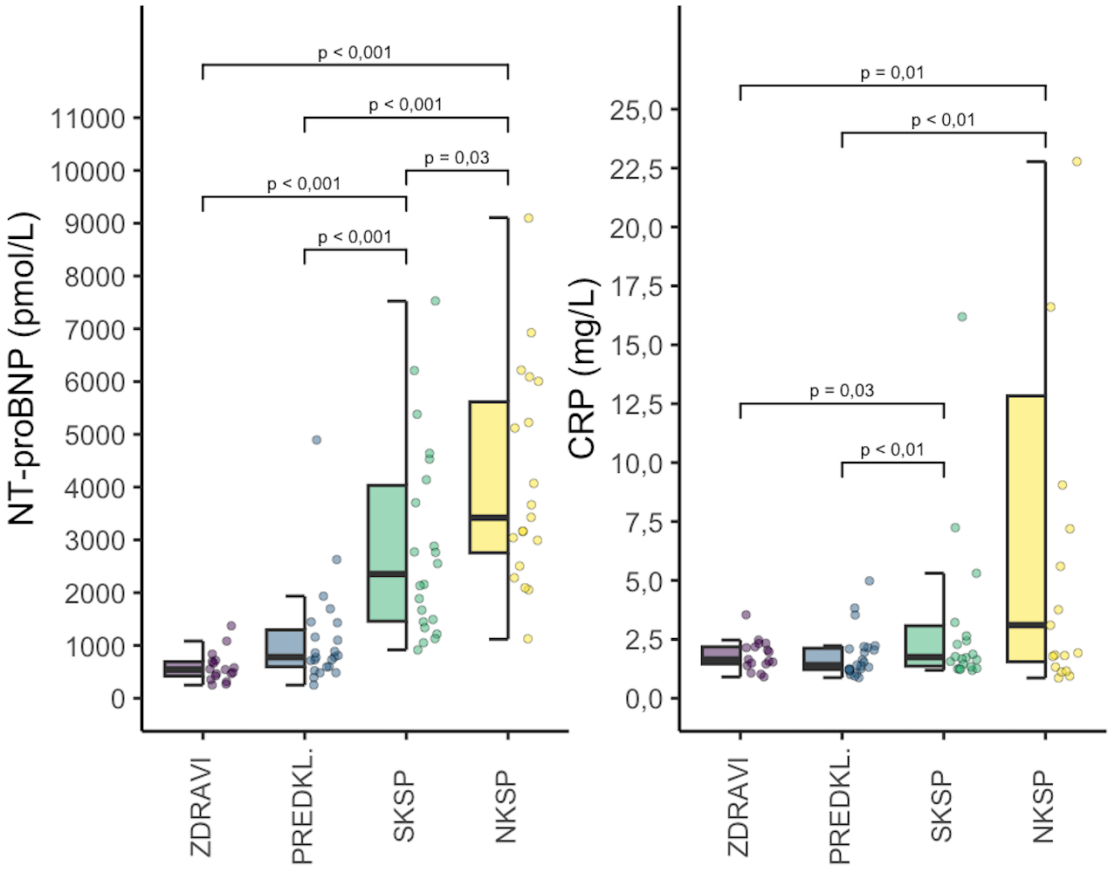
MMVD, myxomatous mitral valve disease; Nevtr., neutrophil granulocyte; NKSP, unstable congestive heart failure group; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; Preklin, preclinical group; SKSP, stable congestive heart failure group; WBC, total white blood cell count.

4.2.2 Primerjava krvnih biooznačevalcev med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi

Primerjava koncentracij NT-proBNP in CRP med skupinami je prikazana na Sliki 4.

Koncentracija NT-proBNP je bila značilno višja v skupini stabilnega in nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično in skupino zdravih psov ($P < 0{,}001$). Poleg tega je bila koncentracija NT-proBNP značilno višja v skupini nestabilnega KSP v primerjavi s skupino stabilnega KSP ($P = 0{,}031$).

Koncentracija CRP je bila značilno višja v skupini nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično ($P = 0{,}002$) in skupino zdravih psov ($P = 0{,}007$). Prav tako je bila koncentracija značilno višja v skupini stabilnega KSP v primerjavi s predklinično skupino ($P = 0{,}003$) ter zdravimi psi ($P = 0{,}025$).



Slika 4: Prikaz primerjav koncentracije NT-proBNP in CRP med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi.

CRP, C-reaktivni protein; MDMZ, miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke; NKSP, skupina nestabilnega kongestivnega srčnega popuščanja; NT-proBNP, N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B; Predkl, predklinična skupina; SKSP, skupina stabilnega kongestivnega srčnega popuščanja.

Figure 4: Comparison of NT-proBNP and CRP levels between groups of dogs with MMVD and healthy dogs.

CRP, C-reactive protein; MMVD, myxomatous mitral valve degeneration; NKSP, unstable group; NT-proBNP, N-terminal fragment of B-type natriuretic pro-peptide; Predkl, preclinical group; SKSP, stable congestive heart failure group.

4.2.3 Primerjava deležev imunskih celic med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi

Primerjava deležev imunskih celic, izmerjenih s pretočno citometrijo, med skupinami MDMZ in skupino zdravih je prikazana na Sliki 5.

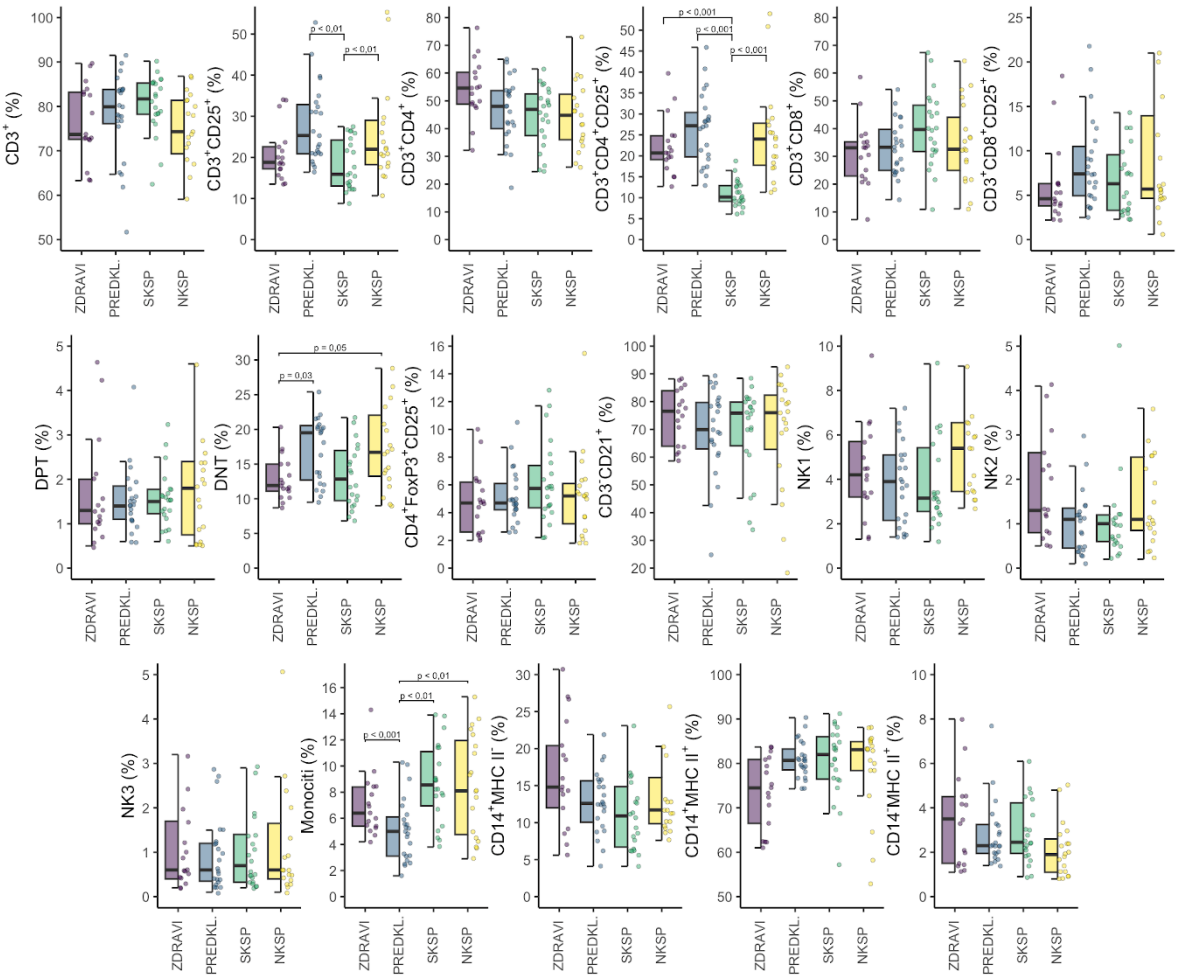
Med skupinami nismo ugotovili značilnih razlik v celokupnem deležu limfocitov T, medtem ko je bil delež aktiviranih limfocitov T značilno višji v predklinični skupini (P = 0,001) ter skupini nestabilnega KSP (P = 0,008) v primerjavi s skupino stabilnega KSP.

Delež aktiviranih celic T pomagalk je bil značilno nižji v skupini stabilnega KSP v primerjavi z vsemi ostalimi skupinami (P < 0,001).

Delež celic DPT se ni razlikoval med skupinami, medtem ko je bil delež celic DNT značilno višji (P = 0,032) v predklinični skupini v primerjavi z zdravimi.

Delež skupnih monocitov je bil značilno višji v skupini stabilnega in nestabilnega KSP (P = 0,001) v primerjavi s predklinično skupino, medtem ko so predklinični psi imeli značilno nižji delež monocitov v primerjavi z zdravo skupino psov (P < 0,001).

V naši študiji nismo ugotovili značilnih razlik za podtipe monocitov, regulacijske celice T, citotoksične celice T, limfocite B ali celice NK med preučevanimi skupinami.



Slika 5: Prikaz primerjav deležev imunskih celice, izmerjenih s pretočno citometrijo, med različnimi skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi.

$CD3^+$, limfociti T; $CD3^+CD25^+$, aktivirani limfociti T; $CD3^+CD4^+$, celice T pomagalke; $CD3^+CD4^+CD25^+$, aktivirane celice T pomagalke; $CD4^+FoxP3^+CD25^+$, regulacijske celice T; $CD3^+CD8^+$, citotoksične celice T; $CD3^+CD8^+CD25^+$, aktivirane citotoksične celice T; $CD3^-CD21^+$, limfociti B; $CD14^+MHC\ II^-$, monocitni podtip 1; $CD14^+MHC\ II^+$, monocitni podtip 2; $CD14^-MHC\ II^+$, monocitni podtip 3; DNT, dvojno negativne celice T; DPT, dvojno pozitivne celice T; MDMZ, miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke; NK1, populacija celic naravne ubijalke 1 ($CD21^-CD5^-CD3^-$); NK2, populacija celic naravne ubijalke 2 ($CD21^-CD5^{dim}CD3^-$); NK3, populacija celic naravne ubijalke 3 ($CD21^-CD5^{dim}CD3^+$); NKSP, skupina nestabilnega kongestivnega srčnega popuščanja; Predklin, predklinična skupina; SKSP, skupina stabilnega kongestivnega srčnega popuščanja.

Figure 5: Comparison of immune cell percentages measured by flow cytometry between different groups of dogs with MMVD and healthy dogs.

$CD3^+$, T lymphocytes; $CD3^+CD25^+$, activated T lymphocytes; $CD3^+CD4^+$, T helper cells; $CD3^+CD4^+CD25^+$, activated T helper cells; $CD4^+FoxP3^+CD25^+$, regulatory T cells; $CD3^+CD8^+$, cytotoxic T cells; $CD3^+CD8^+CD25^+$, activated cytotoxic T cells; $CD3^-CD21^+$, B lymphocytes; $CD14^+MHC\ II^-$, monocyte subtype 1; $CD14^+MHC\ II^+$, monocyte subtype 2; $CD14^-MHC\ II^+$, monocyte subtype 3; DNT, double negative T cells; DPT, double positive

T cells; MMVD, myxomatous mitral valve degeneration; NK1, natural killer cell population 1 ($CD21^{-}CD5^{-}CD3^{-}$); NK2, natural killer cell population 2 ($CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{-}$); NK3, natural killer cell population 3 ($CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{+}$); NKSP, unstable congestive heart failure group; Preclin, preclinical group; SKSP, stable congestive heart failure group

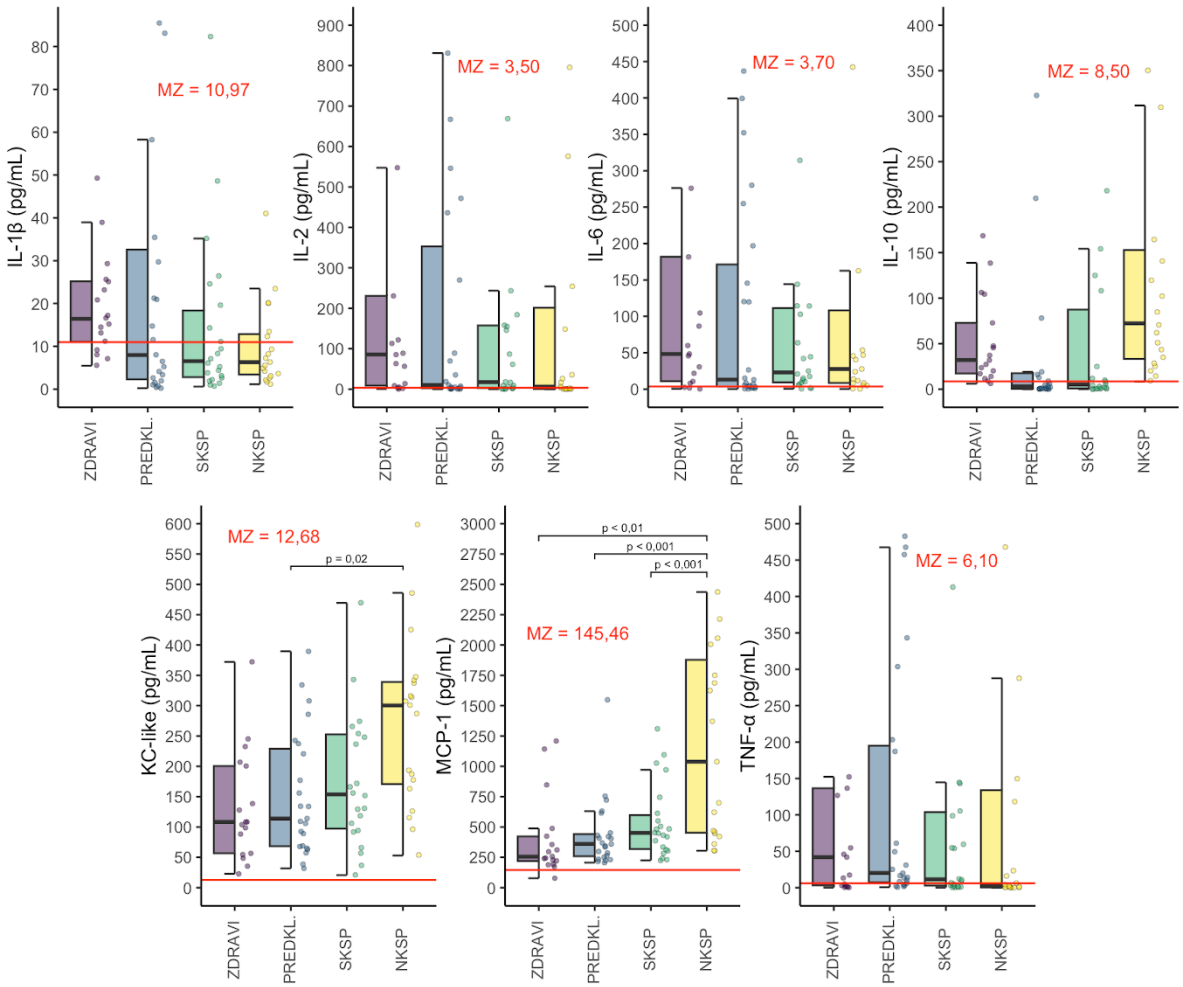
4.2.4 Primerjava koncentracij citokinov in kemokinov v krvi med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi

Primerjava koncentracij citokinov in kemokinov med skupinami je prikazana na Sliki 6. Koncentracije MCP-1 in KC-like so bile izmerljive pri vseh psih, medtem ko so bile koncentracije IL-1β v 54 % primerov, IL-2 v 39 %, IL-6 v 21 %, IL-10 v 68 % in TNF-α v 51 % primerov pod mejo detekcije. Spodnja meja zaznavnosti koncentracij citokinov in kemokinov je na grafih prikazana z rdečo vodoravno črto.

Koncentracija KC-like je bila značilno višja pri nestabilnem KSP v primerjavi s predklinično skupino ($P = 0{,}016$).

Koncentracija MCP-1 je bila značilno višja v skupini nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično ($P = 0{,}001$), skupino stabilnega KSP ($P < 0{,}001$) in skupino zdravih psov ($P = 0{,}004$).

Ostali preiskovani citokini se niso razlikovali med skupinami psov.



Slika 6: Prikaz primerjav koncentracij citokinov in kemokinov v krvi med skupinami psov z MDMZ in zdravimi psi.

IL, interlevkin; KC-like, keratinocitni kemotaktični protein; MCP-1, monocitni kemoatraktantni protein 1; MDMZ, miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke; MZ, meja zaupanja; NKSP, skupina nestabilnega kongestivnega srčnega popuščanja; Predklin, predklinična skupina; SKSP, skupina stabilnega kongestivnega srčnega popuščanja; TNF-α, dejavnik tumorske nekroze α.

Figure 6: Comparison of cytokine and chemokine concentrations between groups of dogs with MMVD and healthy dogs.

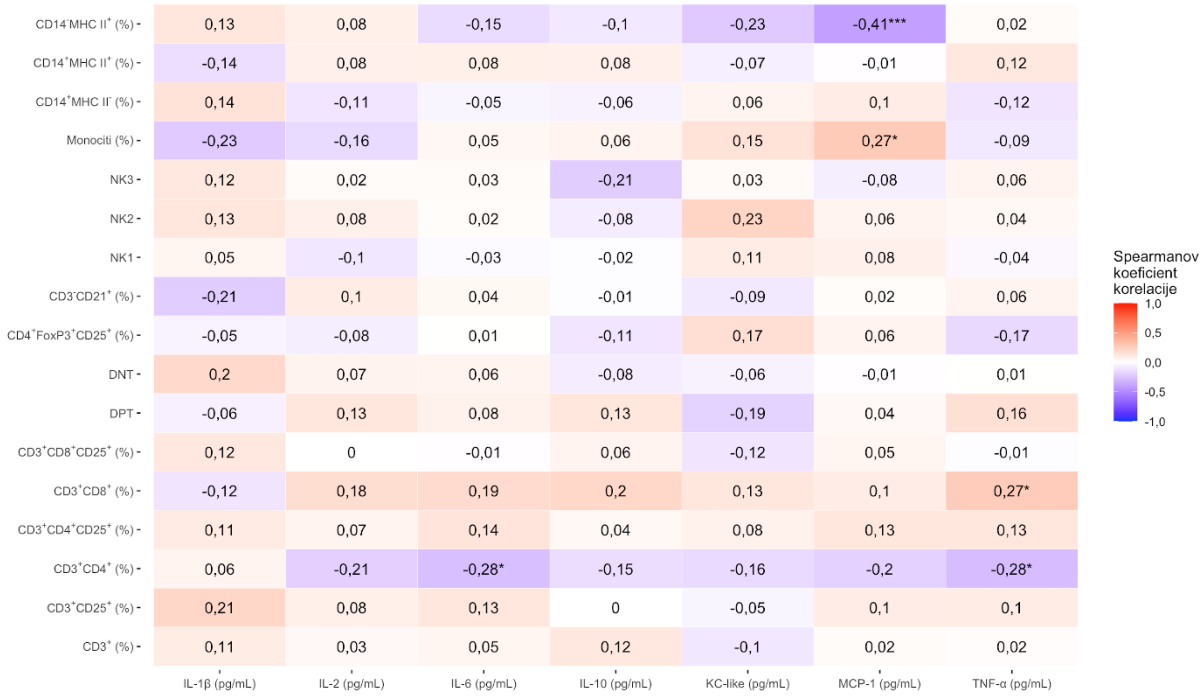
IL, interleukin; KC-like, keratinocyte chemotactic protein; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MMVD, myxomatous mitral valve disease; MZ, confidence interval; NKSP, unstable congestive heart failure group; Predklin, preclinical group; SKSP, stable congestive heart failure group; TNF-α, tumour necrosis factor α.

4.2.5 Korelacije med izbranimi preiskovanimi parametri

Za oceno medsebojnih povezav smo izračunali Spearmanove korelacijske koeficiente (rho) v združeni skupini, ki je vključevala pse z vsemi stopnjami MDMZ. Moč ugotovljene korelacije rho smo interpretirali na naslednji način: 0,00–0,10: zanemarljiva; 0,10–0,39: šibka; 0,40–0,69: zmerna; 0,70–0,89: močna; in 0,90–1,00: zelo močna (Schober in sod., 2018).

Ugotovili smo značilno negativno povezavo med monocitno podvrsto $CD14^{-}MHC\ II^{+}$ in MCP-1 ($P < 0{,}001$) ter značilno pozitivno povezavo med skupnimi monociti in MCP-1 ($P = 0{,}030$).

Delež celic T pomagalk je bil negativno povezan s koncentracijami IL-6 ($P = 0{,}025$) ter TNF-α ($P = 0{,}024$). Nasprotno pa je bil delež citotoksičnih celic T pozitivno povezan s koncentracijo TNF-α ($P = 0{,}031$) (Slika 7).



Slika 7: Korelacije med izbranimi imunskimi celicami ter citokini in kemokini.

* $P < 0{,}1$, ** $P < 0{,}05$, *** $P < 0{,}01$

$CD3^{+}$, limfociti T; $CD3^{+}CD25^{+}$, aktivirani limfociti T; $CD3^{+}CD4^{+}$, celice T pomagalke; $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$, aktivirane celice T pomagalke; $CD4^{+}FoxP3^{+}CD25^{+}$, regulacijske celice T; $CD3^{+}CD8^{+}$, citotoksične celice T; $CD3^{+}CD8^{+}CD25^{+}$, aktivirane citotoksične celice T; $CD3^{-}CD21^{+}$, limfociti B; $CD14^{+}MHC\ II^{-}$, monocitni podtip 1; $CD14^{+}MHC\ II^{+}$, monocitni podtip 2; $CD14^{-}MHC\ II^{+}$, monocitni podtip 3; DNT, dvojno negativne celice T;

DPT, dvojno pozitivne celice T; IL, interlevkin; KC-like, keratinocitni kemotaktični protein; MCP-1, monocitni kemoatraktantni protein 1; NK1, populacija celic naravne ubijalke 1 ($CD21^{-}CD5^{-}CD3^{-}$); NK2, populacija celic naravne ubijalke 2 ($CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{-}$); NK3, populacija celic naravne ubijalke 3 ($CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{+}$); TNF-α, tumor nekrotizirajoči faktor α.

Figure 7: Correlations between selected immune cells and cytokines and chemokines.

* $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

$CD3^{+}$, T lymphocytes; $CD3^{+}CD25^{+}$, activated T lymphocytes; $CD3^{+}CD4^{+}$, T helper cells; $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$, activated T helper cells; $CD4^{+}FoxP3^{+}CD25^{+}$, regulatory T cells; $CD3^{+}CD8^{+}$, cytotoxic T cells; $CD3^{+}CD8^{+}CD25^{+}$, activated cytotoxic T cells; $CD3^{-}CD21^{+}$, B lymphocytes; $CD14^{+}$MHC II^{-}, monocyte subtype 1; $CD14^{+}$MHC II^{+}, monocyte subtype 2; $CD14^{-}$MHC II^{+}, monocyte subtype 3; DNT, double negative T cells; DPT, double positive T cells; IL, interleukin; KC-like, keratinocyte chemotactic-like; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NK1, natural killer cell population 1 ($CD21^{-}CD5^{-}CD3^{-}$); NK2, natural killer cell population 2 ($CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{-}$); NK3, natural killer cell population 3 ($CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{+}$).

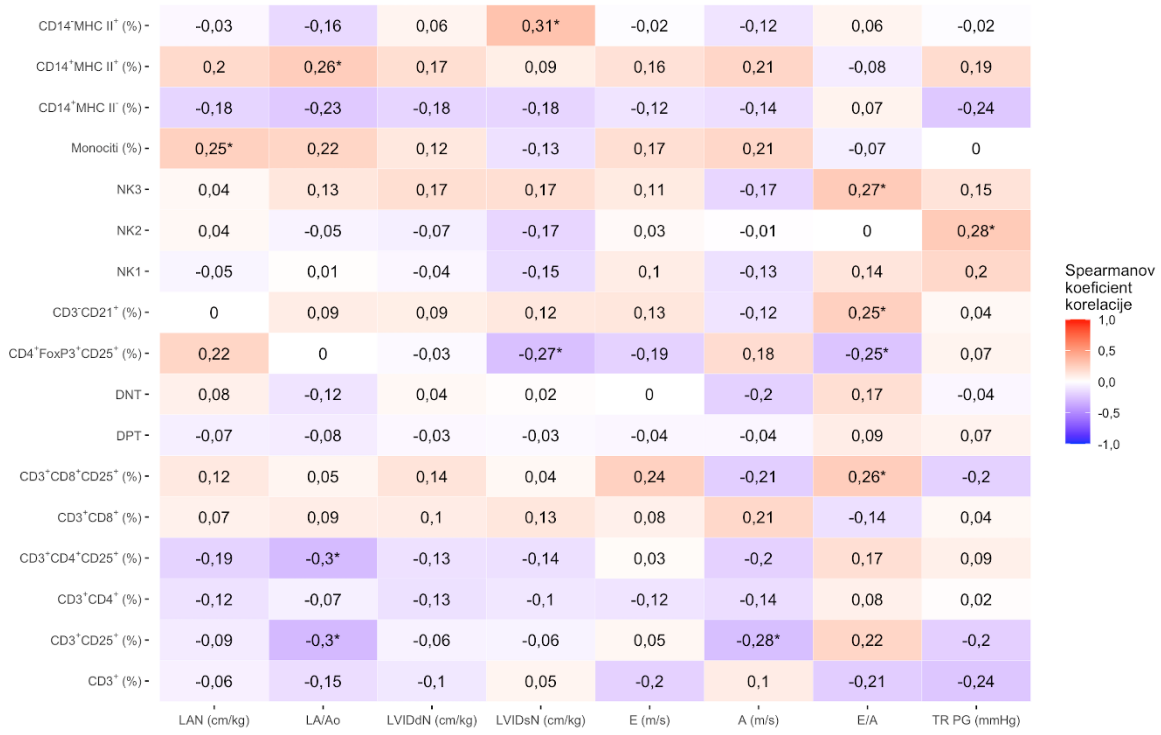
Korelacije med preiskovanimi imunskimi celicami in izbrani ehokardiografskimi parametri so prikazane na Sliki 8.

Skupni monociti so bili pozitivno povezani z LAN (P = 0,049). Podvrsta monocitov $CD14^{-}$MHC II^{+} je bil značilno pozitivno povezana z LVIDsN (P = 0,011) ter $CD14^{+}$MHC II^{+} pozitivno z LA/Ao (P = 0,039).

Karakterizacija NK3 celic NK je bila značilno pozitivno povezana z E/A (P = 0,031), NK2 pa značilno pozitivno s TRPG (P = 0,038).

Regulacijske celice T so bile značilno negativno povezane z LVIDsN (P = 0,030) in E/A (P = 0,047). Aktivirane citotoksične celice T so bile pozitivno povezane z E/A (P = 0,040), medtem ko so bile aktivirane celice T pomagalke značilno negativno povezane z LA/Ao (P = 0,019). Delež aktiviranih limfocitov T je bil prav tako negativno povezan z LA/Ao (P = 0,016) in A (P = 0,026).

Limfociti B so bili značilno pozitivno povezani z E/A ($P < 0,05$).



Slika 8: Korelacije med imunskimi celicami in izbranimi ehokardiografskimi parametri.

* $P < 0{,}1$, ** $P < 0{,}05$, *** $P < 0{,}01$
A, pozni mitralni priliv; $CD3^+$, limfociti T; $CD3^+CD25^+$, aktivirani limfociti T; $CD3^+CD4^+$, celice T pomagalke; $CD3^+CD4^+CD25^+$, aktivirane celice T pomagalke; $CD4^+FoxP3^+CD25^+$, regulacijske celice T; $CD3^+CD8^+$, citotoksične celice T; $CD3^+CD8^+CD25^+$, aktivirane citotoksične celice T; $CD3^-CD21^+$, limfociti B; $CD14^+$MHC II^-, monocitni podtip 1; $CD14^+$MHC II^+, monocitni podtip 2; $CD14^-$MHC II^+, monocitni podtip 3; DNT, dvojno negativne celice T; DPT, dvojno pozitivne celice T; E, zgodnji mitralni priliv; E/A, razmerje med zgodnjim in poznim mitralnim valom; LA/Ao, razmerje med premerom levega preddvora in aorte; LAN, premer levega preddvora, normaliziranega na telesno maso (cm/kg$^{0{,}309}$); LVIDdN, premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziranega na telesno maso (cm/kg$^{0{,}387}$); LVIDsN, premer levega prekata ob koncu sistole, normaliziranega na telesno maso (cm/kg$^{0{,}387}$); NK1, populacija celic naravne ubijalke 1 ($CD21^-CD5^-CD3^-$); NK2, populacija celic naravne ubijalke 2 ($CD21^-CD5^{dim}CD3^-$); NK3, populacija celic naravne ubijalke 3 ($CD21^-CD5^{dim}CD3^+$); TRPG, transtrikuspidalni tlačni gradient.

Figure 8: Correlations between immune cells and selected echocardiographic parameters.

* $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
A, late transmitral flow; $CD3^+$, T lymphocytes; $CD3^+CD25^+$, activated T lymphocytes; $CD3^+CD4^+$, T helper cells; $CD3^+CD4^+CD25^+$, activated T helper cells; $CD4^+FoxP3^+CD25^+$, regulatory T cells; $CD3^+CD8^+$, cytotoxic T cells; $CD3^+CD8^+CD25^+$, activated cytotoxic T cells; $CD3^-CD21^+$, B lymphocytes; $CD14^+$MHC II^-, monocyte subtype 1; $CD14^+$MHC II^+, monocyte subtype 2; $CD14^-$MHC II^+, monocyte subtype 3; DNT, double negative T cells; DPT, double positive T cells; E, early transmitral flow; E/A early to late mitral flow ratio; LA/Ao, left atrial to

aortic ratio; LAN, left atrial diameter normalized for body weight (cm/kg^{0,309}); LVIDdN, left ventricular end-diastolic diameter normalized for body weight (cm/kg^{0,387}); LVISdN, left ventricular end-systolic diameter normalized for body weight (cm/kg^{0,387}); NK1, natural killer cell population 1 (CD21$^-$CD5$^-$CD3$^-$); NK2, natural killer cell population 2 (CD21$^-$CD5^{dim}CD3$^-$); NK3, natural killer cell population 3 (CD21$^-$CD5^{dim}CD3$^+$); TRPG, transtricuspid pressure gradient.

Koncentracija NTpro-BNP je bila značilno pozitivno povezana z deležem skupnih monocitov (P = 0,005) in MCP-1 (P = 0,003) in negativno z deležem aktiviranih celic T pomagalk (P = 0,023). Poleg tega je bila koncentracija NTpro-BNP pozitivno povezana z naslednjimi ehokardiografskimi parametri; LAN, LVIDdN, LA/Ao, E, E/A in TRPG (Slika 9).

Koncentracija CRP je bila značilno pozitivno povezana s celokupnim deležem monocitov (P = 0,003) ter koncentracijo MCP-1 (P = 0,003). Nasprotno pa nismo našli povezav med koncentracijo CRP in ehokardiografskimi parametri (Slika 9).

Slika 9: Korelacije krvnih biooznačevalcev (NT-proBNP in CRP) z imunskimi celicami, citokini in kemokini ter izbranimi ehokardiografskimi parametri.

* P < 0,1, ** P < 0,05, *** P < 0,01

A, pozni mitralni priliv; CD3$^+$, limfociti T; CD3$^+$CD25$^+$, aktivirani limfociti T; CD3$^+$CD4$^+$, celice T pomagalke; CD3$^+$CD4$^+$CD25$^+$, aktivirane celice T pomagalke; CD4$^+$FoxP3$^+$CD25$^+$, regulacijske celice T; CD3$^+$CD8$^+$,

citotoksične celice T; $CD3^+CD8^+CD25^+$, aktivirane citotoksične celice T; $CD3^-CD21^+$, limfociti B; $CD14^+$MHC II^-, monocitni podtip 1; $CD14^+$MHC II^+, monocitni podtip 2; $CD14^-$MHC II^+, monocitni podtip 3; CRP, C-reaktivni protein; DNT, dvojno negativne celice T; DPT, dvojno pozitivne celice T; E, zgodnji mitralni priliv; E/A, razmerje med zgodnjim in poznim mitralnim valom; IL, interlevkin; KC-like, keratinocitni kemotaktični protein; LA/Ao, razmerje med premerom levega preddvora in aorte; LAN, premer levega preddvora, normaliziran na telesno maso ($cm/kg^{0,309}$); LVIDdN, premer levega prekata ob koncu diastole, normaliziran na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); LVIDsN, premer levega prekata ob koncu sistole, normaliziran na telesno maso ($cm/kg^{0,387}$); MCP-1, monocitni kemoatraktantni protein 1; NK1, populacija celic naravne ubijalke 1 ($CD21^-CD5^-CD3^-$); NK2, populacija celic naravne ubijalke 2 ($CD21^-CD5dimCD3^-$); NK3, populacija celic naravne ubijalke 3 ($CD21^-CD5dimCD3^+$); NT-proBNP, N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B; TNF-α, dejavnik tumorske nekroze α; TRPG, transtrikuspidalni tlačni gradient.

Figure 9: Correlations of blood biomarkers (NT-proBNP and CRP) with immune cells, cytokines and chemokines and selected echocardiographic parameters.

* $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

A, late transmitral flow; $CD3^+$, T lymphocytes; $CD3^+CD25^+$, activated T lymphocytes; $CD3^+CD4^+$, T helper cells; $CD3^+CD4^+CD25^+$, activated T helper cells; $CD4^+FoxP3^+CD25^+$, regulatory T cells; $CD3^+CD8^+$, cytotoxic T cells; $CD3^+CD8^+CD25^+$, activated cytotoxic T cells; $CD3^-CD21^+$, B lymphocytes; $CD14^+$MHC-II^-, monocyte subtype 1; $CD14^+$MHC-II^+, monocyte subtype 2; $CD14^-$MHC-II^+, monocyte subtype 3; CRP, C.reactive protein; DNT, double negative T cells; DPT, double positive T cells; E, early transmitral flow; E/A early to late mitral flow ratio; IL, interleukin; KC-like, keratinocyte chemotactic-like; LA/Ao, left atrial to aortic ratio; LAN, left atrial diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,309}$); LVIDdN, left ventricular end-diastolic diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,387}$); LVIDsN, left ventricular end-systolic diameter normalized for body weight ($cm/kg^{0,387}$); MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NK1, natural killer cell population 1 ($CD21^-CD5^-CD3^-$); NK2, natural killer cell population 2 ($CD21^-CD5dimCD3^-$); NK3, natural killer cell population 3 ($CD21^-CD5dimCD3^+$); NT-proBNP, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide; TNF-α, tumor necrosis factor α; TRPG, transtricuspid pressure gradient.

5 RAZPRAVA

V okviru naše raziskave nas je zanimala vpletenost izbranih vnetnih in imunskih celic v posameznih stopnjah MDMZ ter njihov morebitni prognostični pomen. Študija je bila sestavljena iz dveh delov, kjer smo se v retrospektivnem delu študije osredotočili na morebitno napovedno vrednost celic diferencialne bele krvne slike, kot so nevtrofilni granulociti, monociti in limfociti ter podvrst limfocitov T, zlasti citotoksičnih celic T ter celic T pomagalk. V prospektivnem delu smo želeli raziskati morebitne razlike v deležih izbranih imunskih celic, zlasti regulacijskih celic T, celicah NK ter monocitov in njihovih podvrst med psi v različnih stopnjah MDMZ in zdravimi ter ugotoviti povezave med imunskimi celicami ter koncentracijami citokinov in kemokinov, krvnih biooznačevalcev ter ehokardiografskimi parametri napredovanja MDMZ.

Z retrospektivno študijo nismo ugotovili značilne povezave med parametri diferencialne bele krvne slike in preživetjem pri psih z MDMZ. Pri ljudeh je opisano, da povečana koncentracija nevtrofilnih granulocitov in WBC (Ostrowska in sod., 2017) ter zmanjšana koncentracija skupnih limfocitov (Ommenn in sod., 1998; Ostrowska in sod., 2017; Majmundar in sod., 2022) predstavlja negativen prognostični dejavnik pri popuščanju srca. Prav tako so v študiji avtorice Brložnik in sod. (2023) pri psih z MDMZ ugotovili negativno povezavo med WBC in časom preživetja. Dodatno so v študiji avtorice Domanjko Petrič in sod. (2019) pri psih z MDMZ in dilatacijsko kardiomiopatijo v fazi KSP ugotovili negativno napovedno vrednost koncentracije nevtrofilnih granulocitov, monocitov, WBC, CRP, IL-6 in TNF-α. Vzrok za pomanjkanje podobnih povezav v naši študiji bi lahko bila velika variabilnost vrednosti celic diferencialne bele krvne slike med posameznimi psi. Visoke koncentracije in deleže vnetnih celic večinoma opazimo le v akutni, dekompenzacijski fazi popuščanja srca (Domanjko Petrič in sod., 2018; Druzhaeva in sod., 2021; Brložnik in sod., 2023). Tudi v tej fazi pri nekaterih psih ne ugotavljamo očitne spremembe v vrednostih diferencialne bele krvne slike. Domnevamo, da je slednje posledica individualnega imunskega odziva in imunske tolerance vsakega posameznega psa, na kar lahko vpliva stopnja napredovanja bolezni srca oz. preoblikovanja votlin srca pri posameznemu psu.

Zanimala nas je povezava med parametri diferencialne krvne slike z označevalci napredovanja MDMZ, kot so izbrani ehokardiografski parametri (LAN, LVIDd, LA/Ao, val E, TRPG) ter

krvnimi biooznačevalci (NT-proBNP, cTnI, CRP). Naši rezultati tudi v tem primeru niso pokazali značilnih povezav. Nasprotno pa smo v literaturi zasledili, da so pri psih z MDMZ ugotovili pozitivno povezavo med vnetnimi markerji NLR ter MLR in LA/Ao ter oceno velikosti srca na rentgenski sliki (Ku in sod., 2023).

Koncentracija citotoksičnih celic T je bila negativno povezana s časom preživetja pri psih z nestabilnim KSP kot tudi v združeni skupini vseh psov z MDMZ. Prav tako smo ugotovili pozitivno povezavo med koncentracijo citotoksičnih celic T in koncentracijo cTnI ter ehokardiografskimi parametri napredovalosti bolezni, kot so LA/Ao, LVIDd in val E, kar lahko nakazuje na vpletenost citotoksičnih celic T v napredovanje MDMZ. Korelacija med cTnI in citotoksičnimi celicami T je bila predhodno že opisana v humani medicini pri akutnem miokardnem infarktu (Al-Ahmad in sod., 2004). Srčni troponin I je specifičen pokazatelj poškodbe miokarda, kjer višjo koncentracijo cTnI v periferni krvi povezujemo s stopnjo preoblikovanja votlin srca (Oyama in Sisson, 2004).

Citotoksične celice T imajo ključno vlogo pri obrambi pred virusi in neoplastičnimi celicami. Eksperimentalne študije na miših opisujejo njihovo morebitno vlogo pri sterilnih obolenjih ob odsotnosti očitnega vnetja kot na primer pri ishemični poškodbi srca (Santos Zas in sod., 2021). Citotoksične celice T pričnejo infiltrirati miokard drugi teden po prvotni poškodbi miokarda ter so zmožne prepoznave in uničenja tudi zdravih kardiomiocitov, podobno kot pri avtoimunskem odzivu virusnega miokarditisa (Varda-Bloom in sod., 2000). Apoptozo kardiomiocitov povzročijo s sproščanjem perforinov in grancimov v medcelični prostor ali aktivacijo receptorjev smrti iz družine TNF (Santos Zas in sod., 2021). Eksperimentalna študija na mišjem modelu je pokazala, da odsotnost funkcionalnih citotoksičnih celic T spodbuja boljše celjenje, izboljša vsesplošno funkcijo srca ter prognozo po miokardnem infarktu v primerjavi s kontrolno skupino (Ilatovskaya in sod., 2019). To nakazuje, da bi citotoksične celice T lahko bile povezane s slabšim procesom celjenja ter s tem prispevale k večjemu preoblikovanju srca.

Nasprotno je delež celic T pomagalk pri psih z nestabilnim KSP in v skupini vseh psov z MDMZ predstavljal pozitiven prognostični dejavnik. Dodatno smo ugotovili tudi negativno povezavo med deležem celic T pomagalk in koncentracijo cTnI ter ehokardiografskimi

parametri napredovanja bolezni, kot sta LA/Ao in E/A, kar kaže na možnost pozitivne prognostične vrednosti celic T pomagalk pri MDMZ.

Celice T pomagalke skupaj s citotoksičnimi celicami T infiltrirajo miokard pri ishemični in neishemični poškodbi srca. Slednje lahko prispevajo k večji fibrozi, hipertrofiji in posledičnemu preoblikovanju levega prekata (Laroumanie in sod., 2014; Bansal in sod., 2017). Manjši delež celic T pomagalk je pri miših z miokardnim infarktom povezan s povečano mobilizacijo levkocitov, kar je vodilo v slabši izid bolezni. Nasprotno pa se je višje število celic T pomagalk izkazalo kot potencialen biooznačevalec boljšega celjenja in daljšega preživetja (Hofmann in sod., 2012).

Delež celic DPT je bil negativno povezan s preživetjem v predklinični skupini. Prav tako je bila višja koncentracija celic DPT in DNT negativno povezana s preživetjem v skupini nestabilnega KSP. Celice DPT in DNT so bile opisane le v eni pretekli študiji, izvedeni na psih z MDMZ, pri kateri niso ugotovili razlik med skupinami psov z MDMZ kot tudi ne v primerjavi z zdravimi psi (Druzhaeva in sod., 2021). Drugih študij, ki bi raziskovale njihovo potencialno vlogo pri popuščanju srca, v literaturi nismo zasledili.

Dvojno negativne celice T so podvrsta limfocitov T, ki na svoji površini ne izražajo receptorjev za CD4 ali CD8. Predvideva se, da gre za nezrele limfocite T, ki timus predhodno zapustijo in ne zaključijo popolnega dozorevanja. Čeprav predstavljajo majhno populacijo, imajo celice DNT pomembno vlogo pri avtoimunskih in neoplastičnih boleznih in sodelujejo pri produkciji citokinov, kot so IL-2, IL-4, IL-A17 in TNF-α (Li in sod., 2021).

Celice DPT pa izražajo tako receptor za CD4 kot CD8. Njihova vloga je slabo opredeljena. Študije na ljudeh in miših poročajo, da se koncentracija poviša pri različnih avtoimunskih obolenjih, revmatoidnem artritisu, novotvorbah in kroničnih vnetnih boleznih (Parel in Chizzolini, 2004; Quandt in sod., 2014; Clenet in sod., 2017). Njihova vloga naj bi bila zelo podobna vlogi celic T pomagalk, vendar pa so celice DPT prav tako sposobne produkcije citokinov, kot sta TNF-α in INF-γ, ter litičnih snovi, kot sta perforin in grancim B (Clenet in sod., 2017).

Koncentracija CRP je bila značilno negativno povezana s preživetjem in pozitivno s koncentracijo cTnI v združeni skupini vseh bolnih psov, kar nakazuje, da je vnetje najverjetneje tesno povezano z večjim obsegom miokardne poškodbe in posledično napredovanjem bolezni. Proti pričakovanjem pa nismo ugotovili povezav med koncentracijo CRP in vnetnimi celicami. Domnevno je to posledica variabilnosti v številu celic med posameznimi pacienti.

Značilna negativna povezava med koncentracijo CRP in preživetjem je opisana pri psih zgolj v izvlečku študije (Domanjko Petrič in sod., 2019), ki je združevala tako pse z MDMZ kot pse z dilatacijsko kardiomiopatijo. C-reaktivni protein kot napovednik hospitalizacije in umrljivost je bil opisan že v več humanih publikacijah (Ostrowska in sod., 2017, Matsumoto in sod., 2019; Lima in sod., 2022; Hartmann in sod., 2024; Zhou in Du, 2025).

Koncentracija NT-proBNP je bila značilno negativno povezana s preživetjem v skupini s stabilnim KSP. Naši rezultati so skladni s prejšnjimi študijami, ki so pokazale močno povezavo koncentracije NT-proBNP in časom preživetja pri psih s KSP (Nemec Svete in sod. 2020; Borgarelli in sod. 2021). Podobno kot pri CRP tudi med NT-proBNP in vnetnimi in imunskimi celicami nismo ugotovili korelacij, najverjetneje zaradi širokega razpona koncentracij NT-proBNP med posameznimi psi. Pri koncentraciji NT-proBNP prihaja do večje individualne biološke variabilnosti pri zdravih psih in tistih z MDMZ (Winter in sod., 2017). Prav tako pri ljudeh s stabilnim popuščanjem srca ugotavljajo, da lahko koncentracija NT-proBNP pri posameznikih v obdobju enega tedna variira tudi do 50 % (O'Hanlon in sod., 2007), na koncentracijo NT-proBNP pa lahko vplivajo tudi starost, spol in ledvična funkcija (Clerico in sod., 2002; Vickery in sod., 2005).

V začetnih stopnjah MDMZ se povečuje diastolični premer levega prekata, kar rezultira v povišanih parametrih sistolične funkcije, kot so sistolično skrajšanje, iztisni delež ter GLS levega prekata. Z napredovanjem bolezni in večjo hemodinamsko obremenitvijo srca ter povečevanjem sistoličnega premera levega prekata se vrednosti teh parametrov znižujejo, kar nakazuje slabšo sistolično funkcijo levega prekata (Zois in sod., 2012).
Pri ljudeh s primarno mitralno regurgitacijo se je predoperativna meritev GLS izkazala kot dober napovedni dejavnik preživetja, pri čimer so bolniki z zmanjšanim GLS imeli slabše preživetje in slabši iztisni delež levega prekata po operaciji mitralne zaklopke (Hiemstra in sod.,

2020; Canessa in sod., 2021). Tudi pri bolnikih s kronično ishemično kardiomiopatijo je bilo ugotovljeno, da je manjša vrednost GLS negativni napovedni dejavnik preživetja (Bertini in sod., 2012).
Podobno kot v humanih študijah so naši rezultati pokazali, da je bil GLS pozitivno povezan s preživetjem v predklinični skupini stabilnega KSP in v skupini vseh bolnikov, medtem ko je bil GLS negativno povezan s preživetjem v skupini z nestabilnim KSP. Značilnih korelacij med GLS in vnetnimi parametri nismo ugotovili.

Glavno omejitev retrospektivne raziskave predstavlja manjše število pacientov v posameznih skupinah. Zaradi majhnega vzorca smo bili omejeni pri uporabi regresijskega Coxovega modela, saj vključitev prevelikega števila spremenljivk pri majhnem številu pacientov ne omogoča zanesljivih rezultatov. Posledično smo izbrali le najbolj relevantne spremenljivke.

Rezultati prospektivne študije so v skladu s preteklimi študijami (Domanjko Petrič in sod., 2018; Druzhaeva in sod., 2021; Nemec Svete in sod., 2021; Brložnik in sod., 2023; Kocaturk in sod., 2024) pokazali značilno višje WBC v skupini nestabilnega KSP, in sicer kot posledica povišane koncentracije nevtrofilnih granulocitov in monocitov. Poleg tega je bil v naši študiji NLR značilno višji v skupini nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično skupino in skupino stabilnega KSP, kar se ujema z ugotovitvami preteklih študij (DeProspero in sod., 2023; Ku in sod., 2022; Kocaturk in sod., 2024).

Psi, vključeni v našo raziskavo, so imeli v fazah KSP značilno višji delež in koncentracijo monocitov v primerjavi s psi s predklinično stopnjo bolezni. O višji koncentraciji monocitov na podlagi hematološke analize so poročale tudi pretekle raziskave na področju KSP tako pri ljudeh (Charach in sod., 2019) kot pri psih (Hamilton-Elliott in sod., 2018; Druzhaeva in sod., 2021; Nemec Svete in sod., 2021; Kocaturk in sod., 2024). Zanimivo je, da so naši rezultati pokazali značilno nižji delež monocitov v predklinični skupini v primerjavi s skupino zdravih. Ta razlika verjetno ni posledica starosti, saj smo s pomočjo regresijskih analiz upoštevali razliko v starosti med skupinami bolnih ter zdravo skupino. Medtem ko večina študij poroča o povečani aktivaciji monocitov v zgodnjih fazah srčno-žilnih bolezni se zmanjšana vrednost monocitov lahko pojavi zaradi migracije v tkivo, imunske izčrpanosti ali vpliva terapije (Libby, 2002; Rogacev in sod., 2012). Polovica psov v predklinični skupini je ob vključitvi v našo študijo že

prejemala pimobendan, vendar neposreden vpliv tega na koncentracijo monocitov doslej še ni bil opisan. V literaturi pa je opisano, da uporaba pimobendana pri mišjem modelu miokarditisa lahko povzroča inhibicijo produkcije vnetnih citokinov, kot so IL-1β, IL-6 in TNF-α (Iwasaki in sod., 1999).

Delež monocitov je bil pri psih z MDMZ v pozitivni povezavi s koncentracijo CRP, NT-proBNP in MCP-1 kot tudi z ehokardiografskim parametrom napredovanja bolezni LAN, kar lahko nakazuje na njihovo vpletenost v napredovanju MDMZ. Monociti so ključni proizvajalci in primarne tarče citokinov (Wrigley in sod., 2011), kjer ima MCP-1 osrednjo vlogo pri njihovi mobilizaciji in migraciji na vnetna mesta (Deshmane in sod., 2009). C-reaktivni protein ta proces še okrepi, saj spodbuja izražanje MCP-1 in s tem infiltracijo monocitov v miokard ter prispeva k napredovanju KSP (Han in sod., 2004).

Pri ljudeh s srčno-žilnimi obolenji se zastopanost deležev monocitnih podvrst razlikuje (Glezeva in sod., 2015; Elchinova in sod., 2018; Williams in sod., 2023). V raziskavi avtorja Amir in sod. (2012) so ugotovili, da imajo ljudje s kroničnim popuščanjem srca višji delež CM in zmanjšan delež NCM, brez sprememb v populaciji IM. Nasprotno pa je druga študija pokazala povišana deleža NCM in IM, kar so pripisali zmanjšanemu deležu CM (Van Craenenbroeck in sod., 2014 in sod., 2014). Tudi raziskava avtorice Elchinove in sod. (2018) je pokazala povečanje deležev IM ter NCM pri bolnikih s kroničnim popuščanjem srca, pri čemer je bila višja koncentracija IM dodatno povezana s slabšo prognozo teh pacientov.
Nasprotno pa rezultati naše študije niso potrdili, da bi se zastopanost monocitnih podvrst razlikovala med preiskovanimi skupinami bolnih in zdravo populacijo psov.

Pri ljudeh s srčno-žilnimi obolenji, kot so miokarditis, ateroskleroza in ishemična bolezen srca, poročajo, da imajo ti pacienti nižji delež celic NK (Ong in sod., 2017).

Celice naravne ubijalke sodelujejo pri uravnavanju vnetnih procesov pri srčno-žilnih obolenjih, med drugim omejujejo infiltracijo miokarda z eozinofilnimi granulociti, kar ima pomembno vlogo pri zaviranju prekomerne fibroze miokarda (Ong in sod., 2015). Manjši delež celic NK pri srčno-žilnih obolenjih bi torej lahko pripomogel k napredovanju bolezni srca.

V nasprotju z rezultati iz humane medicine naši rezultati niso pokazali značilnih razlik v populaciji celic NK med skupinami, kar nakazuje, da celice NK morda niso pomembno vpletene v patofiziologijo MDMZ. Kljub temu pa je Spearmanova korelacijska analiza pokazala značilno pozitivno povezavo celic NK z ehokardiografskimi parametri, kot sta E/A in TRPG, zato samo na podlagi naše študije ne moremo popolnoma izključiti morebitne vloge celic NK v napredovanju bolezni.

Pri ljudeh in miših obstaja raznolikost v izražanju površinskih označevalcev celic NK (Jonges in sod., 2001). Pri psih celice NK še niso natančno opredeljene, saj do danes ni bil identificiran vrstno specifičen označevalec, ki bi zanesljivo ločil populacijo celic NK od ostalih populacij limfocitov (Razmara in sod., 2024). Na podlagi predhodnih študij, ki so preučevale imunofenotipsko označevanje celic NK pri psih (Huang in sod., 2008; Lee in sod., 2018; Gingrich in sod. 2019), smo definirali tri različne populacije potencialnih celic NK: $CD21^{-}CD5^{-}CD3^{-}$ (NK1), $CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{-}$(NK2) in $CD21^{-}CD5^{dim}CD3^{+}$ (NK3). Pri označevanju celične populacije NK3, smo znotraj te zaznali dve ločeni populaciji CD3+CD5+ celic, pri čemer je bila prva CD4-pozitivna, druga pa CD8-pozitivna. To nakazuje, da gre pri tem načinu označevanja najverjetneje za podvrsto limfocitov T in ne celice NK. Na podlagi tega predvidevamo, da populacija celic NK3 najverjetneje predstavlja celice naravne ubijalke T – majhno podvrsto limfocitov T, ki izraža fenotipske značilnosti tako limfocitov T kot celic NK (Wu in Van Kaer, 2011).

Poleg tega so pri ljudeh s kroničnim popuščanjem srca opazili tudi nižje deleže regulacijskih celic T (Tang in sod., 2010; Martins in sod., 2023), kar je bilo povezano z večjim premerom levega prekata v diastoli ter povišanimi koncentracijami NT-proBNP. Slednje nakazuje, da bi lahko nižje vrednosti teh celic bile znak napredovanja srčno-žilnih obolenj (Tang in sod., 2010). Nasprotno pa je ena študija pri psih z MDMZ ugotovila povišane deleže regulacijskih celic T v primerjavi s starostno primerljivo skupino zdravih psov v vseh stopnjah bolezni (ACVIM B1-D), medtem ko v primerjavi s skupino mlajših zdravih psov ni bilo značilnih razlik v deležu regulacijskih celic T (Piantedosi in sod., 2022).

Naši rezultati niso pokazali značilnih razlik v deležu regulacijskih celic T med skupinami bolnih in skupino zdravih psov, kar bi lahko nakazovalo, da regulacijske celice T niso neposredno

vključene v patogenezo MDMZ. Delež regulacijskih celic T je bil kljub temu negativno povezan z ehokardiografskimi parametri napredovanja bolezni, kot sta LVIDsN ter E/A, kar se sklada s humano študijo, ki je ugotovila negativno povezavo med deležem regulacijskih celic T ter premerom levega prekata v diastoli in koncentracijo NT-proBNP (Tang in sod., 2010). Slednje nakazuje, da bi zmanjšana prisotnost regulacijskih celic T lahko predstavljala pomemben dejavnik v procesu napredovanja bolezni srca in razvoju srčnega popuščanja. Zaradi tega ne moremo v celoti izključiti vloge regulacijskih celic T v patogenezi MDMZ in menimo, da so za bolj zanesljive zaključke potrebne nadaljnje raziskave. Razloge, zakaj smo dobili nasprotujoče si ugotovitve v primerjavi s študijo avtorja Piantedosi in sod. (2022), ne vidimo v metodoloških razlikah karakterizacije regulacijskih celic T, saj smo uporabili enako protitelo ter sledili enakemu postopku znotrajceličnega označevanja, temveč morda v drugačni starostni in pasemski sestavi kontrolne skupine v omenjeni študiji v primerjavi z našo populacijo zdravih psov. Približno 90 % psov manjših pasem, starejših od 8 let, ima na podlagi ehokardiografskega pregleda že prisotne začetne znake MDMZ s spremembami na lističih zaklopk ter puščanjem mitralne zaklopke (Borgarelli in sod., 2012), kar pomeni, da je izredno težko najti starejšo zdravo kontrolno populacijo psov podobne mase in velikosti brez prisotnosti bolezni.

Med skupinami smo primerjali tudi delež citotoksičnih celic T ter celic T pomagalk. V članku avtorice Druzhaeva in sod. (2021) so opisali, da imajo psi v fazah KSP povišan delež in koncentracijo citotoksičnih celic T ter znižan delež celic T pomagalk v primerjavi s psi v predklinični fazi. Nasprotno pa so v študiji avtorja Piantedosi in sod. (2022) poročali o višjem deležu celic T pomagalk ter nižjem deležu citotoksičnih celic T pri psih s KSP v primerjavi s starostno primerljivimi zdravimi psi.

V naši študiji smo ugotovili značilno nižji delež aktiviranih celic T pomagalk v skupini stabilnega KSP v primerjavi z vsemi ostalimi skupinami, nismo pa ugotovili razlik v celotnem deležu celic T pomagalk in citotoksičnih celic T ali aktiviranih citotoksičnih celicah T. Razlike med študijami so lahko posledica metodoloških dejavnikov, kot je denimo uporaba različnih protiteles ter razlik med vzorcem živali, vključenih v raziskave.

Obenem smo ugotovili negativno povezavo med celotno populacijo celic T pomagalk in koncentracijama IL-6 ter TNF-α. Aktivirane celice T pomagalke so bile v negativni povezavi s

koncentracijo NT-proBNP in ehokardiografskimi parametrom LA/Ao, kar nakazuje na zmanjšano aktivacijo teh celic z napredovanjem bolezni.

Poleg tega je bila populacija citotoksičnih T celic pozitivno povezana s koncentracijo TNF-α, medtem ko so bile aktivirane citotoksične celice T pozitivno povezane z E/A, kar nakazuje vpletenost citotoksičnih celic v napredovanje bolezni.

Preučili smo tudi populaciji limfocitov DPT in DNT ter ugotovili, da je bil delež celic DNT v predklinični skupini značilno višji v primerjavi z zdravo skupino. Med skupinami pa nismo ugotovili razlik v deležu limfocitov DPT. Te celice so bile doslej opisane le v eni predhodni študiji pri psih z MMVD, vendar pa tam niso ugotovili razlik med skupinami psov (Druzhaeva in sod., 2022).

Dvojno negativni limfociti T predstavljajo majhno populacijo limfocitov T, ki ne izražajo označevalcev za CD4 in CD8, vendar pa še vedno izražajo T celični receptor (Wu in sod., 2022). V humani medicini je znano, da ti limfociti sodelujejo pri različnih kroničnih vnetnih in avtoimunskih obolenjih (Li in sod., 2021; Velikkakam in sod., 2022). Gre za fenotipsko in funkcionalno raznolike populacije celic, ki lahko odvisno od narave bolezni opravljajo imuno regulacijsko funkcijo prek izločanja protivnetnega citokina IL-10 ali pa spodbujajo vnetni proces in prispevajo k nadaljnji poškodbi tkiva (Velikkakam in sod., 2022).

Vloga celic DNT pri psih je bila doslej opisana le v eni študiji, in sicer pri zdravih psih, kjer so ugotovili, da te celice izražajo fenotipske značilnosti celic Th2 z visokim izražanjem mRNA za protivnetne citokine, kot so IL-4, IL-5 ter IL-13 (Protschka in sod., 2024).
Vloga limfocitov DNT pri srčno-žilnih obolenjih še ni bila opisana, razen v primeru Chagasove kardiomiopatije (Giraldo in sod., 2011).

Z izjemo MCP-1 in KC-like se koncentracije ostalih preiskovanih citokinov, kot so IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10 ter TNF-α, v naši študiji niso razlikovale med posameznimi skupinami, kar je najverjetneje posledica velikega deleža vzorcev, katerih koncentracije so bile pod mejo zaznavnosti, torej neizmerljive. Podobne rezultate glede izmerljivosti posameznih citokinov so

predstavili tudi v pretekli študiji, izvedeni na psih z MDMZ, kjer je bila uporabljena enaka analitska metoda za določanje koncentracij citokinov in kemokinov (Zois in sod., 2012).

Naši rezultati so pokazali značilno višjo koncentracijo KC-like pri psih z nestabilnim KSP v primerjavi s predklinično skupino, medtem ko je bila koncentracija MCP-1 značilno višja pri psih z nestabilnim KSP v primerjavi z vsemi ostalimi skupinami.

Višjo koncentracijo MCP-1 pri psih z KSP so potrdili tudi v študiji avtorice Zois in sod. (2012), vendar pa v tej študiji ni bilo značilnih razlik v koncentraciji KC-like med skupinami. Nasprotno so v drugi študiji poročali o značilno višjih koncentracijah KC-like pri psih s KSP ter ob tem ugotovili tudi pozitivno povezanost s koncentracijami cTnI, CRP, haptoglobina feritina, WBC, številom nevtrofilnih granulocitov ter LA/Ao (Rubio in sod, 2020).

Tudi v naši študiji je bila koncentracija KC-like pozitivno povezana s TRPG in koncentracija MCP-1 s koncentracijo NT-proBNP, CRP in deležem monocitov, kar nakazuje na vlogo obeh citokinov v napredovanju MDMZ.

Kljub prizadevanjem za vključitev večjega števila živali so stroga merila za vključitev privedla do izključitve številnih pacientov zaradi sočasnih sistemskih obolenj, rabe antibiotikov ali prisotnosti predklinične MDMZ v primeru vključitve zdravih psov, zato smo morali med študijo izključiti mnoge paciente, pa tudi na videz zdrave pse. Za oceno zanesljivosti rezultatov smo naknadno izvedli analizo statistične moči (‘post-hoc power’ analiza), s katero smo ocenili sposobnost študije za zaznavanje pomembnih učinkov glede na velikost vzorca. Statistično moč smo ocenili za več splošnih linearnih modelov z uporabo opazovanih velikosti učinka (Cohenov f^2). Na podlagi teh izračunov smo ugotovili, da je bila velikost vzorca zadostna za zaznavanje zmernih do velikih učinkov (moč > 0,80), po drugi strani pa bi bil za zaznavanje manjših učinkov ($f^2 < 0,12$) potreben večji vzorec. Čeprav je bila študija učinkovita pri zaznavanju zmernih do velikih učinkov, ostaja majhno število živali v posameznih skupinah omejitev, ki lahko vpliva na možnost zaznave subtilnejših razlik med skupinami.

Ugotovitve naše študije kažejo, da ima imunski sistem pomembno vlogo pri patofiziologiji MDMZ in razvoju popuščanja srca. Naši rezultati so pokazali, da imajo celice T pomagalke

pozitivno napovedno vrednost, medtem ko so bile višje vrednosti citotoksičnih celic T, celic DPT in DNT ter višje koncentracije CRP, cTnI ter NT-proBNP povezane s krajšim časom preživetja psov z MDMZ. Povečana koncentracija ter delež monocitov ter njihova značilna povezava z označevalci napredovanja bolezni in vnetja dodatno potrjujejo njihovo pomembno vlogo pri patofiziologiji MDMZ. Po drugi strani pa na podlagi naših rezultatov nismo uspeli potrditi neposredne vloge regulacijskih celic T, celic NK ter podvrst monocitov pri patogenezi MDMZ. Naše ugotovitve odpirajo možnost za nadaljnje raziskave imunskih mehanizmov in morebitne imunomodulacijske terapevtske pristope za izboljšanje prognoze MDMZ.

6 SKLEPI

1. Višja koncentracija citotoksičnih celic T, celic DPT in DNT ter delež celic DPT predstavljajo negativen napovedni dejavnik psov z MDMZ.
2. Večji delež celic T pomagalk je pozitiven napovedni dejavnik psov z MDMZ.
3. Koncentracija in delež nevtrofilnih granulocitov ter monocitov nista imela vpliva na preživetje psov z MDMZ.
4. Višja koncentracija CRP je negativen napovedni dejavnik psov z MDMZ.
5. Naši rezultati niso potrdili neposredne povezanosti regulacijskih celic T ter celic NK z MDMZ.
6. Monociti so vključeni v napredovanje MDMZ, pri čemer se relativna zastopanost posameznih podvrst ni spreminjala.

7 POVZETEK

Miksomatozna degeneracija mitralne zaklopke (MDMZ) kljub sodobni terapiji ostaja progresivno obolenje z visokim deležem smrtnosti, kar nakazuje, da trenutne smernice zdravljenja ne naslovijo vseh pomembnih patofizioloških mehanizmov, vpletenih v napredovanje bolezni. V zadnjih letih raziskave ugotavljajo pomembno vlogo vnetnega in imunskega odziva pri patofiziologiji MDMZ in kongestivnega srčnega popuščanja (KSP).

Pri psih z MDMZ so ugotovili povečano koncentracijo levkocitov (WBC), predvsem nevtrofilnih granulocitov ter monocitov, kot tudi spremembe v populacijah limfocitov T, vključno s citotoksičnimi celicami T, celicami T pomagalkami ter regulacijskimi celicami T. Poleg tega je opisano, da predstavljajo določeni vnetni označevalci, kot je WBC, napovedni dejavnik pri psih z MDMZ.

Namen študije je bil raziskati vnetni in imunski odziv pri psih z MDMZ v različnih stopnjah bolezni (ACVIM B2-D) ter njun vpliv na preživetje. V retrospektivnem delu študije smo preučevali povezanost koncentracij in deležev celic diferencialne bele krvne slike ter podtipov limfocitov T s preživetjem, medtem ko smo v prospektivnem delu študije primerjali deleže imunskih celic, predvsem populacijo regulacijskih celic T, celic naravnih ubijalk (celic NK) ter monocitov pri psih z MDMZ glede na stopnjo bolezni ter v primerjavi z zdravimi psi. Dodatno smo v obeh delih študije preučili tudi morebitne povezave med deleži imunskih celic ter citokini in kemokini, srčnimi biooznačevalci ter ehokardiografskimi parametri napredovanja bolezni.

Retrospektivno analizo smo izvedli na podatkih 62 lastniških psov z MDMZ, ki so bili predhodno vključeni v klinično študijo, namenjeno proučevanju koncentracij in deležev imunskih celic v periferni krvi, predvsem podvrst limfocitov T. Za oceno potencialnih dejavnikov, ki bi lahko vplivali na preživetje, smo uporabili Coxovo regresijsko analizo sorazmernega tveganja. Poleg tega smo izvedli Spearmanovo korelacijsko analizo, s katero smo raziskali morebitne povezave med imunskimi in vnetnimi celicami in parametri napredovanja bolezni ter označevalci sistemskega vnetja.

V prospektivno študijo smo vključili 64 psov z MDMZ. Razdelili smo jih v tri skupine glede na stopnjo napredovalosti bolezni srca. V kontrolno skupino smo vključili 17 zdravih psov

primerljive mase in starosti. S pretočno citometrijo smo določili deleže skupnih monocitov in njihovih podtipov, celic NK, limfocitov T in njihovih podtipov (celice T pomagalke, citotoksične celice T, regulacijske celice T, dvojno negativne celice T (DNT), dvojno pozitivne celice T (DPT)) in delež limfocitov B. Dodatno smo izmerili koncentracije citokinov in kemokinov (interlevkin (IL) 1β, IL-2, IL-6, IL-10, dejavnik tumorske nekroze α, keratinocitni kemokin, monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1)) ter krvnih biooznačevalcev C-reaktivnega proteina in N–terminalni fragment natriuretičnega pro–peptida tipa B.

Rezultati retrospektivne študije so pokazali, da celice diferencialne bele krvne slike, kot so nevtrofilni granulociti, monociti in limfociti, niso imele napovedne vrednosti pri psih z MDMZ, medtem ko je višja koncentracija citotoksičnih celic T bila povezana s krajšim časom preživetja in delež celic T pomagalk pozitivno s časom preživetja v skupini psov z nestabilnim KSP ter v skupini vseh psov z MDMZ. Ugotovili smo tudi negativno povezavo deleža celic DPT s časom preživetja v predklinični skupini kot tudi negativno povezavo koncentracij celic DPT in DNT s preživetjem v skupini psov z nestabilnim KSP. Rezultati Spearmanove korelacijske analize so pokazali pozitivno povezavo med koncentracijo citotoksičnih celic T ter koncentracijo srčnega troponina I ter ehokardiografskimi parametri napredovalosti bolezni. Nasprotno pa je bil delež celic T pomagalk negativno povezan s koncentracijo srčnega troponina I ter ehokardiografskimi parametri napredovalosti MDMZ.

V prospektivnem delu študije smo ugotovili značilno nižji delež aktiviranih celic T pomagalk v skupini stabilnega KSP v primerjavi z ostalimi skupinami, medtem ko razlik v deležu citotoksičnih celic T ter regulacijskih celicah T ni bilo. Delež monocitov je bil značilno višji v skupini stabilnega in nestabilnega KSP v primerjavi s predklinično skupino, medtem ko razlik v zastopanosti posameznih monocitnih podvrst med skupinami ni bilo. Prav tako ni bilo razlik v populaciji celic NK. S Spearmanovo korelacijsko analizo smo ugotovili negativno povezavo med monocitno podvrsto $CD14^{-}MHC\ II^{+}$ in kemokinom MCP-1 ter pozitivno povezavo med celotno populacijo monocitov in MCP-1. Delež celic T pomagalk je bil negativno povezan s koncentracijami IL-6 ter TNF-α, medtem ko je bil delež citotoksičnih celic T pozitivno povezan s koncentracijo TNF-α.

Rezultati doktorske disertacije potrjujejo pomembno vpletenost imunskega sistema pri napredovanju MDMZ in popuščanju srca. Prikazali smo, da imajo celice T pomagalke pozitivno napovedno vrednost, medtem ko so bile citotoksične celice T, celice DPT in DNT negativno povezane s časom preživetja psov z MDMZ. Monociti so se pokazali kot pomembna celična populacija pri napredovanju MDMZ, kljub temu pa nismo dokazali razlik v zastopanosti podvrst monocitov z napredovanjem bolezni kot tudi ne v primerjavi z zdravo populacijo psov. Neposredne vpletenosti regulacijskih celic T in celic NK pri razvoju MDMZ z našo raziskavo nismo dokazali.

8 SUMMARY

Despite contemporary therapy, myxomatous mitral valve degeneration (MMVD) remains a progressive disease with high mortality, indicating that current treatment guidelines do not address all the important pathophysiological mechanisms involved in the disease progression. In recent years, research has identified an important role of the inflammatory and immune responses in the pathophysiology of MMVD and congestive heart failure (CHF).

Dogs with MMVD have been found to have increased concentrations of leukocytes (WBC), particularly neutrophil granulocytes and monocytes, as well as changes in T lymphocyte populations, including cytotoxic T cells, T helper cells, and regulatory T cells. In addition, certain inflammatory markers such as WBC have been described as negative prognostic factors in dogs with MMVD.

The aim of the study was to investigate the inflammatory and immune response in dogs with MMVD at different stages of the disease (ACVIM B2-D) and their impact on survival. In the retrospective part of the study, we examined the relationship between the concentrations and proportions of cells included in the white blood cell differential count and T lymphocyte subtypes and survival, while in the prospective part of the study, we compared the proportions of immune cells, particularly the populations of regulatory T cells, natural killer (NK) cells, and monocytes in dogs with MMVD according to disease stage and in comparison with healthy dogs. In addition, in both parts of the study, we also examined possible associations between immune cell proportions and cytokines and chemokines, cardiac biomarkers, and echocardiographic parameters of disease progression.

We performed a retrospective analysis of data from 62 privately owned dogs with MMVD that had previously been included in a clinical study designed to investigate the concentrations and proportions of peripheral immune cells, particularly T lymphocyte subtypes. Cox proportional hazards regression analysis was used to assess potential factors that could influence survival. In addition, we performed Spearman's correlation analysis to investigate possible associations between immune and inflammatory cells and disease progression parameters and biomarkers of systemic inflammation.

We included 64 dogs with MMVD in the prospective study, divided into three groups according to the stage of MMVD progression. The control group included 17 healthy dogs of comparable weight and age. Flow cytometry was used to determine the proportions of total monocytes and their subtypes, NK cells, T lymphocytes and their subtypes (T helper cells, cytotoxic T cells, regulatory T cells, double-negative T cells (DNT), double-positive T cells (DPT)) and the proportion of B lymphocytes. In addition, we measured the concentrations of cytokines and chemokines (interleukin (IL) 1β, IL-2, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor α, keratinocyte chemotactic-like, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)) and blood biomarkers C-reactive protein and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide.

The results of the retrospective study showed that cells included in the white blood cell differential count such as neutrophil granulocytes, monocytes, and lymphocytes had no predictive value in dogs with MMVD, while higher concentrations of cytotoxic T cells were associated with shorter survival time and the proportion of helper T cells was positively associated with survival in the group of dogs with unstable CHF as well as in the group of all dogs with MMVD. We also found a negative association between the proportion of DPT cells and survival time in the preclinical group, as well as a negative association between DPT and DNT cell concentrations and survival in the group of dogs with unstable CHF. The results of Spearman's correlation analysis showed a positive correlation between cytotoxic T cell concentration and cardiac troponin I concentration and echocardiographic parameters of disease progression. In contrast, the proportion of T helper cells was negatively associated with cardiac troponin I concentration and echocardiographic parameters of MMVD progression.

In the prospective part of the study, we found a significantly lower proportion of activated T helper cells in the stable CHF group compared to the other groups, while there were no differences in the proportion of cytotoxic T cells and regulatory T cells. The proportion of monocytes was significantly higher in the stable and unstable CHF groups compared to the preclinical group, while there were no differences in the individual monocyte subtypes between the groups. There were also no differences in the population of NK cells. Spearman's correlation analysis revealed a negative correlation between the $CD14^{-}MHC\ II^{+}$ monocyte subtype and MCP-1 and a positive correlation between the total monocyte population and MCP-1. The

proportion of T helper cells was negatively correlated with IL-6 and TNF-α concentrations, while the proportion of cytotoxic T cells was positively correlated with TNF-α concentration.

The results of the doctoral thesis confirm the importantance of the immune system involvement in the progression of MMVD and heart failure. We showed that T helper cells have a positive predictive value, while cytotoxic T cells, DPT, and DNT cells have a negative predictive value. Monocytes have shown to be an important cell population in the progression of MMVD, but we didn't find any differences in the monocyte subtypes with disease progression or compared to healthy dogs. Our study did not demonstrate the direct involvement of regulatory T cells and NK cells in MMVD progression.

9 ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Aleksandri Domanjko Petrič za mentoriranje doktorske naloge, pomoč pri zasnovi raziskovalne ideje ter vso usmerjanje in strokovno podporo, ki ste mi jo namenili v času doktorskega študija.

Posebna zahvala somentorici prof. dr. Alenki Nemec Svete za predano strokovno in osebno podporo. Vaša potrpežljivost, razumevanje in čas, predvsem pa spodbudne besede, ki ste mi jih namenili v zadnjih štirih letih, so mi veliko pomenili. Hvala, da ste mi v težkih trenutkih pomagali ohranjati zaupanje v delo in usmerjenost k cilju.

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki so pripomogli k nastanku doktorata, predvsem pa ekipi Medicinske fakultete, Sari Petek, Mihu Bajcu, Katki Pohar in prof. dr. Alojzu Ihanu, ki so me toplo sprejeli medse in omogočili izvedbo pretočne citometrije. Zahvaljujem se dr. Branetu Krtu, dr. Urošu Krapežu ter ekipi izr. prof. dr. Sergeja Pirkmajerja za skrbne meritve citokinov in C-reaktivnega proteina. Posebna zahvala gre Aleksandru Jenku za pomoč pri pripravi vzorcev ter krvnih preiskavah. Iskreno se zahvaljujem tudi Anžetu Bašu in doc. dr. Meliti Hajdinjak za pomoč pri izvedbi statističnih analiz in pripravi grafov. Zahvala tudi Luku Milčinskemu za računalniško podporo in pomoč pri oblikovanju doktorata.

Lepo se zahvaljujem predsedniku komisije prof. dr. Robertu Frangežu za vso podporo, neprecenljive napotke in usmerjanje tekom celotnega študija. Iskreno se zahvaljujem tudi članoma komisije, prof. dr. Mojci Narat in izr. prof. dr. Marinu Tortiju, katerih predlogi so pomembno pripomogli k izboljšanju disertacije.

Hvala sodelavcem diagnostične enote, dr. Maji Brložnik, dr. Martini Krofič Žel, Renati Šušnjari, Roku Korljanu, Mojci Juvan, Vesni Bartolj, Viki Ivčević, Ulli Urški Kočevar, Nini Vozelj in Tini Gazibarić, ki so mi priskočili na pomoč, kadar sem jo potrebovala. Posebej sem hvaležna za vse pogovore in trenutke smeha, ki smo si jih delili tekom let.

Zahvaljujem se lekt. dr. Mateji Gaber za lektoriranje doktorske naloge ter osebju knjižnice Veterinarske fakultete za skrben pregled literature.

Nenazadnje se iskreno zahvaljujem svoji družini in prijateljem, ki so me skozi leta podpirali in spodbujali, vedno imeli pravo besedo v težkih trenutkih ter ne glede na vse verjeli, da mi bo uspelo.

10 LITERATURA

1. Borgarelli M, Haggstrom J. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2010; 40(4): 651– 63.
doi: 10.1016/j.cvsm.2010.03.008
2. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, et al. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. J Vet Intern Med 2019; 33(3): 1127– 40.
doi: 10.1111/jvim.15488
3. Schwinger RHG. Pathophysiology of heart failure. Cardiovasc Diagn Ther 2021; 11(1): 263–76.
doi: 10.21037/cdt-20-302
4. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 2000; 86(5): 494–501.
doi: 10.1161/01.res.86.5.494
5. Suzuki H, Motley ED, Frank GD, Utsunomiya H, Eguchi S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents 2005; 3(4): 305–22.
doi: 10.2174/156801605774322355
6. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. Mol Endocrinol 2006; 20(5): 953–70.
doi: 10.1210/me.2004-0536
7. Nemec Svete A, Verk B, Čebulj-Kadunc N, Salobir J, Rezar V, Domanjko Petrič A. Inflammation and its association with oxidative stress in dogs with heart failure. BMC Vet Res 2021; 17(1): 176.
doi: 10.1186/s12917-021-02878-x
8. Piantedosi D, Musco N, Palatucci AT, et al. Pro-inflammatory and immunological profile of dogs with myxomatous mitral valve disease. Vet Sci 2022; 9(7): 326.
doi: 10.3390/vetsci9070326

9. Zois NE, Moesgaard SG, Kjelgaard-Hansen M, et al. Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease. Vet J 2012; 192(1): 106–11.
doi: 10.1016/j.tvjl.2011.05.009
10. Rubio CP, Saril A, Kocaturk M, et al. Changes of inflammatory and oxidative stress biomarkers in dogs with different stages of heart failure. BMC Vet Res 2020; 16(1): 433.
doi: 10.1186/s12917-020-02650-7
11. Domanjko Petrič A, Lukman T, Verk B, et al. Systemic inflammation in dogs with advanced-stage heart failure. Acta Vet Scand 2018; 60(1): 20.
doi: 10.1186/s13028-018-0372-x
12. Hamilton-Elliott J, Ambrose E, Christley R, Dukes-McEwan J. White blood cell differentials in dogs with congestive heart failure (CHF) in comparison to those in dogs without cardiac disease. J Small Anim Pract 2018; 59(6): 364–72.
doi: 10.1111/jsap.12809
13. Kocaturk M, Saril A, Oz AD, Rubio CP, Ceron JJ, Yilmaz Z. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and red blood cell distribution width to platelet ratio and their relationships with inflammatory and antioxidant status in dogs with different stages of heart failure due to myxomatous mitral valve disease. Vet Res Commun 2024; 48(4): 2477–87.
doi: 10.1007/s11259-024-10431-y
14. Amir O, Spivak I, Lavi I, et al. Changes in the monocytic subsets CD14(dim)CD16(+) and CD14(++)CD16(-) in chronic systolic heart failure patients. Mediators Inflamm 2012; 2012(1): 616384.
doi: 10.1155/2012/616384
15. Van Craenenbroeck AH, Van Ackeren K, Hoymans VY, et al. Acute exercise-induced response of monocyte subtypes in chronic heart and renal failure. Mediators Inflamm 2014; 2014(1): 216534.
doi: 10.1155/2014/216534
16. Elchinova E, Teubel I, Roura S, et al. Circulating monocyte subsets and heart failure prognosis. PLoS One 2018; 13(9): e0204074.
doi: 10.1371/journal.pone.0204074

17. Druzhaeva N, Nemec Svete A, Ihan A, Pohar K, Domanjko Petrič A. Peripheral blood lymphocyte subtypes in dogs with different stages of myxomatous mitral valve disease. J Vet Intern Med 2021; 35(5): 2112–22.
doi: 10.1111/jvim.16207
18. Tang TT, Ding YJ, Liao YH, et al. Defective circulating CD4CD25+Foxp3+CD127(low) regulatory T-cells in patients with chronic heart failure. Cell Physiol Biochem 2010; 25(4/5): 451–8.
doi: 10.1159/000303050
19. Martins S, António N, Carvalheiro T, et al. Reduced numbers of regulatory T cells in chronic heart failure seems not to be restored by cardiac resynchronization therapy. BMC Cardiovasc Disord 2023; 23(1): 89.
doi: 10.1186/s12872-023-03109-x
20. Hak Ł, Myśliwska J, Więckiewicz J, et al. NK cell compartment in patients with coronary heart disease. Immun Ageing 2007; 4: 3.
doi: 10.1186/1742-4933-4-3
21. 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(2): 157–63.
doi: 10.5603/KP.a2016.0147
22. Matsumoto H, Kasai T, Sato A, et al. Association between C-reactive protein levels at hospital admission and long-term mortality in patients with acute decompensated heart failure. Heart Vessels 2019; 34(12): 1961–8.
doi: 10.1007/s00380-019-01435-9
23. Lima PC, Rios DM, de Oliveira FP, et al. Inflammation as a prognostic marker in heart failure. Cureus 2022; 14(8): e28605.
doi: 10.7759/cureus.28605
24. Hartmann C, Albrecht R, Westphal JG, et al. Survival in patients with chronic congestive heart failure and correlation of presence of risk factors and all-cause mortality. Eur Heart J 2024; 45 (Suppl. 1): ehae666.937.
doi: 10.1093/eurheartj/ehae666.937

25. Zhou M, Du X. Inflammation-driven prognosis in advanced heart failure: a machine learning-based risk prediction model for one-year mortality. J Inflamm Res 2025; 18: 5047–60.
doi: 10.2147/JIR.S514192

26. Tang Y, Zeng X, Feng Y, et al. Association of systemic immune-inflammation index with short-term mortality of congestive heart failure: a retrospective cohort study. Front Cardiovasc Med 2021; 8: 753133.
doi: 10.3389/fcvm.2021.753133

27. Brložnik M, Pečjak A, Nemec Svete A, Domanjko Petrič A. Selected hematological, biochemical, and echocardiographic variables as predictors of survival in canine patients with myxomatous mitral valve disease and congestive heart failure. J Vet Cardiol 2023; 46: 18–29.
doi: 10.1016/j.jvc.2023.03.001

28. Cho JH, Cho HJ, Lee HY, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in patients with acute heart failure predicts in-hospital and long-term mortality. J Clin Med 2020; 9(2): 557.
doi: 10.3390/jcm9020557

29. Delcea C, Adrian Buzea C, Dobrev D, Andrei Dan G. Prognostic roles of neutrophil-lymphocyte, monocyte-lymphocyte and platelet-lymphocyte ratios for long-term all-cause mortality in heart failure. Int J Cardiol Heart Vasc 2024; 54: 101502.
doi: 10.1016/j.ijcha.2024.101502

30. Jung MJ, Kim JH. Prognostic efficacy of complete blood count indices for assessing the presence and the progression of myxomatous mitral valve disease in dogs. Animals (Basel) 2023; 13(18): 2821.
doi: 10.3390/ani13182821

31. Ku D, Chae Y, Kim C, et al. Severity of myxomatous mitral valve disease in dogs may be predicted using neutrophil-to-lymphocyte and monocyte-to-lymphocyte ratio. Am J Vet Res 2023; 84(6): 1–9.
doi: 10.2460/ajvr.23.01.0012

32. DeProspero DJ, Hess RS, Silverstein DC. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is increased in dogs with acute congestive heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease compared to both dogs with heart murmurs and healthy controls. J Am Vet Med Assoc 2023; 261(11): 1–8.

doi: 10.2460/javma.23.03.0131

33. Fox PR. Pathology of myxomatous mitral valve disease in the dog. J Vet Cardiol 2012; 14(1): 103–26.
doi: 10.1016/j.jvc.2012.02.001

34. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, et al. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. J Vet Intern Med 2008; 22(1): 120–8.
doi: 10.1111/j.1939-1676.2007.0008.x

35. Chanmongkolpanit K, Riengvirodkij N, Channgam P, et al. How accurate are NT-proBNP, ANP, and cTnI levels in diagnosing dogs with myxomatous mitral valve disease? Open Vet J 2024; 14(6): 1426–41.
doi: 10.5455/OVJ.2024.v14.i6.10

36. Panagopoulou V, Deftereos S, Kossyvakis C, et al. NTproBNP: an important biomarker in cardiac diseases. Curr Top Med Chem 2013; 13(2): 82–94.
doi: 10.2174/1568026611313020002

37. Langhorn R, Willesen JL. Cardiac troponins in dogs and cats. J Vet Intern Med 2016; 30(1): 36–50.
doi: 10.1111/jvim.13801

38. Li G, He W, Wang DW. Immune cell dynamics in heart failure: implicated mechanisms and therapeutic targets. ESC Heart Fail 2025; 12(3): 1739–58.
doi: 10.1002/ehf2.15238

39. Frantz S, Falcao-Pires I, Balligand JL, et al. The innate immune system in chronic cardiomyopathy: a European Society of Cardiology (ESC) scientific statement from the Working Group on Myocardial Function of the ESC. Eur J Heart Fail 2018; 20(3): 445–59.
doi: 10.1002/ejhf.1138

40. Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. Circ Res 2011; 108(9): 1133–45.
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226936

41. Brown JM, Hazen SL. Microbial modulation of cardiovascular disease. Nat Rev Microbiol 2018; 16(3): 171–81.
doi: 10.1038/nrmicro.2017.149

42. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun 2009; 388(4): 621–5.
doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.062
43. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. Circ Res 2016; 119(1): 91–112.
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
44. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. Nat Rev Immunol 2018; 18(12): 733–44.
doi: 10.1038/s41577-018-0065-8
45. Álvarez-Zaballos S, Martínez-Sellés M. Angiotensin-converting enzyme and heart failure. Front Biosci 2023; 28(7): 150.
doi: 10.31083/j.fbl2807150
46. He BJ, Anderson ME. Aldosterone and cardiovascular disease: the heart of the matter. Trends Endocrinol Metab 2013; 24(1): 21–30.
doi: 10.1016/j.tem.2012.09.004
47. Xanthakis V, Vasan RS. Aldosterone and the risk of hypertension. Curr Hypertens Rep 2013; 15(2): 102–7.
doi: 10.1007/s11906-013-0330-y
48. Mirzoyev Z, Anavekar NS, Chen HH. Renal and humoral pathophysiological actions of angiotensin II in congestive heart failure. Timely Top Med Cardiovasc Dis 2005; 9: E9.
49. 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.
doi: 10.1007/BF02938356
50. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood 2011; 117(14): 3720–32.
doi: 10.1182/blood-2010-07-273417
51. Liu SJ, Zhou W, Kennedy RH. Suppression of beta-adrenergic responsiveness of L-type $Ca2^{+}$ current by IL-1beta in rat ventricular myocytes. Am J Physiol 1999; 276(1): H141–8.
doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.1.H141

52. Combes A, Frye CS, Lemster BH, et al. Chronic exposure to interleukin 1β induces a delayed and reversible alteration in excitation-contraction coupling of cultured cardiomyocytes. Pflugers Arch 2002; 445(2): 246–56.
doi: 10.1007/s00424-002-0921-y

53. Tatsumi T, Matoba S, Kawahara A, et al. Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. J Am Coll Cardiol 2000; 35(5): 1338–46.
doi: 10.1016/s0735-1097(00)00526-x

54. Kalogeropoulos A, Georgiopoulou V, Psaty BM, et al. Inflammatory markers and incident heart failure risk in older adults: the Health ABC (Health, Aging, and Body Composition) study. J Am Coll Cardiol 2010; 55(19): 2129–37.
doi: 10.1016/j.jacc.2009.12.045

55. Chia YC, Kieneker LM, van Hassel G, et al. Interleukin 6 and development of heart failure with preserved ejection fraction in the general population. J Am Heart Assoc 2021; 10(11): e018549.
doi: 10.1161/JAHA.120.018549

56. Wu CK, Lee JK, Chiang FT, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-α and interleukin-6 are associated with diastolic heart failure through downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase. Crit Care Med 2011; 39(5): 984–92.
doi: 10.1097/CCM.0b013e31820a91b9

57. 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.
doi: 10.1016/0735-1097(95)00589-7

58. Raymond RJ, Dehmer GJ, Theoharides TC, Deliargyris EN. Elevated interleukin-6 levels in patients with asymptomatic left ventricular systolic dysfunction. Am Heart J 2001; 141(3): 435–8.
doi: 10.1067/mhj.2001.113078

59. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res 2009; 29(6): 313–26.
doi: 10.1089/jir.2008.0027

60. Karlsson I, Hagman R, Johannisson A, Wang L, Södersten F, Wernersson S. Multiplex cytokine analyses in dogs with pyometra suggest involvement of KC-like chemokine in canine bacterial sepsis. Vet Immunol Immunopathol 2016; 170: 41–6.
doi: 10.1016/j.vetimm.2016.01.005

61. Horckmans M, Ring L, Duchene J, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. Eur Heart J 2017; 38(3): 187–97.
doi: 10.1093/eurheartj/ehw002

62. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes Infect 2003; 5(14): 1317–27.
doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.008

63. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. Blood 2009; 114(21): 4613–23.
doi: 10.1182/blood-2009-06-221630

64. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, et al. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. PLoS Pathog 2015; 11(3): e1004651.
doi: 10.1371/journal.ppat.1004651

65. Franck G, Mawson TL, Folco EJ, et al. Roles of PAD4 and NETosis in experimental atherosclerosis and arterial injury: implications for superficial erosion. Circ Res 2018; 123(1): 33–42.
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312494

66. Perdomo J, Leung HHL, Ahmadi Z, et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. Nat Commun 2019; 10(1): 1322.
doi: 10.1038/s41467-019-09160-7

67. Antipenko S, Mayfield N, Jinno M, et al. Neutrophils are indispensable for adverse cardiac remodeling in heart failure. J Mol Cell Cardiol 2024; 189: 1–11.
doi: 10.1016/j.yjmcc.2024.02.005

68. Wrigley BJ, Lip GY, Shantsila E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. Eur J Heart Fail 2011; 13(11): 1161–71.
doi: 10.1093/eurjhf/hfr122

69. Sraeyes S, Pham DH, Gee TW, Hua J, Butcher JT. Monocytes and macrophages in heart valves: uninvited guests or critical performers? Curr Opin Biomed Eng 2018; 5: 82–9.
doi: 10.1016/j.cobme.2018.02.003

70. Shantsila E, Lip GY. Monocyte diversity in myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2009; 54(2): 139–42.
doi: 10.1016/j.jacc.2009.03.047

71. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood 2010; 116(16): e74–80.
doi: 10.1182/blood-2010-02-258558

72. Shantsila E, Wrigley B, Tapp L, et al. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. J Thromb Haemost 2011; 9(5): 1056–66.
doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04244.x

73. Gibbons N, Goulart MR, Chang YM, et al. Phenotypic heterogeneity of peripheral monocytes in healthy dogs. Vet Immunol Immunopathol 2017; 190: 26–30.
doi: 10.1016/j.vetimm.2017.06.007

74. Rzepecka A, Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Cywińska A, Winnicka A. CD4 and MHCII phenotypic variability of peripheral blood monocytes in dogs. PLoS One 2019; 14(7): e0219214.
doi: 10.1371/journal.pone.0219214

75. Oh ES, Na M, Rogers CJ. The association between monocyte subsets and cardiometabolic disorders/cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. Front Cardiovasc Med 2021; 8: 640124.
doi: 10.3389/fcvm.2021.640124

76. Goonewardena SN, Stein AB, Tsuchida RE, Rattan R, Shah D, Hummel SL. Monocyte subsets and inflammatory cytokines in acute decompensated heart failure. J Card Fail 2016; 22(5): 358–65.
doi: 10.1016/j.cardfail.2015.12.014

77. Tapp LD, Shantsila E, Wrigley BJ, Pamukcu B, Lip GY. The CD14++CD16+ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. J Thromb Haemost 2012; 10(7): 1231–41.

doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04603.x

78. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. Signal Transduct Target Ther 2023(1); 8: 235.
doi: 10.1038/s41392-023-01471-y

79. Martín P, Sánchez-Madrid F. T cells in cardiac health and disease. J Clin Invest 2025; 135(2): e185218.
doi: 10.1172/JCI185218

80. Nevers T, Salvador AM, Grodecki-Pena A, et al. Left ventricular T-cell recruitment contributes to the pathogenesis of heart failure. Circ Heart Fail 2015; 8(4): 776–87.
doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002225

81. Blanton RM, Carrillo-Salinas FJ, Alcaide P. T-cell recruitment to the heart: friendly guests or unwelcome visitors? Am J Physiol Heart Circ Physiol 2019; 317(1): H124–H140.
doi: 10.1152/ajpheart.00028.2019

82. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. Nature 2000; 407 (6806): 916–20.
doi: 10.1038/35038103

83. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? Nat Rev Immunol 2010; 10(4): 225–35.
doi: 10.1038/nri2735

84. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. Annu Rev Immunol 2009; 27: 485–517.
doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710

85. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. FASEB J 2012; 26(6): 2253–76.
doi: 10.1096/fj.11-193672

86. Bansal SS, Ismahil MA, Goel M, et al. Activated T lymphocytes are essential drivers of pathological remodeling in ischemic heart failure. Circ Heart Fail 2017; 10(3): e003688.
doi: 10. 1161/ CIRCH EARTF AILURE. 116. 003688

87. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T cells: differentiation and function. Cancer Immunol Res 2016; 4(9): 721–5.

doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0193

88. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced regulatory T cells: their development, stability, and applications. Trends Immunol 2016; 37(11): 803–11.

doi: 10.1016/j.it.2016.08.012

89. Turner JA, Stephen-Victor E, Wang S, et al. Regulatory T cell-derived TGF-b1 controls multiple checkpoints governing allergy and autoimmunity. Immunity 2020; 53(6): 1202–14.

doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.002

90. Kuan R, Agrawal DK, Thankam FG. Treg cells in atherosclerosis. Mol Biol Rep 2021; 48(5): 4897–910.

doi: 10.1007/s11033-021-06483-x

91. Sawant DV, Yano H, Chikina M, et al. Adaptive plasticity of IL-10(+) and IL-35(+) T(reg) cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. Nat Immunol 2019; 20(6): 724–35.

doi: 10.1038/s41590-019-0346-9

92. Shao Y, Yang WY, Saaoud F, et al. IL-35 promotes CD4+Foxp3+ Tregs and inhibits atherosclerosis via maintaining CCR5-amplified Treg suppressive mechanisms. JCI Insight 2021; 6(19): e152511.

doi: 10.1172/jci.insight.152511

93. Harris F, Berdugo YA, Tree T. IL-2-based approaches to Treg enhancement. Clin Exp Immunol 2023; 211(2): 149–63.

doi: 10.1093/cei/uxac105

94. Xiao J, Yu K, Li M, Xiong C, Wei Y, Zeng Q. The IL-2/Anti-IL-2 complex attenuates cardiac ischaemia-reperfusion injury through expansion of regulatory T cells. Cell Physiol Biochem 2017; 44(5): 1810–27.

doi: 10.1159/000485818

95. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. J Invest Dermatol 2006; 126(1): 32–41.

doi: 10.1038/sj.jid.5700001

96. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology. 5th ed. New York: Garland Science, 2001: 22–4

97. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. Curr Opin Immunol 2003; 15(5): 533–43.

doi: 10.1016/s0952-7915(03)00107-9

98. Santos-Zas I, Lemarié J, Zlatanova I, et al. Cytotoxic CD8+ T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling. Nat Commun 2021; 12(1): 1483.

doi: 10. 1038/s41467- 021- 21737-9

99. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, et al. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. J Mol Cell Cardiol 2000; 32(12): 2141–9.

doi: 10.1006/jmcc.2000.1261

100. Zhang L, Wang Z, Wang D, Zhu J, Wang Y. CD8+CD28+ T cells might mediate injury of cardiomyocytes in acute myocardial infarction. Mol Immunol 2018; 101: 74–9.

doi: 10.1016/j.molimm.2018.05.015

101. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? J Leukoc Biol 2015; 97(1): 31–8.

doi: 10.1189/jlb.1RU0814-382

102. Protschka M, Di Placido D, Moore PF, Büttner M, Alber G, Eschke M . Canine peripheral non-conventional TCRαβ+ CD4-CD8α- double-negative T cells show T helper 2-like and regulatory properties. Front Immunol 2024; 15: 1400550.

doi: 10.3389/fimmu.2024.1400550

103. Giraldo NA, Bolaños NI, Cuellar A, et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(8): e1294.

doi: 10.1371/journal.pntd.0001294

104. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery: a systemic review. Acta Trop 2010; 115(1/2): 5–13.

doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.008

105. Li H, Tsokos GC. Double-negative T cells in autoimmune diseases. Curr Opin Rheumatol 2021; 33(2): 163–72.

doi: 10.1097/BOR.0000000000000778

106. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer. Front Immunol 2022; 13: 816005.

doi: 10.3389/fimmu.2022.816005

107. Finkelman FD, Hogan SP, Hershey GK, Rothenberg ME, Wills-Karp M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. J Immunol 2010; 184(4): 1663–74.

doi: 10.4049/jimmunol.0902185

108. Ringler SS, Krakowka S. Cell surface markers of the canine natural killer (NK) cell. Vet Immunol Immunopathol 1985; 9(1): 1–11.

doi:10.1016/0165- 2427(85)90125-4

109. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol 2008; 9(5): 503–10.

doi: 10.1038/ni1582

110. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. Blood 2010; 115(11): 2167–76.

doi: 10.1182/blood-2009-08-238469

111. Razmara AM, Gingrich AA, Toedebusch CM, et al. Improved characterization and translation of NK cells for canine immunotherapy. Front Vet Sci 2024; 11: 1336158.
doi: 10.3389/fvets.2024.1336158

112. Huang YC, Hung SW, Jan TR, et al. CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. J Leukoc Biol 2008; 84(6): 1501–10.

doi: 10.1189/jlb.0408255

113. Shin DJ, Park JY, Jang YY, et al. Ex vivo expansion of canine cytotoxic large granular lymphocytes exhibiting characteristics of natural killer cells. Vet Immunol Immunopathol 2013; 153(3/4): 249–59.

doi: 10.1016/j.vetimm.2013.03.006

114. Kim S, Iizuka K, Kang HS, et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. Nat Immunol 2002; 3(6): 523–8.

doi: 10.1038/ni796

115. Freud AG, Yu J, Caligiuri MA. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. Semin Immunol 2014; 26(2): 132–7.

doi: 10.1016/j.smim.2014.02.008

116. Jonasson L, Backteman K, Ernerudh J. Loss of natural killer cell activity in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis 2005; 183(2): 316–21.

doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.011

117. Borgarelli M, Buchanan JW. Historical review, epidemiology and natural history of degenerative mitral valve disease. J Vet Cardiol 2012; 14(19): 93–101.

doi: 10.1016/j.jvc.2012.01.011

118. Olsen LH, Fredholm M, Pedersen HD. Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds. J Vet Intern Med 1999; 13(5): 448–56.

doi: 10.1892/0891-6640(1999)013<0448:eaiomv>2.3.co;2

119. Nemec Svete A, Verk B, Jazbec Križman P, Druzhaeva N, Bohanec N, Domanjko Petrič A. Blood variables associated with survival in canine congestive heart failure patients. Bulg J Vet Med 2020; 23(2): 257–61.

doi: 10.15547/bjvm.2019-0003

120. Olsen LH, Mow T, Koch J, Pedersen HD. Heart rate variability in young, clinically healthy Dachshunds: Influence of sex, mitral valve prolapse status, sampling period and time of day. J Vet Cardiol 1999; 1(2): 7–16.

doi: 10.1016/S1760-2734(06)70029-7

121. Haggstrom J, Kvart C, Hansson K. Heart sounds and murmurs: Changes related to severity of chronic valvular disease in the Cavalier King Charles Spaniel. J Vet Intern Med 1995; 9(2): 75–85.

doi: 10.1111/j.1939-1676.1995.tb03276.x

122. Olsen LH, Martinussen T, Pedersen HD. Early echocardiographic predictors of myxomatous mitral valve disease in dachshunds. Vet Rec 2003; 152(10): 293–7.

doi: 10.1136/vr.152.10.293

123. Domanjko Petrič A, Verk B, Manevski D, Nemec Svete, A. Inflammatory and oxidative stress markers are associated with survival in canine cardiovascular patients. In: 29. ECVIM-CA Congress. München: European College of Veterinary Internal Medicine Companion Animals, 2019: 95.

124. Visser LC, Ciccozzi MM, Sintov DJ, Sharpe AN. Echocardiographic quantitation of left heart size and function in 122 healthy dogs: a prospective study proposing reference intervals and assessing repeatability. J Vet Intern Med 2019; 33(5): 1909–20.

doi: 10.1111/jvim.15562

125. Klein JP, Moeschberger ML. Survival analysis: techniques for censored and truncated data. 2nd ed. New York: Springer, 2003.

126. Collett D. Modelling survival data in medical research. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.

127. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: appropriate use and interpretation. Anesth Analg 2018; 126(5): 1763–8.

doi: 10.1213/ANE.0000000000002864

128. Lee L. NADA: Nondetects and data analysis for environmental data: version 1.6-1.1. Berkeley: rOpenSci, 2025. https://cran.r-universe.dev/NADA (22. 4. 2025).

129. Helsel D. Statistics for Censored Environmental Data Using Minitab and R. John Wiley & Sons, Inc, 2012.
doi: 10.1002/9781118162729

130. Ommenn SR, Hodge DO, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Thomson SP, Gibbons RJ . Predictive power of the relative lymphocyte concentration in patients with advanced heart failure. Circulation 1998; 97(1): 19–22.

doi: 10.1161/01.cir.97.1.19

131. Majmundar M, Kansara T, Park H ,et al. Absolute lymphocyte count as a predictor of mortality and readmission in heart failure hospitalization. Int J Cardiol Heart Vasc 2022; 39: 100981.

doi: 10.1016/j.ijcha.2022.100981

132. Al-Ahmad RS, Mahafzah AM, Al-Mousa EN. Immunological changes in acute myocardial infarction. Saudi Med J 2004; 25(7): 923–8.

133. Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. J Vet Intern Med 2004; 18(6): 831–9.

doi: 10.1892/0891-6640(2004)18<831:ctcidw>2.0.co;2

134. Ilatovskaya DV, Pitts C, Clayton J, et al. CD8+ T-cells negatively regulate inflammation post-myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2019; 317(3): H581–H596.

doi: 10.1152/ajpheart.00112.2019

135. Laroumanie F, Douin-Echinard V, Pozzo J, et al. CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. Circulation 2014; 129(21): 2111–24.

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007101

136. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. Circulation 2012; 125(13): 1652–63.

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044164

137. Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. Autoimmun Rev 2004; 3(3): 215–20.

doi: 10.1016/j.autrev.2003.09.001

138. Quandt D, Rothe K, Scholz R, et al. Peripheral CD4CD8 double positive T cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis. PLoS One 2014; 9(3): e93293.

doi: 10.1371/journal.pone.0093293

139. Clénet ML, Gagnon F, Moratalla AC, Viel EC, Arbour N. Peripheral human CD4+CD8+ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. Sci Rep 2017; 7(1): 11612.

doi: 10.1038/s41598-017-11926-2

140. Borgarelli M, Ferasin L, Lamb K, et al. The predictive value of clinical, radiographic, echocardiographic variables and cardiac biomarkers for assessing risk of the onset of heart failure or cardiac death in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease enrolled in the DELAY study. J Vet Cardiol 2021; 36: 77–88.

doi: 10.1016/j.jvc.2021.04.009

141. Winter RL, Saunders AB, Gordon SG, Buch JS, Miller MW. Biologic variability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in healthy dogs and dogs with myxomatous mitral valve disease. J Vet Cardiol 2017; 19(2): 124–31.

doi: 10.1016/j.jvc.2016.11.001

142. O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, et al. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. J Card Fail 2007; 13(1): 50–5.

doi: 10.1016/j.cardfail.2006.09.003

143. Clerico A, Del Ry S, Maffei S, Prontera C, Emdin M, Giannessi D. The circulating levels of cardiac natriuretic hormones in healthy adults: effects of age and sex. Clin Chem Lab Med 2002; 40(4): 371–7.

doi: 10.1515/CCLM.2002.060

144. Vickery S, Price CP, John RI, et al. B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy. Am J Kidney Dis 2005; 46(4): 610–20.

doi: 10.1053/j.ajkd.2005.06.017

145. Zois NE, Tidholm A, Nägga KM, et al. Radial and longitudinal strain and strain rate assessed by speckle-tracking echocardiography in dogs with myxomatous mitral valve disease. J Vet Intern Med 2012; 26(6): 1309–19.

doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.01017.x

146. Hiemstra YL, Tomsic A, van Wijngaarden SE, et al. Prognostic value of global longitudinal strain and etiology after surgery for primary mitral regurgitation. JACC Cardiovasc Imaging 2020; 13(2Pt 2): 577–85.

doi: 10.1016/j.jcmg.2019.03.024

147. Canessa M, Thamman R, Americo C, Soca G, Dayan V. Global longitudinal strain predicts survival and left ventricular function after mitral valve surgery: a meta-analysis. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2021; 33(2): 337–42.

doi: 10.1053/j.semtcvs.2020.09.024

148. Bertini M, Ng AC, Antoni ML, et al. Global longitudinal strain predicts long-term survival in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. Circ Cardiovasc Imaging 2012; 5(3): 383–91.

doi: 10.1161/CIRCIMAGING.111.970434

149. Charach G, Rogowski O, Karniel E, Charach L, Grosskopf I, Novikov I. Monocytes may be favorable biomarker and predictor of long-term outcome in patients with chronic heart failure: a cohort study. Medicine (Baltimore) 2019; 98(38): e17108.

doi: 10.1097/MD.0000000000017108

150. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature 2002; 420(6917): 868–74.

doi: 10.1038/nature01323

151. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, et al. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. J Am Coll Cardiol 2012; 60(16): 1512–20.

doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019

152. Iwasaki A, Matsumori A, Yamada T, et al. Pimobendan inhibits the production of proinflammatory cytokines and gene expression of inducible nitric oxide synthase in a murine model of viral myocarditis. J Am Coll Cardiol 1999; 33(5): 1400–7.

doi: 10.1016/s0735-1097(98)00692-5

153. Han KH, Hong KH, Park JH, et al. C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1--mediated chemotaxis through upregulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes. Circulation 2004; 109(21): 2566–71.

doi: 10.1161/01.CIR.0000131160.94926.6E

154. Glezeva N, Horgan S, Baugh JA. Monocyte and macrophage subsets along the continuum to heart failure: misguided heroes or targetable villains? J Mol Cell Cardiol 2015; 89(Pt B): 136–45.

doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.029

155. Williams H, Mack C, Baraz R, et al. Monocyte differentiation and heterogeneity: inter-subset and interindividual differences. Int J Mol Sci 2023; 24(10): 8757.

doi: 10.3390/ijms24108757

156. Ong S, Rose NR, Čiháková D. Natural killer cells in inflammatory heart disease. Clin Immunol 2017; 175: 26–33.

doi: 10.1016/j.clim.2016.11.010

157. Ong S, Ligons DL, Barin JG, et al. Natural killer cells limit cardiac inflammation and fibrosis by halting eosinophil infiltration. Am J Pathol 2015; 185(3): 847–61.

doi: 10.1016/j.ajpath.2014.11.023

158. Jonges LE, Albertsson P, van Vlierberghe RL, et al. The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood. Scand J Immunol 2001; 53(2): 103–10.

doi: 10.1046/j.1365-3083.2001.00838.x

159. Lee SH, Shin DJ, Kim Y, et al. Comparison of phenotypic and functional characteristics between canine non-b, non-t natural killer lymphocytes and CD3+CD5dimCD21- cytotoxic large granular lymphocytes. Front Immunol 2018; 9: 841.

doi: 10.3389/fimmu.2018.00841

160. Gingrich AA, Modiano JF, Canter RJ. Characterization and potential applications of dog natural killer cells in cancer immunotherapy. J Clin Med 2019; 8(11): 1802.

doi: 10.3390/jcm8111802

161. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells in health and disease. Front Biosci (Schol Ed) 2011; 3(1): 236–51.

doi: 10.2741/s148

162. Velikkakam T, Gollob KJ, Dutra WO. Double-negative T cells: setting the stage for disease control or progression. Immunology 2022; 165(4): 371–85.

doi: 10.1111/imm.13441

11 NAČRT RAVNANJA RAZISKOVALNIH PODATKOV (NRRP)

11.1 Obrazec NRRP – končna različica

Ime in priimek doktoranda/doktorandke: Martina Cimerman

Doktorski program in področje: Biomedicina, veterinarska medicina

Naslov doktorske disertacije: Vnetni in imunski odziv pri psih z miksomatozno degeneracijo mitralne zaklopke

Tip podatkov in metode njihovega zbiranja in/ali ustvarjanja

1. Katere podatke ste zbirali oziroma pridobivali in/ali ustvarjali?

V raziskavi smo zbirali osnovne podatke o psih (starost, pasma, spol, klinični status, režim zdravljenja), opravili kardiološke preglede (ehokardiografija, elektrokardiografija) ter laboratorijske analize krvi (diferencialna bela krvna slika, biokemija). S pretočno citometrijo smo določili deleže imunskih celic, dodatno pa smo merili koncentracije vnetnega markerja C-reaktivnega proteina (CRP), markerja napredovanja bolezni srca – N-terminalnega fragmenta pro-B natriuretičnega peptida (NT-proBNP) ter citokinov (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, MCP-1, KC-like).

2. Na kakšen način ste zbirali oziroma pridobivali in/ali ustvarjali nove podatke in kako ste uporabljali že obstoječe za potrebe vaše doktorske disertacije?

Podatke smo zbirali s kliničnim pregledom živali, odvzemom anamneze s pomočjo vprašalnika in kardiološkim pregledom. V okviru preiskav smo odvzeli vzorce krvi in jih analizirali z uporabo hematološkega in biokemijskega analizatorja, pretočnega citometra ter metodo multipleksnega imunskega testa za določanje koncentracij citokinov. Za določanje koncentracije C-reaktivnega proteina in N-terminalnega fragmenta pro-B natriuretičnega peptida smo uporabili ELISA test.

3. Ali ste delali z občutljivimi podatki? Če da, kako ste poskrbeli za etično pridobivanje in/ali ustvarjanje podatkov?

Ne.

Način hranjenja in zaščita podatkov med raziskovalnim delom za doktorsko disertacijo

1. Na kakšen način ste hranili podatke?

Podatki so hranjeni v fizični obliki kot tudi v elektronski obliki (Excel).

1. Če ste delali z občutljivimi podatki, kako ste skrbeli za njihovo varovanje in zaščito?

/

Dolgotrajna dostopnost in hranjenje podatkov

1. Kje oziroma v katerem podatkovnem repozitoriju boste hranili podatke na dolgi rok po zaključku raziskovalnega dela in omogočili njihovo dostopnost v skladu z zahtevo 50. člena Pravilnika o doktorskem študiju UL?

V repozitoriju Univerze v Ljubljani.

2. Ali načrtujete za določen čas omejiti dostop do podatkov? Če da, pojasnite razloge (npr. zaradi zaščite intelektualne lastnine ali patenta, ali navedite drug razlog).

Ne.

11.2 Dostopnost do raziskovalnih podatkov doktorske raziskave

CIMERMAN, Martina, 2025, Vnetni in imunski odziv pri psih z miksomatozno degeneracijo mitralne zaklopke : raziskovalni podatki, obravnavani v doktorskem delu [na spletu]. Zaključena znanstvena zbirka raziskovalnih podatkov. 2025. [Dostopano 6 november 2025]. Pridobljeno s: https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=175628. Trajni identifikator (PID): 20.500.12556/RUL-175628.

12 PRILOGE

12.1 Priloga 1: Izviren znanstveni članek s področja doktorske disertacije

Cimerman *et al. BMC Veterinary Research* (2024) 20:431
https://doi.org/10.1186/s12917-024-04266-7

BMC Veterinary Research

RESEARCH Open Access

Inflammatory and immune variables as predictors of survival in dogs with myxomatous mitral valve disease

Martina Cimerman[1], Natalia Druzhaeva[1], Alenka Nemec Svete[1], Melita Hajdinjak[2], Katka Pohar[3], Alojz Ihan[3] and Aleksandra Domanjko Petrič[1*]

Abstract

Background We aimed to investigate the association between selected inflammatory and immune variables and survival of dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD). We evaluated data of 62 client-owned dogs with MMVD, grouped into preclinical, stable congestive heart failure (CHF) and unstable CHF. Univariate Cox proportional hazards regression analysis was used to quantify the association of white blood cell count, concentrations and percentages of T lymphocytes and their subtypes (T helper lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, double positive T lymphocytes, double negative T lymphocytes) and B lymphocytes with survival. *P* values < 0.1 in individual groups and *P* values < 0.05 in the group of all patients were considered significant. Spearman correlation coefficients between significant covariates were calculated to assess the relationships among variables and with survival.

Results In the preclinical group, percentage of double positive T lymphocytes was negatively associated with survival (hazard ratio (HR) = 2.328; *P* = 0.051). In the unstable CHF, T lymphocyte (HR = 1.613; *P* = 0.085), cytotoxic T lymphocyte (HR = 1.562; *P* = 0.048), double positive (HR = 1.751; *P* = 0.042), and double negative T lymphocyte (HR = 1.613; *P* = 0.096) concentrations were negatively associated with survival, as well as cytotoxic T lymphocyte (HR = 1.502; *P* = 0.007) concentration in the group of all patients. The percentage of T helper lymphocytes was positively associated with survival in the unstable CHF (HR = 0.604; *P* = 0.053) and in the group of all patients (HR = 0.733; *P* = 0.044).

The concentration of cytotoxic T lymphocytes positively correlated with left atrial to aortic ratio (LA/Ao) (rho = 0.259, *P* = 0.037), and peak velocity of early diastolic mitral flow (rho = 0.259, *P* = 0.039), whereas the percentage of T helper lymphocytes negatively correlated with left atrial to aortic ratio (LA/Ao) (rho = -0.212, *P* = 0.090) and early to late mitral flow ratio (rho = -0.232, *P* = 0.072).

Conclusions Cytotoxic T lymphocytes, T helper lymphocytes, double positive and double negative T lymphocytes as well as biomarkers cardiac troponin I, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, C-reactive protein are implicated in the progression of MMVD.

Keywords Canine, CD4 T helper lymphocytes, CD8 cytotoxic T lymphocytes, Cox proportional hazards model, DPT double positive T lymphocytes, DNT double negative T lymphocytes, MMVD

*Correspondence:
Aleksandra Domanjko Petrič
aleksandra.domanjko@vf.uni-lj.si
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/.

Background

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) accounts for approximately 75% of acquired heart disease in dogs [1], with 30% of cases progressing to congestive heart failure (CHF) [2]. Several known pathophysiological mechanisms are involved in the development and progression of the disease, including the immune system [3, 4]. In dogs with MMVD, an increase in the total white blood cell count (WBC) was observed with an increase in neutrophil granulocyte and monocyte levels in the peripheral blood, especially in the advanced stage of the disease [4, 5]. In addition, a recent study found a higher proportion of cytotoxic T lymphocytes (CD3 + CD8 +) and a lower proportion of T helper lymphocytes (CD3 + CD4 +) in dogs with advanced stages of MMVD. The presence of double positive T lymphocytes (DPT) and double negative T lymphocytes (DNT) was reported for the first time in dogs with MMVD in the same study [6]. T lymphocytes react to myocardial antigens and lead to an inflammatory process through direct cytotoxicity and cytokine production, resulting in impaired cardiac function, damage to cardiac tissue, leading to cardiac fibrosis and ultimately heart failure [7]. In murine models, cytotoxic T lymphocytes have been found to recognize and kill normal cardiomyocytes by activating the Perforin/Granzyme pathway or activating death receptor molecules of the tumor necrosis factor receptor family, leading to a spread of damage and promoting further inflammation [8, 9]. In contrast, CD3 + CD4 + lymphocytes help to regulate the immune response and suppress excessive inflammation to prevent further damage to cardiac tissue [10]. The role of DNT and DPT lymphocytes in heart disease and heart failure is not well understood. Normally, they are known to play a role in autoimmune diseases and cancer [11, 12].

Inflammatory markers may be predictors of survival in heart failure, as higher levels of C-reactive protein (CRP) have been associated with worse outcome in people with heart failure [13, 14]. While some studies have reported the association of WBC and survival in dogs with heart failure [15–17], there are no published studies to date examining the association between lymphocytes of different subtypes (CD3 + CD4 +, CD3 + CD8 +, DPT, DNT) and survival in dogs with MMVD. In addition, there is currently no publication regarding the association of systolic function measured by global longitudinal strain (GLS) in dogs with MMVD with survival and the possible association of GLS with inflammatory and immune variables.

The aim of our study was to investigate the association of inflammatory and immune cells, in particular concentrations and percentages of T lymphocyte (CD3+) subtypes (CD3 + CD4 +, CD3 + CD8 +, DPT, DNT) with survival in dogs with MMVD. In addition, we investigated correlations between selected inflammatory and immune variables and echocardiographic parameters.

Results

In this retrospective study, we included 62 dogs with MMVD that were categorized into three groups according to the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) classification [1]: preclinical stage (ACVIM B2; 19), stable CHF (ACVIM C; 24), unstable CHF (ACVIM C and D; 19), comprising 24 females (38.7%) and 38 males (61.3%). At the time of the telephone interview, 12 patients (63.2%) in the ACVIM B2 group were still alive and 7 (36.8%) had died. Of these, 5 (71.4%) died or were euthanized due to heart failure. In the stable CHF group, 6 patients (25%) were still alive and 18 (75%) had died. Of these, 15 (83.3%) died or were euthanized due to heart failure. In the unstable CHF group, only 1 patient (5.3%) remained alive at the time of the telephone interview and 18 (94.7%) patients were dead, of those 17 (94.4%) died or were euthanized due to heart failure. Other causes of death or euthanasia were neoplastic disease (4), pyometra (1) and urethral obstruction (1). The mean age (± standard deviation) of dogs in different stages of MMVD was as follows: preclinical dogs – 10.0 ± 2.1 years (minimum (MIN)-maximum (MAX): 6.0 – 14.2 years), stable CHF – 11.0 ± 1.9 years (MIN–MAX: 7.6 – 14.3 years), unstable CHF – 10.7 ± 1.6 years (MIN–MAX: 7.4 – 13.5 years), and all patients together – 10.36 ± 1.92 years (MIN–MAX: 6.0 – 14.3 years). The median weight of dogs in the respective groups was as follows: preclinical dogs – 7.60 kg (MIN–MAX: 3.0 – 16.8 kg), stable CHF – 7.70 kg (MIN–MAX: 4.4 – 33.0 kg), unstable CHF – 7.60 kg (MIN–MAX: 2.4 – 44.7 kg), and all patients together – 7.60 kg (MIN–MAX: 2.4 – 44.7 kg). Dog breeds included in the study were: Cavalier King Charles Spaniel (13), mix breed dogs (12), Chihuahua (5), Pekingese (4), Maltese (3), Poodle (3), Tibetan Terrier (3), Yorkshire Terrier (3), English Cocker Spaniel (2), Shi Tzu (2), Whippet (2), American Pit Bull Terrier (1), Airedale Terrier (1), Chinese Crested Dog (1), Coton de Tulear (1), Dachshund (1), German Shepherd (1), Italian Greyhound (1), Japanese Chin (1), Pomeranian (1), Staffordshire Terrier (1). Univariate Cox proportional hazard regression models were constructed and tested for each covariate separately for each group (preclinical, stable CHF, unstable CHF) and for all patients. Covariates with either a P value of the Spearman-ρ statistic (with survival time) or the univariate Cox P value or the likelihood ratio P value < 0.1 were potentially linearly associated with log survival time. The results of the univariate Cox proportional hazards regression analysis are shown in Table 1 (preclinical group),

Table 1 Results of univariate Cox proportional hazards regression analysis, preclinical group

Parameter	N	Spearman's ρ statistic	Spearman's ρ statistic *P* value	PH-assumption *P* value	Likelihood-ratio *P* value	Cox HR exp(coef)	Cox HR 95% CI	Cox *P* value
Age (months)*	19	-0.469	0.043	0.61	0.002	3.849	1.539, 9.627	0.004
BCS	18	-0.019	0.941	0.53	0.9	0.973	0.492, 1.923	0.936
Heart rate	19	0.064	0.796	0.25	0.5	0.789	0.398, 1.564	0.497
Murmur	19	-0.193	0.430	0.07	0.4	1.396	0.646, 3.015	0.396
Sex	19	0.165	0.499	0.12	0.6	1.212	0.599, 2.453	0.593
Therapy	19	0.231	0.342	0.23	0.6	0.821	0.382, 1.764	0.612
Weight (kg)	19	0.206	0.397	0.59	0.8	0.898	0.426, 1.893	0.777
LA/Ao	19	-0.013	0.957	0.46	0.6	0.834	0.413, 1.684	0.613
LVIDd	19	-0.068	0.783	0.51	0.9	0.952	0.426, 2.129	0.905
LVIDdN	19	-0.165	0.498	0.56	0.8	0.925	0.428, 1.998	0.843
A (m/s)	19	-0.002	0.994	0.87	0.6	0.829	0.382, 1.799	0.636
E (m/s)+	19	-0.396	0.093	0.76	0.3	1.486	0.709, 3.114	0.295
E/A+	19	-0.442	0.058	0.25	0.1	1.713	0.878, 3.342	0.114
TR PG (mmHg)	14	-0.359	0.208	0.99	0.3	1.457	0.731, 2.905	0.285
CRP (mg/L)	19	0.026	0.920	0.07	0.8	1.087	0.481, 2.454	0.841
cTnI (ug/L)	19	-0.011	0.966	0.59	0.2	1.500	0.789, 2.851	0.216
NT proBNP (pmol/L)	19	-0.302	0.209	0.88	0.2	1.665	0.886, 3.129	0.113
WBC	19	0.314	0.190	0.14	0.2	0.549	0.231, 1.305	0.174
Neutrophil (%)	19	0.357	0.134	0.92	0.6	0.840	0.434, 1.629	0.606
Neutrophil (x 10^9/L)+	19	0.402	0.089	0.17	0.1	0.496	0.180, 1.362	0.173
Monocyte (%)	19	-0.101	0.681	0.23	0.8	1.099	0.543, 2.224	0.793
Monocyte (x 10^9/L)	19	0.149	0.541	0.10	0.7	0.836	0.365, 1.915	0.671
Total lymphocyte (%)	19	-0.349	0.143	0.51	0.2	1.591	0.740, 3.42	0.234
Total lymphocyte (x 10^9/L)	19	-0.086	0.726	0.73	1	0.999	0.473, 2.111	0.998
NLR	19	0.351	0.141	0.78	0.2	0.561	0.230, 1.368	0.204
CD3 + (%)	19	0.161	0.511	0.75	0.7	1.148	0.520, 2.534	0.733
CD3 + (x 10^9/L)	19	0.014	0.957	0.63	1	1.004	0.493, 2.045	0.992
CD3 + CD4 + (%)	19	-0.207	0.394	0.08	0.7	1.172	0.471, 2.917	0.734
CD3 + CD4 + (x 10^9/L)	19	-0.105	0.668	0.27	0.7	1.148	0.564, 2.338	0.703
CD3 + CD8 + (%)	19	0.175	0.471	0.05	0.9	1.065	0.474, 2.39	0.879
CD3 + CD8 + (x 10^9/L)	19	0.174	0.475	0.35	0.8	0.918	0.436, 1.931	0.822
CD4/CD8	19	-0.188	0.440	0.06	0.2	1.922	0.774, 4.774	0.159
DPT (%)*	19	-0.457	0.049	0.85	0.04	2.328	0.996, 5.444	0.051
DPT (x 10^9/L)	19	-0.361	0.129	0.59	0.4	1.339	0.715, 2.507	0.362
DNT (%)	19	0.276	0.252	0.50	0.2	0.523	0.193, 1.416	0.202
DNT (x 10^9/L)	19	0.142	0.560	0.45	0.5	0.766	0.324, 1.813	0.545
CD45 + CD21 + (%)+	19	-0.404	0.086	0.84	0.4	1.352	0.749, 2.439	0.317
CD45 + CD21 + (x 10^9/L)	19	-0.275	0.253	0.95	0.3	1.445	0.739, 2.826	0.282
GLS aplax (%)*	19	0.414	0.078	0.06	0.03	0.444	0.213, 0.928	0.031
GLS 4-ch (%)*	19	0.737	0.000	0.55	0.004	0.367	0.184, 0.734	0.005
GLS 2-ch (%)	19	0.219	0.369	0.11	0.4	0.734	0.369, 1.462	0.379
GLS Avg (%)*	19	0.553	0.016	0.82	0.004	0.216	0.061, 0.768	0.018

* Covariate with Cox *P* value < 0.1 and PH-assumption *P* value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

+ Covariates with Spearman's ρ statistic *P* value < 0.1, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

Legend: *A* Peak velocity of late diastolic mitral flow, *BCS* Body condition score, *CD3 +* Total T lymphocytes, *CD3 + CD4 +* T helper lymphocytes, *CD3 + CD8 +* Cytotoxic T lymphocytes, *CD4/CD8* T helper lymphocytes to cytotoxic T lymphocytes ratio, *CD45 + CD21 +* B lymphocytes, *cTnI* Cardiac troponin I, *CRP* C-reactive protein, *E* Peak velocity of early diastolic mitral flow, *E/A* Early to late mitral flow ratio, *DPT* Double negative T lymphocytes, *DNT* Double negative T lymphocytes, *GLS Aplax* Global longitudinal strain in aplax view, *GLS Avg* Average global longitudinal strain, *GLS 4-ch* Global longitudinal strain in four chamber view, *GLS 2-ch* Global longitudinal strain in two chamber view, *HR* Hazard ratio, *LA/Ao* Left atrial to aortic ratio, *LVIDd* Left ventricular end-diastolic diameter, *LVIDdN* Indexed left ventricular internal end-diastolic diameter, *N* Number of dogs, *NLR* Neutrophil to lymphocyte ratio, *NT-proBNP* N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, *PH* Proportional hazard, *TR PG* Tricuspid regurgitation derived pressure gradient, *WBC* White blood cell count

Table 2 Results of univariate Cox proportional hazards regression analysis, stable CHF group

Parameter	N	Spearman's ρ statistic	Spearman's ρ statistic *P* value	PH-assumption *P* value	Likelihood-ratio *P* value	Cox HR exp(coef)	Cox HR 95% CI	Cox *P* value
Age (months)*	24	-0.440	0.032	0.04	0.2	1.438	0.847, 2.440	0.178
BCS*	20	0.346	0.135	0.83	0.07	0.588	0.327, 1.057	0.076
Heart rate*	24	-0.369	0.076	0.50	0.05	1.705	1.003, 2.897	0.049
Murmur	23	0.071	0.749	0.30	0.5	0.825	0.501, 1.359	0.450
Sex*	24	-0.536	0.007	0.04	0.02	1.796	1.121, 2.878	0.015
Therapy	23	-0.207	0.344	0.63	0.1	1.559	0.843, 2.882	0.157
Weight (kg)	24	0.030	0.889	0.67	0.8	1.063	0.667, 1.694	0.798
LA/Ao	23	-0.270	0.212	0.85	0.2	1.478	0.777, 2.811	0.234
LVIDd	23	0.021	0.925	0.26	0.8	1.066	0.592, 1.921	0.832
LVIDdN	23	-0.077	0.726	0.11	0.6	1.172	0.595, 2.309	0.646
A (m/s)	22	0.214	0.338	0.04	0.7	0.892	0.534, 1.490	0.663
E (m/s)	23	0.242	0.267	0.13	0.3	0.756	0.440, 1.311	0.323
E/A	22	-0.022	0.924	0.34	0.5	0.786	0.385, 1.606	0.510
TR PG (mmHg)	21	-0.063	0.786	0.47	0.7	1.120	0.626, 2.003	0.704
CRP (mg/L)	24	-0.220	0.300	0.45	0.4	0.832	0.530, 1.306	0.424
cTnI (ug/L)*	24	-0.278	0.187	0.95	0.1	1.592	0.979, 2.588	0.061
NT-proBNP (pmol/L)*	24	-0.253	0.232	0.28	0.04	1.887	1.067, 3.337	0.029
WBC	24	0.296	0.168	0.30	0.4	0.816	0.531, 1.253	0.352
Neutrophil (%)	24	0.094	0.661	0.58	0.4	0.828	0.524, 1.308	0.418
Neutrophil ($\times 10^9$/L)	24	0.270	0.201	0.46	0.3	0.793	0.516, 1.219	0.291
Monocyte (%)	24	-0.146	0.495	0.64	0.7	1.097	0.700, 1.719	0.687
Monocyte ($\times 10^9$/L)	24	0.070	0.746	0.86	0.7	0.909	0.564, 1.466	0.696
Total lymphocyte (%)	24	-0.140	0.513	0.64	0.3	1.306	0.799, 2.134	0.287
Total lymphocyte ($\times 10^9$/L)	24	-0.112	0.601	0.54	0.8	1.069	0.712, 1.605	0.748
NLR	24	0.126	0.556	0.73	0.4	0.807	0.496, 1.313	0.387
CD3 + (%)	24	-0.164	0.441	0.99	0.4	1.228	0.780, 1.933	0.376
CD3 + ($\times 10^9$/L)	24	-0.309	0.142	0.68	0.2	1.459	0.871, 2.444	0.151
CD3 + CD4 + (%)	24	0.117	0.586	0.89	0.5	0.845	0.520, 1.372	0.495
CD3 + CD4 + ($\times 10^9$/L)	24	-0.188	0.378	0.96	0.4	1.280	0.762, 2.147	0.351
CD3 + CD8 + (%)	24	-0.110	0.609	0.65	0.7	1.108	0.712, 1.725	0.650
CD3 + CD8 + ($\times 10^9$/L)	24	-0.145	0.497	0.32	0.3	1.289	0.812, 2.048	0.282
CD4/CD8	24	0.103	0.632	0.52	0.9	0.949	0.523, 1.720	0.863
DPT (%)	24	0.011	0.961	0.43	1.0	1.001	0.589, 1.702	0.996
DPT ($\times 10^9$/L)	24	-0.189	0.376	0.44	0.2	1.481	0.826, 2.654	0.188
DNT (%)	24	-0.130	0.546	0.72	0.9	1.039	0.679, 1.588	0.861
DNT ($\times 10^9$/L)*	24	-0.375	0.072	0.84	0.3	1.257	0.829, 1.906	0.281
CD45 + CD21 + (%)	24	-0.146	0.496	0.08	0.7	1.112	0.684, 1.806	0.669
CD45 + CD21 + ($\times 10^9$/L)	24	-0.106	0.621	0.94	0.9	1.014	0.685, 1.500	0.946
GLS aplax (%)*	15	0.307	0.265	0.71	0.06	0.457	0.195, 1.069	0.071
GLS 4-ch (%)	16	0.229	0.391	0.86	0.5	0.756	0.363, 1.575	0.455
GLS 2-ch (%)*	15	0.511	0.054	0.93	0.05	0.480	0.221, 1.041	0.063
GLS Avg (%)*	16	0.341	0.196	0.60	0.04	0.391	0.151, 1.013	0.053

* Covariate with Cox *P* value < 0.1 and PH-assumption *P* value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

* Covariates with Spearman's ρ statistic *P* value < 0.1, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

Legend: *A* Peak velocity of late diastolic mitral flow, *BCS* Body condition score, *CD3 +* Total T lymphocytes, *CD3 + CD4 +* T helper lymphocytes, *CD3 + CD8 +* Cytotoxic T lymphocytes, *CD4/CD8* T helper lymphocytes to cytotoxic T lymphocytes ratio, *CD45 + CD21 +* B lymphocytes, *cTnI* Cardiac troponin I, *CRP* C-reactive protein, *E* Peak velocity of early diastolic mitral flow, *E/A* Early to late mitral flow ratio, *DPT* Double negative T lymphocytes, *DNT* Double negative T lymphocytes, *GLS aplax* Global longitudinal strain in aplax view, *GLS Avg* Average global longitudinal strain, *GLS 4-ch* Global longitudinal strain in four chamber view, *GLS 2-ch* Global longitudinal strain in two chamber view, *HR* Hazard ratio, *LA/Ao* Left atrial to aortic ratio, *LVIDd* Left ventricular end-diastolic diameter, *LVIDdN* Indexed left ventricular internal end-diastolic diameter, *N* number of dogs, *NLR* Neutrophil to lymphocyte ratio, *NT-proBNP* N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, *PH* Proportional hazard, *TR PG* Tricuspid regurgitation derived pressure gradient, *WBC* White blood cell count

Table 2 (stable CHF group), Table 3 (unstable CHF group), and Table 4 (all patients).

The hazard ratio may be zero despite the statistical significance (small *P* value) of the corresponding covariate. This can arise from large differences in the units of the (non-normalized) covariates and survival time, so our interpretation was primarily based on the P values. This is explained in more detail in the description of the statistical analyses.

The Kaplan–Meier survival curves for the three groups of patients (preclinical, stable CHF, and unstable CHF) are presented in Fig. 1. Every event of interest (death) during the study period is represented by a vertical curve drop. The plotted survival curves, along with the calculated log-rank test *P* value, which is less than 0.0001, clearly confirm the expected outcome, namely that the three groups of patients differ significantly in the probability of death at any given time point. For instance, the Kaplan–Meier curves in Fig. 1 indicate that the probability of surviving 750 days, which is about 25 months, is 89.5% for the preclinical group (17 out of 19 patients), only 50.0% for the stable CHF group (12 out of 24 patients), and merely 15.8% for the unstable CHF group (3 out of 19 patients).

Age was negatively associated with survival in the preclinical group and when all patients were considered as a group.

Total white blood cell count, as well as relative and absolute counts of neutrophils, monocytes, and total lymphocytes, showed no significant association with survival in any group. Similarly, B lymphocytes (CD45 + CD21 +) were not associated with survival in any group.

The concentration of CD3 + lymphocytes was significantly negatively associated with survival in the unstable CHF group (Table 3), whereas no significant association was found in the other groups. The concentration of CD3 + CD8 + lymphocytes was significantly negatively associated with survival, with a higher concentration of CD3 + CD8 + lymphocytes increasing the risk of death by 56.2% (HR = 1.562; 95% CI = 1.003, 2.433; $P = 0.048$) in dogs with unstable CHF and by 50.2% (HR = 1.502; 95% CI = 1.116, 2.022; $P = 0.007$) in the group of all patients (Table 4). In contrast, CD3 + CD4 + lymphocyte percentage was significantly positively associated with survival in both the unstable CHF group and in the group of all patients. In the unstable CHF group, a higher percentage of CD3 + CD4 + lymphocytes reduced the risk of death by 39.6% (HR = 0.604; 95% CI = 0.363, 1.006; $P = 0.053$). In the group of all patients, a higher percentage of CD3 + CD4 + reduced the risk of death by 26.7% (HR = 0.733; 95% CI = 0.542, 0.991; $P = 0.044$).

The percentage of DPT was significantly negatively associated with survival in the preclinical group (Table 1), with higher proportion of DPT lymphocytes increasing the risk of death by 132.8% (HR = 2.328; 95% CI = 0.996, 5.444; $P = 0.051$). In addition, both DPT and DNT lymphocyte concentrations were significantly negatively associated with survival in the unstable CHF group (Table 3), with a higher DPT concentration increasing the risk of death by 75.1% (HR = 1.751; 95% CI = 1.021, 3.003; $P = 0.042$) and a higher DNT concentration increasing the risk of death by 61.3% (HR = 1.613; 95% CI = 0.918, 2.834; $P = 0.096$).

A significant association between cardiac troponin I (cTnI) concentration and increased risk of death was observed in patients with MMVD, with higher cTnI concentration significantly increasing the risk of death in the stable CHF group (Table 2), unstable CHF group (Table 3), as well as in the group of all patients (Table 4). N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) concentration showed a significant negative association with survival only in the stable CHF group. C-reactive protein concentration also had a significant negative association with survival in the all patients group.

Echocardiographic parameters such as left atrial to aortic ratio (LA/Ao), left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd), indexed left ventricular internal diameter at end-diastole (LVIDdN), peak velocity of early diastolic mitral flow (E), and early to late mitral flow ratio (E/A) were all significantly negatively associated with survival in the group of all patients (Table 4), whereas E/A and LVIDd were also significantly negatively associated with survival in the unstable CHF group (Table 3).

Global longitudinal strain in aplax view (GLS aplax) and GLS in four chamber view (GLS 4-ch), as well as average GLS (GLS Avg), were significantly positively associated with survival in the preclinical group (Table 1). Similarly, in the group of stable CHF patients (Table 2), GLS aplax, GLS in two chamber view (GLS 2-ch), and GLS Avg were significantly positively associated with survival. Furthermore, in the group of all patients (Table 4), GLS aplax, GLS 4-ch, GLS-2-ch, and GLS Avg were also significantly positively associated with survival. Conversely, GLS 2-ch and GLS Avg were significantly negatively associated with survival in patients with unstable CHF (Table 3). Descriptive statistics of measured parameters are presented in supplementary Table 1.

Spearman's rank correlation coefficients (rho) between significant covariates were calculated to assess the relationships among variables in all groups. However, due to the sample size, we only report the Spearman's rank correlation coefficients in the group of all patients, as shown in Fig. 2. The analysis showed that age weakly positively correlated with cTnI (rho = 0.307, $P = 0.012$) and CD3 + CD8 + lymphocyte concentrations (rho = 0.254,

Table 3 Results of univariate Cox proportional hazards regression analysis, unstable CHF group

Parameter	N	Spearman's ρ statistic	Spearman's ρ statistic *P* value	PH-assumption *P* value	Likelihood-ratio *P* value	Cox HR exp(coef)	Cox HR 95% CI	Cox *P* value
Age (months)*	19	-0.429	0.067	0.016	0.2	1.488	0.807, 2.743	0.203
BCS*	16	0.539	0.031	0.047	0.1	0.627	0.355, 1.106	0.107
Heart rate	19	-0.210	0.388	0.37	0.5	1.215	0.724, 2.038	0.462
Murmur	19	-0.326	0.173	0.71	0.1	1.572	0.863, 2.862	0.139
Sex	19	0.000	1.000	0.74	0.8	0.955	0.593, 1.537	0.850
Therapy*	19	-0.407	0.084	0.18	0.2	1.303	0.829, 2.047	0.251
Weight (kg)*	19	0.131	0.594	0.29	0.1	1.758	0.938, 3.294	0.079
LA/Ao	19	-0.345	0.148	0.77	0.1	1.461	0.927, 2.302	0.103
LVIDd*	18	-0.072	0.775	0.10	0.05	1.939	0.972, 3.867	0.060
LVIDdN	18	-0.240	0.338	0.35	0.1	1.651	0.885, 3.082	0.115
A (m/s)	16	0.354	0.179	0.15	0.1	0.542	0.259, 1.133	0.103
E (m/s)	18	0.214	0.393	0.01	0.7	1.090	0.662, 1.796	0.734
E/A*	16	-0.288	0.278	0.86	0.02	2.593	1.143, 5.881	0.023
TR PG (mmHg)	17	0.218	0.400	0.20	0.5	0.834	0.500, 1.391	0.487
CRP (mg/L)*	19	-0.335	0.160	0.04	0.06	1.775	1.045, 3.013	0.034
cTnI (ug/L)*	19	-0.533	0.019	0.14	0.01	2.108	1.227, 3.620	0.007
NT-proBNP (pmol/L)	19	-0.236	0.331	0.10	0.1	1.465	0.895, 2.398	0.129
WBC	19	-0.010	0.969	0.52	0.8	1.071	0.602, 1.905	0.816
Neutrophil (%)	19	0.148	0.545	0.76	0.5	0.848	0.500, 1.437	0.540
Neutrophil (× 10^9/L)	19	0.036	0.884	0.44	0.9	1.043	0.574, 1.896	0.891
Monocyte (%)	19	-0.253	0.297	0.01	0.8	1.050	0.662, 1.666	0.835
Monocyte (× 10^9/L)	19	-0.198	0.416	0.05	0.7	1.105	0.634, 1.927	0.725
Total lymphocyte (%)	19	-0.157	0.521	0.69	0.5	1.230	0.717, 2.108	0.453
Total lymphocyte (× 10^9/L)	19	-0.102	0.678	0.40	0.5	1.175	0.730, 1.891	0.508
NLR	19	0.136	0.579	0.38	1.0	0.987	0.528, 1.845	0.968
CD3 + (%)*	19	-0.641	0.003	0.004	0.1	1.688	0.865, 3.294	0.125
CD3 + (× 10^9/L)*	19	-0.480	0.038	0.41	0.1	1.613	0.936, 2.779	0.085
CD3 + CD4 + (%)*	19	0.448	0.054	0.70	0.05	0.604	0.363, 1.006	0.053
CD3 + CD4 + (× 10^9/L)	19	-0.264	0.275	0.46	0.8	0.939	0.601, 1.469	0.784
CD3 + CD8 + (%)	19	-0.365	0.124	0.79	0.2	1.435	0.875, 2.353	0.152
CD3 + CD8 + (× 10^9/L)*	19	-0.509	0.026	0.76	0.1	1.562	1.003, 2.433	0.048
CD4/CD8 *	19	0.413	0.079	0.68	0.1	0.638	0.362, 1.126	0.121
DPT (%)	19	0.017	0.944	0.32	0.7	1.080	0.699, 1.670	0.729
DPT (× 10^9/L)*	19	-0.351	0.141	0.94	0.05	1.751	1.021, 3.003	0.042
DNT (%)	19	-0.068	0.783	0.77	0.6	1.223	0.630, 2.371	0.552
DNT (× 10^9/L)*	19	-0.389	0.100	0.98	0.1	1.613	0.918, 2.834	0.096
CD45 + CD21 + (%)*	19	0.447	0.055	0.01	0.3	0.738	0.436, 1.249	0.257
CD45 + CD21 + (× 10^9/L)	19	0.384	0.105	0.003	0.6	0.874	0.503, 1.520	0.634
GS aplax (%)	14	0.218	0.454	0.19	0.7	0.886	0.486, 1.617	0.694
GS 4-ch (%)	14	-0.301	0.295	0.15	0.2	1.588	0.841, 3.001	0.154
GS 2-ch (%)*	14	-0.560	0.040	0.70	0.03	2.465	1.000, 6.076	0.050
GS Avg (%)*	14	-0.402	0.155	0.13	0.06	2.237	0.861, 5.815	0.098

* Covariate with Cox *P* value < 0.1 and PH-assumption *P* value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

+ Covariates with Spearman's ρ statistic *P* value < 0.1, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

Legend: *A* Peak velocity of late diastolic mitral flow, *BCS* Body condition score, *CD3 +* Total T lymphocytes, *CD3 + CD4 +* T helper lymphocytes, *CD3 + CD8 +* Cytotoxic T lymphocytes, *CD4/CD8* T helper lymphocytes to cytotoxic T lymphocytes ratio, *CD45 + CD21 +* B lymphocytes, *cTnI* Cardiac troponin I, *CRP* C-reactive protein, *E* Peak velocity of early diastolic mitral flow, *E/A* Early to late mitral flow ratio, *DPT* Double negative T lymphocytes, *DNT* Double negative T lymphocytes, *GLS aplax* Global longitudinal strain in aplax view, *GLS Avg* Average global longitudinal strain, *GLS 4-ch* Global longitudinal strain in four chamber view, *GLS 2-ch* Global longitudinal strain in two chamber view, *HR* Hazard ratio, *LA/Ao* Left atrial to aortic ratio, *LVIDd* Left ventricular end-diastolic diameter, *LVIDdN* Indexed left ventricular internal end-diastolic diameter, *N* Number of dogs, *NLR* Neutrophil to lymphocyte ratio, *NT-proBNP* N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, *PH* Proportional hazard, *TR PG* Tricuspid regurgitation derived pressure gradient, *WBC* White blood cell count

$P = 0.040$) and weakly negatively with CD3 + CD4 + lymphocyte percentage (rho = -0.293, $P = 0.017$). The left atrium to aorta ratio (rho = -0.212, $P = 0.090$), E/A (rho = -0.232, $P = 0.072$) and cTnI (rho = -0.288, $P = 0.019$) weakly negatively correlated with CD3 + CD4 + lymphocyte percentage, whereas LA/Ao (rho = 0.259, $P = 0.037$), LVIDd (rho = 0.231, $P = 0.067$), E (rho = 0.259, $P = 0.039$) and cTnI (rho = 0.293, $P = 0.017$) weakly positively correlated with CD3 + CD8 + lymphocyte concentration. Furthermore, cTnI concentration moderately positively correlated with CRP (rho = 0.673, $P < 0.001$). The left atrium to aorta ratio also moderately positively correlated with LVIDdN (rho = 0.402, $P = 0.001$), E (rho = 0.474, $P < 0.001$), and E/A (rho = 0.469, $P < 0.001$).

Discussion

In this study, we investigated the prognostic significance of inflammatory and immune cells and their association with selected cardiac biomarkers and echocardiographic variables. Main findings of our study are a significant negative association of the CD3 + CD8 + lymphocyte concentration with survival, a significant positive association of CD3 + CD4 + lymphocyte percentage with survival in both unstable CHF group and in all patient group. In addition, we found a significant negative association with survival for DPT lymphocyte percentage in the preclinical group, as well as DPT and DNT lymphocyte concentration in the unstable CHF group. All these immune cells may be of prognostic importance in dogs with MMVD, particularly in the advanced stage of heart failure.

In our study, age was significantly negatively associated with survival in the preclinical group and the group of all patients. This is consistent with the previous study that has confirmed an association between older age and worse survival in dogs with MMVD [15]. When considering all patients together, we also found that age significantly positively correlated with cTnI and CD3 + CD8 + lymphocyte concentrations, while it significantly negatively correlated with CD3 + CD4 + lymphocyte percentage. It has been reported that cTnI concentration increases with myocardial damage, and was associated with age and disease progression [18]. A previous study confirmed that the proportion of CD3 + CD8 + lymphocytes increase in dogs with MMVD compared to healthy dogs and with the severity of the disease, while CD3 + CD4 + lymphocyte percentages decrease significantly with both age and the disease severity [6].

No significant association was found between WBC and relative or absolute numbers of neutrophils, monocytes, and total lymphocytes with survival in our study. Increased WBC, neutrophils [14] and decreased total lymphocytes [14, 19, 20] have been reported to be negatively associated with survival in humans with heart failure. In dogs with heart failure, one study confirmed a negative association of total WBC and survival [15] but this and another study found no significant association of neutrophils, monocytes, or total lymphocytes with survival [15, 21]. The lack of significant findings regarding WBC, neutrophils, monocytes and total lymphocytes in our study might be due to the small individual group sizes and/or greater variability in cell counts between individual dogs. High concentrations of inflammatory cells might be observed only in the acute decompensated phase of heart failure [4, 15], however even at this stage some dogs did not show extreme elevation of inflammatory cells, which we suspect is due to individual immune response and ability to react to unstable disease as well as the status of progression in each individual dog. In our study, we found no correlations between WBC and markers of MMVD progression. There is a single report that showed a positive correlation between the ratio of neutrophils to lymphocytes and monocytes to lymphocytes to LA/Ao and the vertebral heart score [17].

Cytotoxic T lymphocyte concentration was significantly negatively associated with survival in dogs with unstable CHF and in the group of all patients, whereas no significant associations of CD3 + CD8 + lymphocytes were observed in the preclinical and the stable CHF groups. This suggests that these cells may play an important role in disease progression, especially in the decompensated stage. Cytotoxic T lymphocytes play a critical role in the defense against viruses and neoplastic cells. Recently, their role in sterile, low-grade inflammatory diseases such as ischemic heart injury or aortic occlusion has sparked interest in murine models [8]. Experimental studies in mice have shown that CD3 + CD8 + lymphocytes infiltrate the myocardium as early as two weeks after injury [9], resulting in cardiomyocyte death by CD3 + CD8 + lymphocyte activation of the Perforin/Granzyme pathway or activation of death receptors molecules of the tumor necrosis factor receptor family [8]. Cardiotoxic T lymphocytes can recognize and kill normal cardiomyocytes, like the autoimmune response observed in viral myocarditis, leading to the spread of damage and promoting further inflammation [9]. Mice lacking functional CD3 + CD8 + lymphocytes had better cardiac function and overall survival [22].

In our study, a significant positive correlation was found between CD3 + CD8 + lymphocyte concentration and markers of MMVD progression, including cTnI, LA/Ao, LVIDd, and E, respectively, in the group of all patients. This suggests that CD3 + CD8 + lymphocytes might be associated with myocardial damage and contribute to cardiac remodeling. The correlation between

Table 4 Results of univariate Cox proportional hazards regression analysis, all patients

Parameter	N	Spearman's ρ statistic	Spearman's ρ statistic *P* value	PH-assumption *P* value	Likelihood-ratio *P* value	Cox HR exp(coef)	Cox HR 95% CI	Cox *P* value
Age (months)*	62	-0.385	0.002	0.63	0.002	1.667	1.200, 2.316	0.002
BCS	54	0.180	0.194	0.12	0.20	0.797	0.576, 1.104	0.172
Heart rate*	62	-0.469	0.000	0.02	0.0006	1.776	1.273, 2.478	0.001
Murmur+	61	-0.424	0.001	0.03	0.004	1.663	1.174, 2.356	0.004
Therapy+	61	-0.315	0.013	0.04	0.02	1.465	1.047, 2.050	0.026
Sex	62	-0.220	0.086	0.18	0.08	1.304	0.971, 1.753	0.078
Weight (kg)	62	0.092	0.479	0.80	0.40	1.161	0.814, 1.655	0.410
LA/Ao*	61	-0.522	0.000	0.39	0.00008	1.998	1.449, 2.754	0.000
LVIDd*	60	-0.257	0.048	0.95	0.01	1.625	1.137, 2.323	0.008
LVIDdN*	60	-0.425	0.001	0.63	0.0007	1.898	1.296, 2.779	0.001
A (m/s)	57	0.054	0.689	0.05	0.6	0.918	0.662, 1.272	0.606
E (m/s)*	60	-0.346	0.007	0.26	0.006	1.553	1.137, 2.121	0.006
E/A*	57	-0.374	0.004	0.24	0.0006	2.023	1.387, 2.951	0.000
TR PG (mmHg)	52	0.246	0.079	0.74	0.1	1.282	0.951, 1.729	0.103
CRP (mg/L)*	62	-0.327	0.010	0.92	0.006	1.688	1.248, 2.284	0.001
cTnI (ug/L)*	62	-0.526	0.000	0.30	0.0001	1.846	1.432, 2.380	0.000
NT proBNP (pmol/L)+	62	0.675	0.000	0.03	0.000001	2.219	1.667, 2.953	0.000
WBC	62	-0.088	0.496	0.15	0.3	1.186	0.839, 1.677	0.335
Neutrophil (%)	62	0.101	0.437	0.56	0.4	0.895	0.674, 1.189	0.445
Neutrophil (x 10^9/L)	62	-0.041	0.754	0.13	0.5	1.134	0.797, 1.614	0.486
Monocyte (%)	62	-0.231	0.071	0.08	0.3	1.171	0.887, 1.546	0.265
Monocyte (x 10^9/L)	62	-0.179	0.164	0.02	0.2	1.273	0.923, 1.754	0.141
Total lymphocyte (%)	62	-0.147	0.255	0.32	0.2	1.235	0.905, 1.685	0.184
Total lymphocyte (x 10^9/L)	62	-0.231	0.071	0.96	0.1	1.235	0.941, 1.621	0.128
NLR	62	0.132	0.307	0.23	0.5	0.882	0.618, 1.258	0.487
CD3 + (%)	62	-0.063	0.625	0.13	0.8	1.051	0.760, 1.454	0.762
CD3 + (x 10^9/L)+	62	-0.251	0.049	0.14	0.1	1.297	0.955, 1.762	0.096
CD3 + CD4 + (%)*	62	0.270	0.034	0.52	0.05	0.733	0.542, 0.991	0.044
CD3 + CD4 + (x 10^9/L)	62	-0.071	0.582	0.58	1	1.008	0.747, 1.361	0.956
CD3 + CD8 + (%)	62	-0.195	0.130	0.86	0.1	1.290	0.962, 1.731	0.089
CD3 + CD8 + (x 10^9/L)*	62	-0.224	0.081	0.67	0.01	1.502	1.116, 2.022	0.007
CD4/CD8	62	0.229	0.074	0.93	0.3	0.832	0.574, 1.207	0.332
DPT (%)	62	0.014	0.914	0.63	0.8	1.047	0.763, 1.436	0.777
DPT (x 10^9/L)	62	-0.173	0.179	0.99	0.3	1.205	0.884, 1.641	0.238
DNT (%)	62	-0.050	0.702	0.33	1	0.992	0.705, 1.397	0.964
DNT (x 10^9/L)	62	-0.209	0.103	0.13	0.4	1.158	0.845, 1.586	0.362
CD45 + CD21 + (%)	62	-0.063	0.628	0.37	0.5	1.122	0.831, 1.515	0.453
CD45 + CD21 + (x 10^9/L)	62	-0.129	0.318	0.21	0.3	1.151	0.892, 1.485	0.279
GS aplax (%)*	48	0.325	0.024	0.31	0.006	0.594	0.412, 0.857	0.005
GS 4-ch (%)*	49	0.259	0.073	0.05	0.05	0.709	0.506, 0.994	0.046
GS 2-ch (%)	48	0.216	0.140	0.80	0.08	0.735	0.524, 1.029	0.073
GS Avg (%)*	49	0.247	0.087	0.21	0.007	0.578	0.383, 0.872	0.009

* Covariate with Cox *P* value < 0.05 and PH-assumption *P* value > 0.05, which are considered significant in the univariate Cox analysis

\+ Covariates with Spearman's ρ statistic *P* value < 0.05, which may also be significantly monotonically associated with the length of survival

Legend: *A* Peak velocity of late diastolic mitral flow, *BCS* Body condition score, *CD3 +* Total T lymphocytes, *CD3 + CD4 +* T helper lymphocytes, *CD3 + CD8 +* Cytotoxic T lymphocytes, *CD4/CD8* T helper lymphocytes to cytotoxic T lymphocytes ratio, *CD45 + CD21 +* B lymphocytes, *cTnI* Cardiac troponin I, *CRP* C-reactive protein, *E* Peak velocity of early diastolic mitral flow, *E/A* Early to late mitral flow ratio, *DPT* Double negative T lymphocytes, *DNT* Double negative T lymphocytes, *GLS aplax* Global longitudinal strain in aplax view, *GLS Avg* Average global longitudinal strain, *GLS 4-ch* Global longitudinal strain in four chamber view, *GLS 2-ch* Global longitudinal strain in two chamber view, *HR* Hazard ratio, *LA/Ao* Left atrial to aortic ratio, *LVIDd* Left ventricular end-diastolic diameter, *LVIDdN* Indexed left ventricular internal end-diastolic diameter, *N* Number of dogs, *NLR* Neutrophil to lymphocyte ratio, *NT-proBNP* N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, *PH* Proportional hazard, *TR PG* Tricuspid regurgitation derived pressure gradient, *WBC* White blood cell count

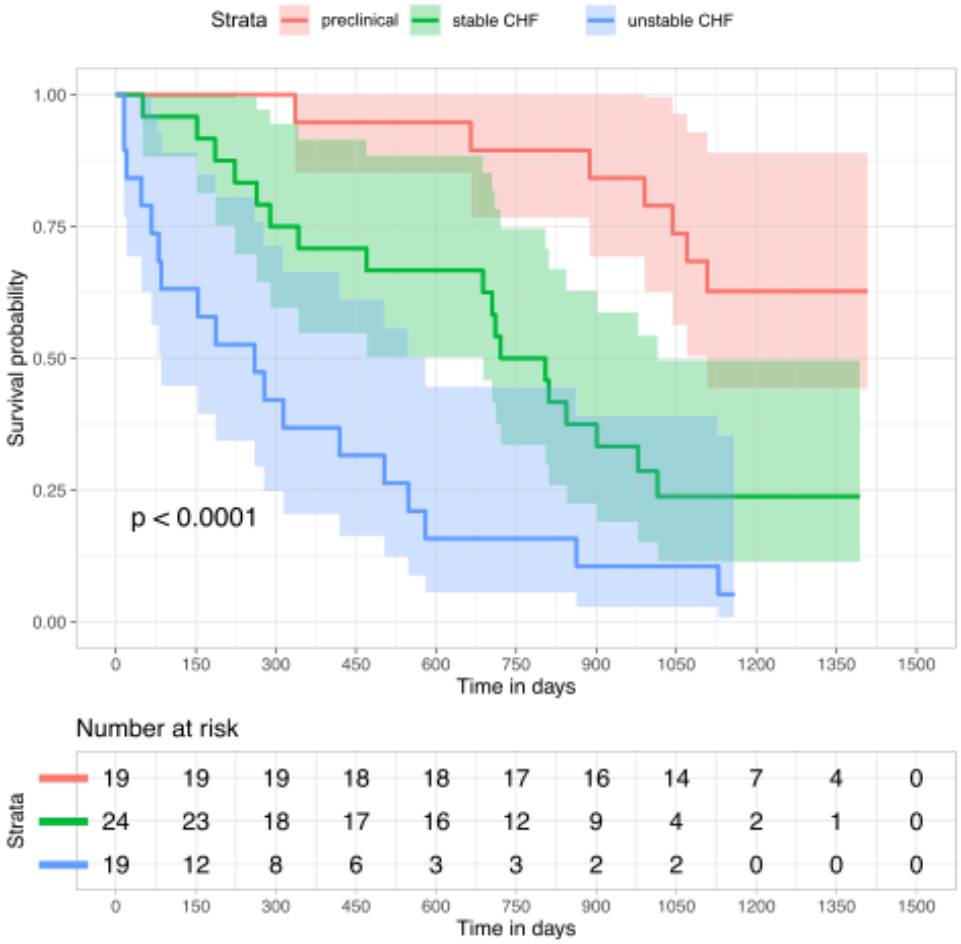


Fig. 1 Kaplan–Meier survival curves for three groups of dogs (with log-rank test P value and risk table)

cTnI and CD3 + CD8 + lymphocytes has previously been described in human medicine in acute myocardial infarction [23]. Cardiac troponin I is a specific marker of myocardial damage, and a higher cTnI concentration correlates with the severity of myocardial remodeling observed during the progression of heart disease [24]; however, cardiac therapy may affect cTnI levels [25].

On the opposite, CD3 + CD4 + lymphocytes, especially T regulatory lymphocytes help regulate immune response and suppress excessive inflammation to prevent further damage to the cardiac tissue. In chronic heart failure T regulatory cells can become less effective in controlling inflammation and can contribute to adverse remodeling and fibrosis [10].

In our study, we found a significant positive association between CD3 + CD4 + lymphocyte percentage and survival in dogs with MMVD in the group of unstable CHF, as well as in the group of all patients. T helper lymphocytes infiltrate the myocardium alongside CD3 + CD8 + lymphocytes in ischemic and non-ischemic cardiac pathologies and can contribute to fibrosis, hypertrophy, and remodeling of the left ventricle [26, 27]. In

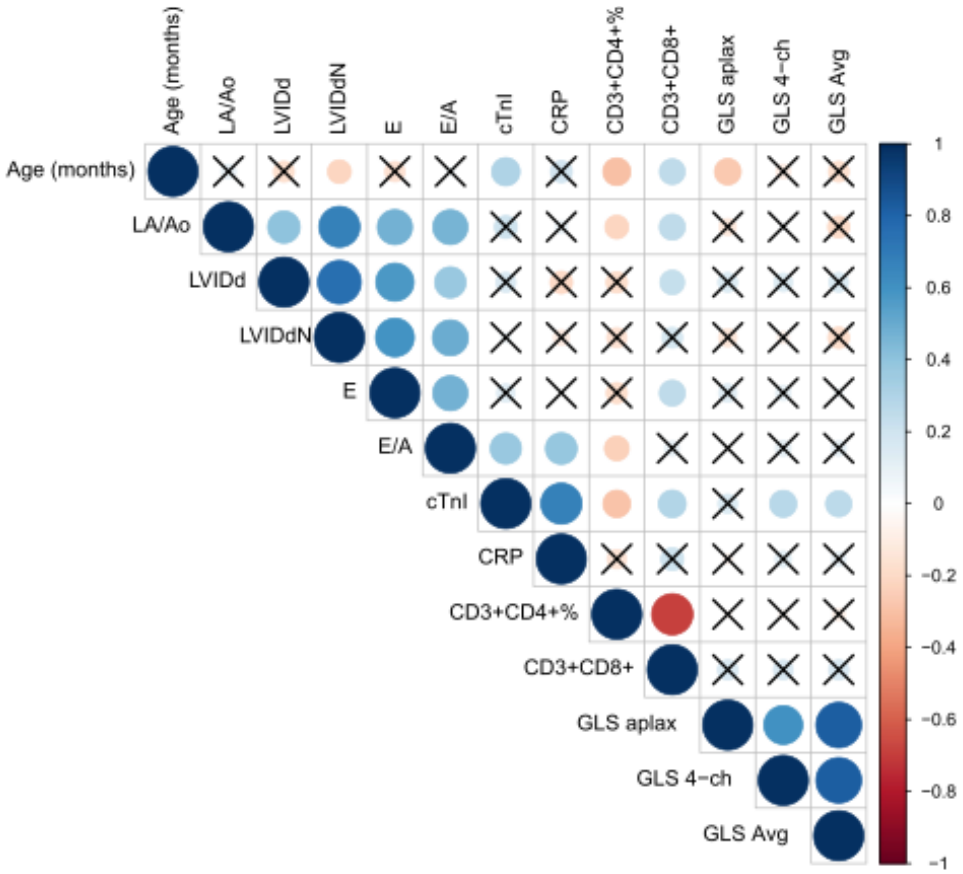


Fig. 2 Spearman's rank correlation coefficients for pairs of significant variables in the group of all patients. No significant correlation ($P > 0.1$) is indicated by a cross. Legend: CD3 + CD4 + %, percentage of T helper lymphocytes; CD3 + CD8 +, cytotoxic T lymphocyte concentration; CHF, congestive heart failure; cTnI, cardiac troponin I; CRP, C-reactive protein; E, peak velocity of early diastolic mitral flow; E/A, early to late mitral flow ratio; GLS aplax, global longitudinal strain in aplax view; GLS Avg, average global longitudinal strain; GLS 4-ch, global longitudinal strain in four-chamber view; LA/Ao, left atrial to aortic ratio; LVIDd, left ventricular end-diastolic diameter; LVIDdN, indexed left ventricular internal end-diastolic diameter

a mouse model of myocardial infarction, depletion of CD3 + CD4 + lymphocytes resulted in a higher total number of leukocytes with greater recruitment of pro-inflammatory monocytes and worse disease outcomes. Meanwhile, the recruitment of CD3 + CD4 + lymphocytes resulted in better wound healing and improved survival outcomes [28].

The CD3 + CD4 + percentage significantly negatively correlated with cTnI concentration, LA/Ao and E/A in the group of all patients. This results suggests downregulation or suppression of these cells with progression of MMVD.

There are no previous reports on the correlations between different lymphocyte subtypes and markers of MMVD progression in dogs. Our results suggest that CD3 + CD4 + and CD3 + CD8 + lymphocytes may play a role in cardiac remodeling and might be associated with the progression of heart disease and the development of heart failure.

Double negative T lymphocytes are a small population of CD3 + lymphocytes that are both CD4 and CD8 negative. While they constitute a small population of CD3 + lymphocytes, they play an important role in autoimmune diseases and cancer. Theoretically, DNT lymphocytes are early CD3 + lymphocytes that lack CD4 and CD8 receptors, and they escape the thymus before their final development. However, there is evidence that they can also develop from peripheral CD3 + CD8 + lymphocytes and produce proinflammatory cytokines such as interleukin (IL) 2, IL-4, IL-A17, and tumor necrosis factor α [12]. In contrast, there is a subset of DNT lymphocytes that exerts a similar regulatory function to CD3 + CD4 + lymphocytes and play a role in immune tolerance and immunomodulatory activity [29, 30].

On the other hand, DPT lymphocytes possess both CD8 and CD4 receptors, but their role is poorly defined. Studies in humans and mice have shown that their number is augmented in various diseases such as cancer, autoimmune diseases, rheumatoid arthritis, and chronic inflammatory diseases [11, 31, 32]. Their role is reportedly very similar to that of CD3 + CD4 + lymphocytes, but the population of DPT is very heterogeneous and can produce effector molecules, like tumor necrosis factor α and interferon γ, as well as some lytic enzymes such as perforin and granzyme B [32].

In our study, a significant negative association of DPT lymphocyte percentage with survival in the preclinical group was found. In addition, both DPT and DNT lymphocyte concentrations were significantly negatively associated with survival in the unstable CHF group. Apart from a previous study [6], which investigated peripheral lymphocyte subtypes, there are no other reports on the involvement of DNT and DPT lymphocytes in heart failure in dogs. This is the first report of their effects on survival in dogs with MMVD, and further studies are needed to better understand the onset of action of DPT and DNT lymphocytes in heart diseases.

In our study, the concentration of CRP was significantly negatively associated with survival in dogs with MMVD in the all patients group, which suggests that inflammation is a negative prognostic factor. No survival studies have been published on this topic in dogs, apart from some human studies that showed CRP concentration as a predictor of hospitalization and mortality in patients with heart failure [13, 14, 33]. In addition, CRP concentration significantly positively correlated with cTnI concentration in all patients group, which suggests that increased inflammation results in increased myocardial damage and disease progression. Our study found no significant correlation between CRP concentration and inflammatory cells in any group of dogs presumably due to variability of the results of the pertinent cells in individual groups as well as relatively small patients' groups. C-reactive protein is an acute-phase protein synthesized by the liver during an acute phase of the inflammatory process [34]. Studies in dogs with heart failure showed an increase in CRP concentration compared to healthy dogs [4, 35, 36].

The concentration of NT-proBNP was negatively associated with survival in the stable CHF group. Our results are consistent with previous studies showing a strong association between NT-proBNP concentration and survival in dogs with heart failure [3, 37]. However, we found no significant correlations between NT-proBNP and inflammatory and immune cells, which could be due to the large variation in NT-proBNP concentration between patients. Natriuretic neuropeptides are produced in the atria and ventricles of the heart and are stimulated and released in larger quantities at the time of cardiac wall stress [38]. The concentration of NT-proBNP can vary greatly between individual patients and has been shown that age, gender and renal function can influence the concentration of this blood cardiac marker [39, 40]. A certain intra-individual variability in NT-proBNP concentration has also been described, with the concentration in a single patient varying by up to 50% within a week of blood sampling [41].

In our study, we looked for a possible association between GLS and the survival of patients with different stages of MMVD. Our results showed that GLS measurements were significantly positively associated with survival in the preclinical, stable CHF group, and in the all patients group, whereas GLS becomes significantly negatively associated with survival with disease progression in the unstable CHF group where systolic function is worsening. No significant correlations between GLS and inflammatory or immunological variables were found in our study. Dogs in the moderate stage of MMVD exhibit increased left ventricular load dependent functional parameters such as shortening fraction, left ventricular ejection fraction, and GLS, whereas in severe stages of the disease, due to hemodynamic overload and an increase in left ventricular systolic diameter, these parameters show lower values, corresponding to a decrease in systolic function [42]. This was first described in a publication by Wess [43], indicating a dynamic change in left ventricular function at different stages of MMVD. In human patients with primary mitral regurgitation, preoperative GLS measurements have been shown to be predictors of long-term survival, with patients with reduced GLS having worse survival outcomes and worse ejection fraction after mitral valve surgery [44, 45]. In chronic ischemic cardiomyopathy in humans, reduced GLS was also found to be a predictor of worse survival outcome [46]. We have not found reports in the literature on the association of GLS and survival in dogs with MMVD.

Limitations

The small number of dogs in each group presents a limitation of this study. As the number of dogs in our study was rather small, the Cox analysis would not be performed reliably with too many variables/predictors at once.

Conclusion

In summary, our study has shown that T helper cells were positively associated with survival, whereas cytotoxic T cells, DPT, and DNT lymphocytes and markers of disease progression (NT-proBNP, cTnI) and marker of inflammation (CRP) were negatively associated with survival in dogs with MMVD.

We observed a significant positive correlation between cytotoxic T cells and echocardiographic variables of disease progression as well as cTnI, and a negative correlation between T helper cells and markers of disease progression and cTnI, further indicating the involvement of CD3 + lymphocyte subtypes in the pathophysiology of MMVD.

This study suggests that the immune system may play an important role in canine MMVD and development of heart failure. Future studies could help to better understand the immune pathways involved in the progression of MMVD in dogs and potentially improve the prognosis and outcome of the disease.

Methods

Study population

We conducted a retrospective analysis of medical records from 62 client-owned dogs in various stages of MMVD that received treatment at the cardiology department of the University Small Animal Clinic between August 2018 and November 2019. These dogs had previously participated in a study investigating peripheral blood lymphocyte subtype concentrations and percentages. At the time of diagnosis, the dogs were divided into three groups: preclinical stage (ACVIM B2; 19), dogs with stable CHF (ACVIM C, 24), and dogs with unstable CHF (ACVIM C and ACVIM D, 19). All patients underwent a thorough clinical examination, echocardiography, electrocardiogram, chest radiographs (all dogs in CHF), and blood sampling at the time of enrollment in the study [6].

Dogs in stable CHF were clinically comfortable at rest and normal activity, had no presence of active pulmonary edema on radiographs at the inclusion in the study, but had a history of pulmonary edema. Dogs with unstable CHF had have active pulmonary edema on the radiographs and had showed clinical signs such as cough, dyspnea/tachypnea at the time of examination and were tachycardic. In the group of unstable CHF were also dogs with refractory MMVD, needing frequent adjustments of therapy due to high intracardiac pressure and persistence of pulmonary edema. Dogs that had received antibiotic treatment or other immunosuppressive medication in the month prior to blood sampling were excluded from participation in the study. In addition, dogs with other systemic diseases such as endocrine, metabolic or neoplastic diseases were not considered for participation in the study [6].

Echocardiography

Echocardiographic examinations were performed in all patients between August 2018 and September 2019 [VIVID E9, General Electric Healthcare]. All patients underwent 2D, M-mode, color Doppler, spectral and tissue Doppler analyses. Simultaneous ECG recordings were made for all cases, and measurements were performed offline [EchoPAC, General Electric Healthcare].

We additionally performed GLS measurements using archived echocardiographic images to assess systolic function of the left ventricle in three views: GLS aplax, GLS 4-ch, and GLS 2-ch. Endocardial margin was manually tracked for each of the three views, and dedicated software was used for calculations [AFI, GE Healthcare]. Global longitudinal strain average was calculated by the program using at least two of the three views if all three were not available in a patient. All strain analyses were performed by a single investigator (A.D.P.) to avoid inter-investigator variability.

Blood analyzes

Blood analyzes were performed at the time of enrollment in the previous study [6] and consisted of routine hematological and biochemical tests performed at the in-house laboratory using an automated laser-based hematology analyzer (ADVIA 120, Siemens, Munich, Germany) and an automated biochemistry analyzer (RX Daytona, Randox, Crumlin, United Kingdom).

N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations (pmol/L) were measured in IDEXX BioAnalytics Laboratory (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany), cTnI concentrations (µg/L) with a high-sensitivity immunoassay (ADVIA Centaur TnI-Ultra; Siemens) and CRP concentrations (mg/L) with a canine-specific ELISA (Canine CRP ELISA; Alpco, Salem, New Hampshire).

Flow cytometry was performed on fresh whole blood samples withing 24 h of collection using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, California) with FACSDiva software, version 8.0.1 (BD Biosciences) to determine the percentages CD3 +, CD3 + CD4 +, CD3 + CD8 +, DPT, DNT and CD45 + CD21 + lymphocytes. Monoclonal rat and mouse anti-canine antibodies against CD3 (clone CA17.2A12), CD4 (clone YKIX302.9), CD8 (clone YCATE55.9) in a mix (CD3:FITC/CD4:RPE/CD8:Alexa Fluor 647, ref: TC014), CD45 (clone

YKIX716.13; Alexa Fluor 488, ref: MCA1042A488), and CD21 (clone CA2.1D6; Alexa Fluor 647, ref: MCA1781A647) manufactured by Bio-Rad Laboratories Inc (Hercules, California), were used.

The blood sampling procedure and analyzes was performed at the time of inclusion in the previous study and are described in detail in the previous publication [6].

Patient status

Patient status (deceased/alive) and the cause of death were obtained from medical records at the small animal clinic or through a telephone interview with the owner. The telephone interviews with the owners took place from July 4, 2022 to July 19, 2022. Dogs that were alive at the time of our telephone conversation were censored.

Statistical analyzes

Survival analysis was performed in dogs with MMVD to examine survival from study entry to death. Dogs that were alive at the time of the telephone call were censored. Survival probabilities were estimated using the non-parametric Kaplan–Meier method, and survival functions/curves were compared using the non-parametric log-rank hypothesis test [47].

Univariate Cox proportional hazard regression analysis was performed in each of the three groups of patients with heart disease (preclinical, stable CHF, unstable CHF) and in the group of all patients [48]. A hazard ratio greater than 1 indicates a covariate that is positively associated with event probability (death) and thus negatively associated with survival. We subjected our Cox models to a likelihood ratio test, from which we concluded that a Cox model is statistically significant if the estimated *P*-value is below the chosen significance level. Since *P* values are larger when samples are small (as in our case), we chose to consider $P < 0.1$ as significant within each group and $P < 0.05$ in the group of all patients.

To ensure the validity of the Cox models, we checked (a) the linear relationship between log survival time and the covariates by estimating the *P* values of the Cox regression models and the Spearman correlation coefficients between survival time and each covariate, and (b) the fulfillment of the proportional hazards (PH) assumption of the covariates by testing the independence ($P > 0.05$) between the corresponding set of scaled Schoenfeld residuals and time. It should also be noted that the covariates were normalized to z-scores (i.e., scaled by subtracting the mean and dividing by the standard deviation) before performing the Cox proportional hazard regression analyzes due to the very different means and spreads of the covariates and survival time. Z-score normalization rescales data to have a mean of 0 and a standard deviation of 1. Since normalization does not affect the significance (*P*-values) of the predictors—it only affects the point estimates (HR) of the regression coefficients and produces a smaller standard error of the estimates—our interpretation of the results of the Cox proportional hazard regression analyzes is mainly based on the *P*-values. When the HR values or the corresponding hazards of death are given as percentages, they always refer to the normalized values and therefore to the [-1,1] scale. Spearman correlation coefficients between significant covariates were calculated to assess the relationships among variables. The strength of the observed correlation rho was interpreted as written: 0.00–0.10: negligible; 0.10–0.39: weak; 0.40–0.69: moderate; 0.70–0.89: strong; and 0.90–1.00: very strong [49].

All the statistical analyzes were performed using the program R, version 4.3.2 [50].

Abbreviations

ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
CD3 +	T lymphocytes
CD3 + CD4 +	T helper lymphocytes
CD3 + CD8 +	Cytotoxic T lymphocytes
CD45 + CD21 +	B lymphocytes
CHF	Congestive heart failure
CRP	C-reactive protein
cTnI	Cardiac troponin I
DNT	Double negative T lymphocytes
DPT	Double positive T lymphocytes
E	peak velocity of early diastolic mitral flow
E/A	Early to late mitral flow ratio
GLS	Global longitudinal strain
GLS aplax	Global longitudinal strain in aplax view
GLS Avg	Average global longitudinal strain
GLS 4-ch	Global longitudinal strain in four chamber view
GLS 2-ch	Global longitudinal strain in two chamber view
HR	Hazard ratio
IL	Interleukin
LA/Ao	Left atrial to aortic ratio
LVIDd	Left ventricular end-diastolic diameter
LVIDdN	Indexed left ventricular internal diameter at end-diastole
MMVD	Myxomatous mitral valve disease
NT-proBNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
WBC	Total white blood cell count

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12917-024-04266-7.

Supplementary Table 1.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mr. Phillip Nagel for language review of this manuscript.

Authors' contributions

M.C. organized the data, interpreted the results, wrote and revised the manuscript; N.D. interpreted the results, revised the manuscript; A.N.S. hypothesis generation and experimental design, interpreted the results, wrote and revised the manuscript; M.H. statistical analyses, interpreted the results, wrote and revised the manuscript; K.P. interpreted the results, revised the manuscript; A.J. revised the manuscript; A.D.P. hypothesis generation and experimental design, interpreted the results, wrote and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Availability of data and materials
Research data are available upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate
All procedures complied with the applicable Slovenian governmental regulations (Animal Protection Act, The Official Gazette of the Republic of Slovenia, 43/2007). Authors declare human ethics approval was not needed for this study. All dog owners gave their informed consent to participate in this study.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Author details
[1]Veterinary Faculty, Small Animal Clinic, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia. [2]Faculty of Electrical Engineering, Laboratory of Applied Mathematics and Statistics, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia. [3]Faculty of Medicine, Institute of Microbiology and Immunology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia.

Received: 7 June 2024 Accepted: 3 September 2024
Published online: 28 September 2024

References

1. Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD, Fox PR, Häggström J, Fuentes VL, Oyama MA, Rush JE, Stephen R, Uechi M. ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. J Vet Intern Med. 2019;33:1127–40. https://doi.org/10.1111/jvim.15488.
2. Borgarelli M, Haggstrom J. Canine degenerative myxomatous mitral valve disease: natural history, clinical presentation and therapy. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2010;40:651–63. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.03.008.
3. Nemec Svete A, Verk B, Čebulj-Kadunc N, Salobir J, Rezar V, Domanjko Petrič A. Inflammation and its association with oxidative stress in dogs with heart failure. BMC Vet Res. 2021;17:176. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02878-x.
4. Domanjko Petrič A, Lukman T, Verk B, Nemec Svete A. Systemic inflammation in dogs with advanced-stage heart failure. Acta Vet Scand. 2018;60:20. https://doi.org/10.1186/s13028-018-0372-x.
5. Hamilton-Elliott J, Ambrose E, Christley R, Dukes-McEwan J. White blood cell differentials in dogs with congestive heart failure (CHF) in comparison to those in dogs without cardiac disease. J Small Anim Pract. 2018;59:364–72. https://doi.org/10.1111/jsap.12809.
6. Druzhaeva N, Nemec Svete A, Ihan A, Pohar K, Domanjko Petrič A. Peripheral blood lymphocyte subtypes in dogs with different stages of myxomatous mitral valve disease. J Vet Intern Med. 2021;35:2112–22. https://doi.org/10.1111/jvim.16207.
7. Blanton RM, Carrillo-Salinas FJ, Alcaide P. T-cell recruitment to the heart: friendly guests or unwelcome visitors? Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019;317:H124–40. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00028.2019.
8. Santos-Zas I, Lemarié J, Zlatanova I, Cachanado M, Seghezzi JC, Benamer H, Goube P, Vandestienne M, Cohen R, Ezzo M, Duval V, Zhang Y, Su JB, Bizé A, Sambin L, Bonnin P, Branchereau M, Heymes C, Tanchot C, Vilar J, Delacroix C, Huilot JS, Cochain C, Bruneval P, Danchin N, Tedgui A, Mallat Z, Simon T, Ghaleb B, Silvestre JS, Ait-Oufella H. Cytotoxic CD8+ T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling. Nat Commun. 2021;12:1483. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21737-9.
9. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, Hasin Y, Amar M, Fixler R, Battler A, Eldar M, Hasin D. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. J Mol Cell Cardiol. 2000;32:2141–9. https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1261.
10. Lu Y, Xia N, Cheng X. Regulatory T Cells in Chronic Heart Failure. Front Immunol. 2021;12:732794. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732794.
11. Parel Y, Chizzolini C. CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. Autoimmun Rev. 2004;3:215–20. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2003.09.001.
12. Li H, Tsokos GC. Double-negative T cells in autoimmune diseases. Curr Opin Rheumatol. 2021;33:163–72. https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000778.
13. Mueller C, Laule-Kilian K, Christ A, Brunner-La Rocca HP, Perruchoud AP. Inflammation and long-term mortality in acute congestive heart failure. Am Heart J. 2006;151:845–50. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2005.06.046.
14. Ostrowska M, Ostrowski A, Łuczak M, Jaguszewski M, Adamski P, Bethwon J, Rynkiewicz A, Gruchała M. 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. https://doi.org/10.5603/KP.a2016.0147.
15. Brložnik M, Perčjak A, Nemec Svete A, Domanjko PA. Selected hematological, biochemical, and echocardiographic variables as predictors of survival in canine patients with myxomatous mitral valve disease and congestive heart failure. J Vet Cardiol. 2023;46:18–29. https://doi.org/10.1016/j.jvc.2023.03.001.
16. Jung MJ, Kim JH. Prognostic efficacy of complete blood count indices for assessing the presence and the progression of myxomatous mitral valve disease in dogs. Animals (Basel). 2023;13:2821. https://doi.org/10.3390/ani13182821.
17. Ku D, Chae Y, Kim C, Koo Y, Lee D, Yun T, Chang D, Kang BT, Yang MP, Kim H. Severity of myxomatous mitral valve disease in dogs may be predicted using neutrophil-to-lymphocyte and monocyte-to-lymphocyte ratio. Am J Vet Res. 2023;84:ajvr.23.01.0012. https://doi.org/10.2460/ajvr.23.01.0012.
18. Ljungvall I, Höglund K, Tidholm A, Olsen LH, Borgarelli M, Venge P, Häggström J. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. J Vet Intern Med. 2010;24:153–9. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0428.x.
19. Ommen SR, Hodge DO, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Thomson SP, Gibbons RJ. Predictive power of the relative lymphocyte concentration in patients with advanced heart failure. Circulation. 1998;97:19–22. https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.1.19.
20. Majmundar M, Kansara T, Park H, Ibarra G, Marta Lenik J, Shah P, Kumar A, Doshi R, Zala H, Chaudhari S, Kalra A. Absolute lymphocyte count as a predictor of mortality and readmission in heart failure hospitalization. Int J Cardiol Heart Vasc. 2022;39:100981. https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2022.100981.
21. Nemec Svete A, Verk B, Jazbec Kržman P, Druzhaeva N, Bohanec N, Domanjko PA. Blood variables associated with survival in canine congestive heart failure patients. Bulg J Vet Med. 2020;23:257–61.
22. Ilatovskaya DV, Pitts C, Clayton J, Domondon M, Troncoso M, Pippin S, DeLeon-Pennell KY. CD8+ T-cells negatively regulate inflammation post-myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019;317:H581–H596. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00112.2019.
23. Al-Ahmad RS, Mahafzah AM, Al-Mousa EN. Immunological changes in acute myocardial infarction. Saudi Med J. 2004;25:923–8.
24. Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. J Vet Intern Med. 2004;18:831–9. https://doi.org/10.1892/0891-6640(2004)18%3c831:ctcidw%3e2.0.co;2.
25. Chan IP, Wu SY, Chang CC, Chen WY. Serial measurements of cardiac troponin I in heart failure secondary to canine mitral valve disease. Vet Rec. 2019;21(185):343. https://doi.org/10.1136/vr.105265.
26. Laroumanie F, Douin-Echinard V, Pozzo J, Lairez O, Tortosa F, Vinel C, Delage C, Calise D, Dutaur M, Parini A, Pizzinat N. CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. Circulation. 2014;129:2111–24. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007101.
27. Barsal SS, Ismahil MA, Goel M, Patel B, Hamid T, Rokosh G, Prabhu SD. Activated T Lymphocytes are Essential Drivers of Pathological Remodeling in Ischemic Heart Failure. Circ Heart Fail. 2017;10:e003688. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003688.
28. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. Circulation. 2012;125:1652–63. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.044164.
29. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H, Yao J. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disord Cancer Front Immunol. 2022;13:816005. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005.

30. Vellilkakam T, Gollob KJ, Dutra WO. Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression. Immunology. 2022;165:371–85. https://doi.org/10.1111/imm.13441.
31. Quandt D, Rothe K, Scholz R, Baerwald CW, Wagner U. Peripheral CD4CD8 double positive T cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis. PLoS ONE. 2014;9: e93293. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093293.
32. Clénet ML, Gagnon F, Moratalla AC, Viel EC, Arbour N. Peripheral human CD4+CD8+ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. Sci Rep. 2017;7:11612. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11926-2.
33. Matsumoto H, Kasai T, Sato A, Ishiwata S, Yatsu S, Shitara J, Murata A, Kato T, Suda S, Matsue Y, Hiki M, Takagi A, Daida H. Association between C-reactive protein levels at hospital admission and long-term mortality in patients with acute decompensated heart failure. Heart Vessels. 2019;34:1961–8. https://doi.org/10.1007/s00380-019-01435-9.
34. Nehring SM, Goyal A, Patel BC. C Reactive Protein. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
35. Rubio CP, Saril A, Kocaturk M, Tanaka R, Koch J, Ceron JJ, Yilmaz Z. Changes of inflammatory and oxidative stress biomarkers in dogs with different stages of heart failure. BMC Vet Res. 2020;16:433. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02650-7.
36. Reimann MJ, Ljungvall I, Hillström A, Møller JE, Hagman R, Falk T, Höglund K, Häggström J, Olsen LH. Increased serum C-reactive protein concentrations in dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. Vet J. 2016;209:113–8. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.12.006.
37. Borgarelli M, Ferrasin L, Lamb K, et al. The predictive value of clinical, radiographic, echocardiographic variables and cardiac biomarkers for assessing risk of the onset of heart failure or cardiac death in dogs with preclinical myxomatous mitral valve disease enrolled in the DELAY study. J Vet Cardiol. 2021;36:77–88.
38. Panagopoulou V, Deftereos S, Kossyvakis C, Raisakis K, Giannopoulos G, Bouras G, Pyrgakis V, Cleman MW. NTproBNP: an important biomarker in cardiac diseases. Curr Top Med Chem. 2013;13:82–94. https://doi.org/10.2174/1568026611313020002.
39. Clerico A, Del Ry S, Maffei S, Prontera C, Emdin M, Giannessi D. The circulating levels of cardiac natriuretic hormones in healthy adults: effects of age and sex. Clin Chem Lab Med. 2002;40:371e7. https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.060.
40. Vickery S, Price CP, John RI, Abbas NA, Webb MC, Kempson ME, et al. B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy. Am J Kidney Dis. 2005;46:610e20. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.06.017.
41. Lange S, Conlon C, Phelan D, Cunningham S, McDonald K. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. J Card Fail. 2007;13(1):50–5. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2006.09.003.
42. Zois NE, Tidholm A, Nägga KM, Moesgaard SG, Rasmussen CE, Falk T, Häggström J, Pedersen HD, Åblad B, Nillsen HY, Olsen LH. Radial and longitudinal strain and strain rate assessed by speckle-tracking echocardiography in dogs with myxomatous mitral valve disease. J Vet Intern Med. 2012;26:1309–19. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.01017.x.
43. Wess G, Keller LJ, Klausnitzer M, Killich M, Hartmann K. Comparison of longitudinal myocardial tissue velocity, strain, and strain rate measured by two-dimensional speckle tracking and by color tissue Doppler imaging in healthy dogs. J Vet Cardiol. 2011;13:31–43. https://doi.org/10.1016/j.jvc.2010.08.001.
44. Hiemstra YL, Tomsic A, van Wijngaarden SE, Palmen M, Klautz RJM, Bax JJ, Delgado V, Ajmone MN. Prognostic value of global longitudinal strain and etiology after surgery for primary mitral regurgitation. JACC Cardiovasc Imaging. 2020;13(2 Pt 2):577–85. https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2019.03.024.
45. Canessa M, Thamman R, Americo C, Soca G, Dayan V. Global longitudinal strain predicts survival and left ventricular function after mitral valve surgery: A meta-analysis. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2021;33:337–42. https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2020.09.024.
46. Bertini M, Nucifora G, Ewe SH, Auger D, Marsan NA, Schalij MJ, Bax JJ, Delgado V. Global longitudinal strain predicts long-term survival in patients with chronic ischemic cardiomyopathy. Circ Cardiovasc Imaging. 2012;5:383–91. https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.111.970434.
47. Klein JP, Moeschberger ML. Survival Analysis: Techniques for Censored and Truncated Data (2nd Edition). Springer; 2003.
48. Collett D. Modelling survival data in medical research. 2nd ed. Boca Raton: CRC; 2003.
49. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. Anesth Analg. 2018;126:1763–8. https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864.
50. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Core Team: Vienna, Austria, 2013. [Google Scholar].

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.