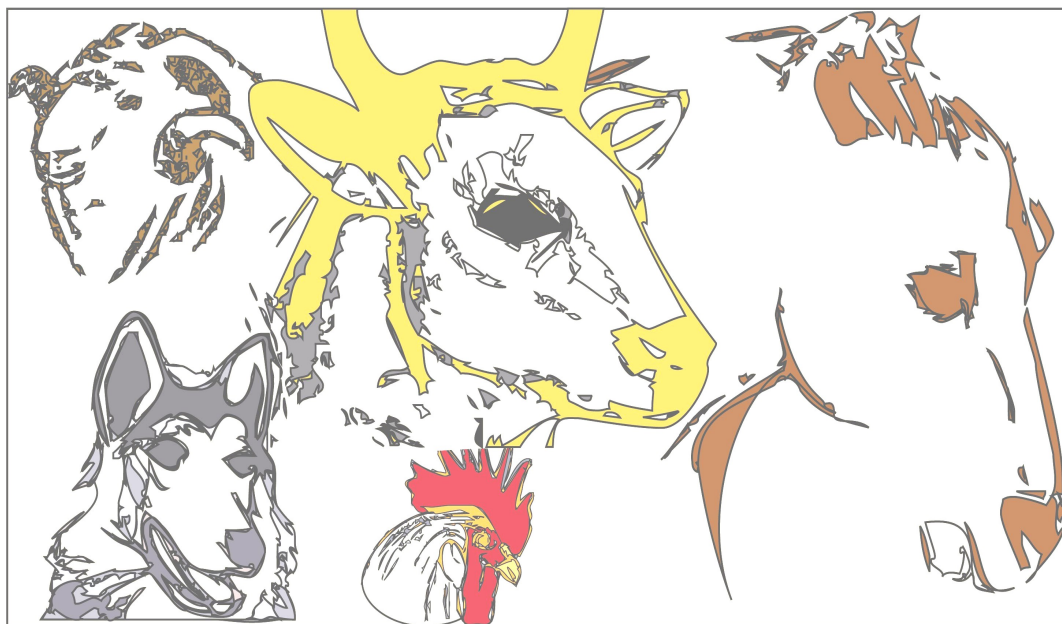


**DEVETO REGIONALNO SAVETOVANJE IZ KLINIČKE
PATOLOGIJE I TERAPIJE ŽIVOTINJA**

*THE NINTH REGIONAL SYMPOSIUM IN ANIMAL CLINICAL PATHOLOGY AND
THERAPY*

Clinica veterinaria 2007

Palić, 18-22. jun 2007. godine



PROGRAM
PROGRAMME

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE BEOGRAD
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE BELGRADE
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE SKOPJE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE SKOPJE
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE SARAJEVO
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE SARAJEVO

POKROVITELJ

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, ŠUMARSTVA I VODOPRIVREDE REPUBLIKE SRBIJE
UPRAVA ZA VETERINU
SPONSORED BY
MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND WATER MANAGEMENT OF SERBIA
DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE

ORGANIZACIONI ODBOR
ORGANIZING COMMITTEE

Stanko Boboš, Ramiz Ćutuk, Metodija Dodovski, Toni Dovenski, Selma Filipović, Siniša Gatarić, Petar Glavaški, Mišo Hristovski, Ljubomir Kalaba, Josip Krnić, Dejan Laušević, Miodrag Lazarević, Miroslav Marinković, Tibor Molnar, Tihomir Petrujkić, Mustafa Podžo, Nikola Popović, Zoran Rašić, Andrija Romić, Steva Stevanović, Slobodan Stevanov, Velibor Stojić, Mirko Šinković, Grgo Tikvicki, Dragiša Trailović, Plamen Trojačanec, Almedina Zuko, Branko Živković

PRESEDNIK
CHAIRMAN

Dragiša R. Trailović

POTPRESEDNICI
VICECHAIRMAN

Selma Filipović
Toni Dovenski
Jožef Horvat

PROGRAMSKI ODBOR
SCIENTIFIC COMMITTEE

Toni Dovenski, Vitomir Ćupić, Mladen Gagrić, Selma Filipović, Ivan Ivanov, Ivan Jovanović, Marjan Kosec, Mato Marković, Hrvoje Milošević, Mustafa Podžo, Senad Prašović, Nikola Popović, Branislav Prokić, Zoran Stanimirović, Mirko Šinković, Dragiša Trailović, Plamen Trojačanec

SEKRETARIJAT
SECRETARIAT

Žolt Bečkei, Akoš Budimčević, Milan Jovanović, Zoran Katrinka, Pera Kulešević, Antun Orčić, Slobodan Stevanov, Mirko Šinković, Ružica Trailović, Grgo Tikvicki, Zoran Vučićević, Dragiša Urošević

SEKRETAR
SECRETARY

Milan Jovanović

DATUM I MESTO ODRŽAVANJA
DATE AND PLACE OF THE MEETING

Palić, 18-22. jun 2007.

KARDIOLOŠKI BIOMARKERI U SAVREMENOJ DIJAGNOSTICI

CARDIOLOGICAL BIOMARKERS IN CONTEMPORARY DIAGNOSTICS

P.Stepanović, Zorica Nikolovski Stefanović

Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Srce je do skora uglavnom posmatrano kao specifična efikasna pumpa, međutim, novija istraživanja su pokazala da je ono takođe i važan endokrini organ.

Tokom poslednje decenije uloženi su napor da se kardiološka dijagnostika po uzoru na humanu medicinu, u populaciji kućnih ljubimaca pojednostavi tako, da se analizom pojedinih biohemijskih parametara identifikuju psi i mačke sa još uvek asimptomatičnim oboljenjima srca. U tom pravcu su se razvijali i unapređivali testovi kojima se procenjuju vrednosti natriuretičnih peptida, endotelina, ili troponina. Na osnovu ostvarenog napretka sasvim je izvesno da će putem biohemijskog testiranja uskoro biti moguće da i pojedinci koji nisu prošli kardiološku obuku identifikuju pacijente sa oboljenjem srca u ranijoj fazi oboljenja nego do sada. Ovakvo testiranje će ujedno omogućiti i sprovođenje medicinskog tretmana u ranijim fazama bolesti kada bolest još nije uznapredovala ili je u srednjoj fazi svoga napretka. Biohemijska testiranja takođe mogu da pomognu da se razjasni status onih pacijenata kod kojih su druge dijagnostičke metode dale sumnjive rezultate kao na primer kod pasa velikih rasa kod kojih je radiološki nalaz pokazao „kardiomegaliju“, ili na primer umereno redukovanu kontraktilnost na ehokardiogramu. Neki od ovih očiglednih testova bi bili korisni da se ispituju neke uzgojne linije mačaka koje kroz generacije pokazuju znake hipertrofične kardiomiopatije, kao i asimptomatični doberman za dilatiranu kardiomiopatiju. Za potrebe skrininga, ovi testovi bi morali biti veoma visoko senzitivni, što znači da bi morali da otkriju najmanje 90% pacijenata iz ciljne grupe. Testovi bi takođe morali da imaju i razuman stepen specifičnosti, jer ova populacija životinja posledično zahteva i drugu vrstu procene stanja, kao što je protokol pregleda koji podrazumeva procenu čitavog niza hematoloških i biohemijskih parametara, radiološke snimke, EKG i ehokardiografsku dijagnostiku, što sve zajedno predstavlja značajan trošak za vlasnika u toku postavljanja dijagnoze. Zahtevani nivo specifičnosti ovih testova je diskutabilan, a po nekim dosadašnjim standardima se smatra da je test upotrebljiv ukoliko mu specifičnost dostiže 70 %. Da bi nešto moglo da postane biološki marker mora da ima

„karakteristike koje mogu da se objektivno mere i procenjuju kao indikator normalnog biološkog procesa, patogenog procesa, ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju“.²²

Patofiziološke osnove za pravljenje skrining testova u kardiologiji

Klinički sindrom kongestivne srčane slabosti se karakteriše povećanim perifernim otporom, redukovanim srčanim učinkom i povećanim venskim pritiskom punjenja. Povišen periferni vaskularni otpor je posledica povišenog tonusa simpatikusa i povišene koncentracije u plazmi; norepinefrina, angiotenzina II, arginina, vazopresina i endotelina. Upravo su to produkti srca u okviru njegove endokrine funkcije, čijom analizom možemo doći do precizne procene stepena oštećenja miokarda. Oslobađanje natriuretičnih peptida je jako povišeno kod bolesti koje se karakterišu povećanjem volumena fluida, uključujući slabost srca, otkazivanje bubrega i cirozu jetre. Koncentracije natriuretičnih peptida u plazmi, ANP i BNP, rastu i kod pacijenata sa hroničnom slabošću srca, uglavnom kao odgovor na predkomornu distenziju i stres ventrikularnog zida. Natriuretični peptidi su prirodni antagonisti reninangiotenzin-aldosteron sistemu (RAAS) i njihova uloga u regulaciji balansa fluida se pojavljuje kao izuzetno važna kod pacijenata sa hemodinamičnim stresom, kao što je to slučaj kod slabosti srca.

BNP i njihovi srodni peptidi: Ovi srčani, natriuretični peptidi su prvobitno otkriveni u mozgu svinja pa otuda i naziv BNP (brain natriuretic peptide). Međutim, sada je jasno da se BNP delimično sekretuje i od strane srca, naročito od strane leve komore, i stoga BNP i Nt-pro BNP kitovi pokazuju bolje dijagnostičke rezultate i kliničke mogućnosti kao prognostički markeri kod pacijenata sa slabošću srca nego drugi natriuretički peptidi. Kako se komore srca tokom procesa kompenzacije skupljaju (stres zida), BNP se sintetiše kao prohormon tj. Pro-BNP, sekretuje se u krvni tok i pretvara u Nt-proBNP i BNP. Međutim, BNP ima kratak poluživot u plazmi a takođe se pojavljuje i u nižim koncentracijama nego Nt-proBNP. Iz tog razloga je razvijen test za detekciju Nt-proBNP sa zadatkom da se iskoristi njegov duži poluživot i viša koncentracija u plazmi.

Nedavne studije koje su izvedene na humanim pacijentima sa oboljenjem srca su pokazale da koncentracije ANP i BNP u plazmi mogu biti upotrebljene da se predvidi težina oboljenja, mogućnost mortaliteta, za monitoring terapije, i za identifikaciju pacijenata sa asimptomatičnom disfunkcijom leve komore. Slična uloga se nazire i prilikom analize koncentracije endotelina u plazmi. Akutna ili hronična oštećenja srca indukuju oslobađanje subjedinica troponin kompleksa u cirkulaciju, gde njihovi nivoi treba da budu proporcionalni težini oštećenja srca.

Cirkulišući ANP i BNP kod humanih pacijenata se smatraju naročito korisnim u urgentnim stanjima gde imaju veliki dijagnostički i prognostički značaj kao markeri kongestivnog oboljenja

srca. Gottlieb et al. je saopštio da merenje koncentracije (C-terminalnog) ANP-a omogućava davanje prognoze za preživljavanje, procenu postojanja ventrikularne ektopije i hemodinamičkih abnormalnosti. Davis et al. je identifikovao ANP kao specifičan i senzitiv test za procenu hronične slabosti srca kod starijih pacijenata. Lerman et al. je saopštio da NT-ANP, koji se eliminiše mnogo sporije i mnogo je stabilniji od aktivnog C-terminalnog ANPa, predstavlja mnogo superiorniji marker asimptomatične disfunkcije leve komore od C-aktivnog oblika. Davis et al. je saopštio da su se povišene koncentracije BNP-a pokazale kao odličan marker za razlikovanje kardijačne i nekardijačne dispneje. Nedavno, Richards et al. je saopštio da N-terminalni BNP meren 2 do 4 dana posle infarkta miokarda nezavisno pokazuje stanje funkcije leve komore i može da ukaže na preživljavanje u trajanju do 2 godine. U studijama koje je objavio Yamato et al., BNP se pojavljuje kao odličan i u N-terminalnom i u C-terminalnom obliku bio marker ventrikularne sistolne ili dijasolne disfunkcije i ventrikularne hipertrofije kod pacijenata sa, ili koji su u riziku za neko srčano oboljenje. Još u novembru 2000. godine je odobren prvi klinički BNP kit za upotrebu u bolničkim uslovima, za svrhe brzog identifikovanja onih humanih pacijenata koji imaju veliku verovatnoću da boluju od nekog prikrivenog kardiološkog oboljenja. U nedavnim studijama na humanim pacijentima sa kongestivnom slabošću srca, izmerene koncentracije natriuretičnih peptida su bile iskorišćene za procenu medicinske terapije. Bilo je manje štetnih posledica kod pacijenata koji su testirani i vođeni procenom BNP-a nego kod pacijenata čija je terapija vođena samo kliničkom procenom.

Na kućnim ljubimcima je urađen veći broj studija koje su pokazale da su natriuretični peptidi u korelaciji sa klasom srčane slabosti kod pasa i da njihovo merenje može da omogući veterinarima da vlasnicima životinja ponude tračnu i dugotrajnu prognozu. Kitovi za određivanje koncentracije natriuretičnih peptida takođe mogu da se upotrebe i za monitoring efikasnosti primenjene terapije. Koncentracije ANP-a se povećavaju kod pasa sa mitralnom regurgitacijom, dirofilariozom i kod kongestivne srčane slabosti. Haggstorm et al. je predočio da nivoi BNP-a kod Cavalier King Charles španijela koji imaju mitralnu regurgitaciju ne rastu tako dramatično kao kod ljudi sa ishemičnim ili drugim tipovima miokardijalnog oboljenja, i da NT-ANP bolje reflektuje jačinu mitralne regurgitacije.

Test koji se nedavno pojavio a zove se „Canine CardioSCREEN Nt-pro BNP test“, je procenjen od strane Royal Veterinary College zajedno sa još 4 specijalistička kardiološka centra u Velikoj Britaniji. Sakupljeni su uzorci od 90 pasa čiji je status bio sledeći:

- 13 normalnih
- 18 sa respiratornim oboljenjima
- 59 sa oboljenjima srca od kojih:
 - 33 sa slabošću srca i

- 26 sa oboljenjima srca bez simptoma slabosti
-

Njčešća oboljenja su bila:

- 10 mitralnih poremećaja
- 18 dilatiranih kardiomiopatija

Sve dijagnoze su bile potvrđene Rentgenografski, Ehokardiografski i/ili putem EKG-a. Uzorke je pod šiframa testirao proizvođač navedenog testa i slao rezultate Rojal koledžu na interpretaciju. Rezultati su pokazali da se testirani serumi prema dobijenim rezultatima mogu podeliti u 3 grupe koje pokazuju tri definisane granice. Poređenjem sa ranije postavljenim dijagnozama pokazalo se da je pouzdanost testa 95%.

Izmerene vrednosti na testu i njihovo tumačenje

Respiratorno/nomalno	nema oboljenja srca	= < 210 pmol/ml
Oboljenje srca	otsustvo klin. simptoma	= > 210 i < 1000 pmol/ml
Slabost srca	prisutni klinički simptomi	= > 1000 pol/m

Endotolelin (EP-1) je potentni 21 aminokiselinski vazokonstriktivni peptid koji se produkuje od strane vaskularnog endotela i srca gde je konvertovan iz 38-39 aminokiselinskog peptida (veliki ET-1) aktivnošću endotelin konvertujućeg enzima (ECE). Dva sub-tipa receptora za endotelin, ETA-R i ETB-R vrše medijaciju aktivnosti ET-1. Tip A receptora (ETA-R) vrši medijaciju vazokonstrikcije i proliferacije glatkih mišića, dok se mnogo kompleksniji tip B-receptora (ETB-R) javlja da antagonizuje te efekte. Hronično uvećanje ET-1 tokom razvoja srčane slabosti kod pacijenata dovodi do povećanja sistemskog vaskularnog otpora, indukuje hipertrofiju vaskularnih glatkih mišića i stimuliše hipertrofiju miokarda.

Prošek i saradnici su saopštili nalaze studije koja se odnosila na imunoreaktivnost endotelina u plazmi mačaka. Prema njihovim rezultatima, mogu se izvesti veoma upotrebljivi zaključci. Kao prvo, oni su izvršili validaciju ELISA testa za endotelin kod mačaka. Drugo, oni su pokazali da postoji signifikantan rast imunoreaktivnosti u grupi mačaka sa oboljenjem miokarda, kako kod mačaka sa, tako i kod onih bez prisutnih simptoma slabosti srca, u odnosu na normalne mačke iz kontrolne grupe. Nalaz povišenih vrednosti endotelina potvrđuje da je sistem endotelina aktiviran te da postoji slabost srca kod mačaka, kao što je to slučaj i kod drugih sisara. To znači da se ovaj test pokazao kao validan kod obolelih mačaka, što na žalost nije slučaj kod humanih pacijenata, jer terapijske modifikacije koje su vršene na osnovu promene koncentracije endotelina u plazmi ljudi, nisu dale zadovoljavajuće rezultate, niti je došlo do poboljšanja u preživljavanju kako su se istraživači nadali. Bližom analizom rezultata ove studije se vidi da postoji zabrinjavajuće preklapanje između nivoa endotelina koji su izmereni kod afektovanih i neafektovanih jedinki.

Zbog toga, još uvek nije moguće da se merenje imunoreaktivnosti endotelina izvede tako da ono predstavlja dijagnostički test. To naravno ne znači da je merenje imunoreaktivnosti endotelina potpuno neupotrebljivo. Kao što smo videli, vremenom je istraživanje različitih biohemijskih parametara dovelo do rezultata da oni na kraju postanu i bio markeri. Štaviše, većina njih su u početku predstavljali potencijalne biomarkere, da bi kasnije pronalaskom specifičnih subjedinica ili subpopulacija proteina došlo do njihove pouzdane upotrebe u dijagnostici. S obzirom da su i natriuretični peptidi u početku bili nedovoljno specifični, tako se nadamo i da će endotelin ili markeri aktivnosti endotelin sistema, ubrzo postati superiorni indikatori za dijagnostiku i prognozu kod mačaka, ako ništa drugo, prvi koraci u tom smeru su već napravljeni.

Kardijačni troponini. Kardijačni troponin kompleks se sastoji od tri subjedinice (I, T i C), koje vrše regulaciju ekscitacija-kontrakcija spojnice sarkomernih proteina. Akutna i hronična povreda srca indukuje oslobađanje ovih subjedinica u cirkulaciju, gde su njihovi nivoi proporcionalni težini oštećenja miokarda. Markeri kao cTnI i cTnT su pokazali veću specifičnost za oštećenje miokarda nego predhodno korišćeni enzimski markeri kao što su laktat dehidrogenaza i kreatin kinaza-MB. U slučajevima sumnje na traumu miokarda od akutnog infarkta miokarda, merenje serumskih cTnT i/ili cTnI nivoa se danas smatra dijagnostičkim standardom za procenu. Koncentracije kardijačnog troponina u cirkulaciji su takođe korišćene za procenu oštećenja miokarda kod ljudi koja su imala hroničan tok kao kod dilatirane kardiomiopatije, hipertrofične kardiomiopatije, traume, miokarditisa, aritmija i sistemske hipertenzije.

Nivo izmerenih kardijačnih troponina u cirkulaciji pasa sa prirodno nastalim oboljenjem miokarda do skora nije bio dovoljno ispitan i ustanovljen.

Kardijačni troponini se danas koriste u neinvazivnoj dijagnostici kod obe vrste kardijačnih povreda (neishemičnih i ishemičnih). Primena kardijačnih troponina kao neprocenjivog biohemijskog markera sa visokom specifičnošću za miokard je bila predhodno ispitana na uobičajenim kućnim ljubimcima i laboratorijskim životinjama kao što su pas, magarac, svinja i pacov i normalne vrednosti za cTnI su bile ustanovljene za pse koji se drže kao kućni ljubimci. Prema uputima dve važne institucije iz ove oblasti (National Academy of Clinical Biochemistry i International Federation of Clinical Chemistry), danas se kardijačni troponin I i T smatraju novim "zlatnim markerima" za procenu težine ishemične miokardijalne povrede u humanoj medicini.

Kardijačni troponini su kontraktilni proteini locirani u svakom pojedinačnom miofibrilnom vlaknu i egzistiraju kao različiti izotipovi koji variraju između kardijačne i skeletne muskulature. Ovi ključni proteini su integralni deo sarkomerne jedinice, koja uključuje aktin, miozin, tropomiozin i troponin I, T i C. Troponin-kompleks uključuje proteine koji su umešani u proces kontrakcije i relaksacije miofibrila, i pokazuju jednostavnu distribuciju tkivnih izotipova. Kardijačni troponin I je unikatno smešten u miokardijum, gde je jedini postojeći izotip. Budući da

on nije nađen u skeletnoj muskulatri to znači da je on 100% specifičan za srce. Ustanovljena je uniformna distribucija cTnI u atrijalnoj i ventrikularnoj muskulaturi miokarda u svim starosnim kategorijama. Nivo cTnI postaje povišen u plazmi u prvim časovima nakon kardijačne povrede, sa pikom po isteku prvog dana i ostaje povišen nešto duže od nedelju dana nakon inzulta. Za cTnI je potvrđen senzitivitet do 97% i specifičnost do 95%.

Istraživanja na kućnim ljubimcima: Kardijačni troponini su u proteklih 5 godina postali prilično popularni za istraživanje u veterinarskoj medicini koja se bavi zdravljem kućnih ljubimaca. Studije su se uglavnom fokusirale na otkrivanje promena nivoa kardijačnih troponina tokom različitih patoloških stanja. Uloga cTnI kao upotrebljivog biohemijskog markera za obim povrede miokardijalnih ćelija je bila proučavana od strane više istraživačkih grupa. Procena cTnI nivoa je bila izvršena kod pasa sa različitim tipovima oboljenja srca kao što su; endokardioza, dilatirana kardiomiopatija, miokarditis, i perikarditis. Nivoi cTnI and cTnT su takođe procenjivani u studijama kod pasa sa blunt traumom grudnog koša i gastričnom dilatacijom i volvulusom. Promene su procenjivane i kod pasa sa infektivnim bolestima, kao što su: *Babesiosis* i *Ehrlichia canis*. Za nas je važna pilot studija koja je analizirala promene cTnI nivoa u grupi pasa sa perikardijalnim efuzijama različite etiologije. Takođe, cTnI je bio procenjen i kod mačaka sa hipertrofičnom kardiomiopatijom. Generalni zaključak koji se bazira na studijama koje su trenutno dostupne je da su kardijačni troponini vrlo upotrebljivi markeri za procenu oštećenja miokarda kod pasa, i da je cTnI mnogo senzitivniji marker miokardijalnog oštećenja u poređenju sa cTnT. Ovi studije takođe ukazuju da se i mačke sa hipertrofičnom kardiomiopatijom mogu otkriti na osnovu oštećenja miokarda na osnovu nivoa troponina.

O Brien et al. je sproveo nekoliko studija koje su imale za cilj da utvrde specifičnost troponina I i troponina T (cTnI i cTnT) u odnosu na troponine iz skeletne muskulature kod pasa. Sleeper et al. je nedavno publikovao normalne vrednosti za plazma troponin I u cirkulaciji pasa i mačaka. Schober et al. je našao povišene koncentracije troponina kod mačaka sa kardiomiopatijama i kod pasa sa dilatiranom kardiomiopatijom ili sumnjom na kontuziju miokarda. Nedavne studije Lobetti et al. indikuju da cTnI reflektuje težinu oštećenja miokarda tokom pseće Babezioze.

Zaključak: Izgledi da dođemo u mogućnost da diferenciramo pse i mačke sa obolelim srcem od onih sa primarnim respiratornim oboljenjima ili nekim drugim poremećajem, putem jeftinih kitova na bazi analiza krvi, uvek je zanimalo veterinare koji su imali potrebu za ovakvim analizama u kliničkoj praksi. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, sasvim je izvesno da će u bližoj budućnosti veterinari koristiti jedan ili više kitova u kombinaciji, za postavljanje ili potvrđivanje kliničke dijagnoze slabosti srca, što će biti od značajne pomoći u diferencijaciji pasa koji imaju primarno respiratorno oboljenje, od onih sa kardijačnim oboljenjima, ili će na osnovu dobijenih

rezultata biti u mogućnosti da procene štetu koja bi nastala u toku razvoja nekog kardiološkog oboljenja. Osim toga, već je postalo izvodljivo da pomenuti postavljeni zadaci mogu biti ostvareni na licu mesta jer su postojeći testovi jednostavni, slični postojećim testovima za dirofilariozu, FELV/FIV infekcije mačaka.

LITERATURA:

1. Chen HH and Burnett JC.; The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials. *Proc Am Assoc of Am Phys* 1999; 111:406-16.
2. Davis M, et al. Plasma brain natriuretic peptide in assessment of acute dyspnea. *Lancet* 1994;343:440-444.
3. Muders F, et al., Evaluation of plasma natriuretic peptides as markers for left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1997; 134:442-49.
4. McDonagh TA, et al., Biochemical detection of left ventricular systolic dysfunction. *Lancet* 1998; 351:9-13.
5. Hasegawa K, et al.; Ventricular expression of brain natriuretic peptide in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1993; 88: 372-80.
6. Yamamoto K et al.; Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 1996; 28: 988-94.
7. Gottlieb SS et al.; Prognostic importance of atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:1534-39.
8. Haggstorm J et al.; Plasma concentration of atrial natriuretic peptide in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniels. *Am J Vet Res* 1994; 55:698-703.
9. Haggstorm J et al.; Effects of naturally acquired decompensated mitral valve regurgitation on the RRA system and ANP concentration in dogs. *Am J Vet Res* 1997; 58:77-82.
10. Troughton RW, et al.; Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000; 355: 1126-30.
11. Murdoch DR, et al. Brain natriuretic peptide is stable in whole blood and can be measured using a simple rapid assay: implications for clinical practice. *1997 Heart* 78:594-97.
12. Buckley MG, et al. Cardiac peptide stability, aprotinin and room temperature: importance for assessing cardiac function in clinical practice. *Clin Sci* 1999; 97:689-95
13. Zolk O, et al. Expression of endothelin-I, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure. *Circulation* 1999; 99(16): 2118-23.
14. Ricchiuti V, et al. Cardiac troponin I and T alterations in dog hearts with myocardial infarction: correlation with infarct size. *Am J Clin Pathol* 1998; 110:241-247.
15. Siciliano M, et al. Troponin I serum concentration: a new marker of left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Ital Heart J* 2000; 1 :532-535.
16. Sato Y, et al. Persistently increased serum concentrations of cardiac troponin in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy are predictive of adverse outcomes. *Circulation* 2001; 103:369-373.
17. O'Brien PJ, et al. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. *Clin Chem* 1997; 43:2333-2338.
18. Sleeper MM, et al. Cardiac troponin I in the normal dog and cat. *J Vet*

Intern Med 2001 Sep-Oct; 15(5): 501-3 19. Lobetti R, et al. Cardiac troponins in canine babesiosis. J Vet Intern Med 2002 Jan-Feb; 16(1): 63-8 20. Shober KE et al. Circulating cardiac troponins in small animals. 19th Annual ACVIM Proceedings, 2001. pp 91-92. 21. Boswood A., et al. The Rise and Fall of the Cardiac Biomarker, J Vet Intern Med 2004;18: 797-799. 22. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther. 2001;69:89-95. 23. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined-A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2000;36:959-969. 24. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med. 2002;347:161-167. 25. Baughman KL. B-Type Natriuretic peptide-A window to the heart. N Engl J Med. 2002;347:158- 159. 26. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA. Measurement of plasma endothelin immunoreactivity in healthy cats and cats with cardiomyopathy. J Vet Intern Med. 2004;18:826-830. 27. Selva is PL, Robert A, Ahn S. Direct comparison between endothelin-1, N-terminal proatrial natriuretic factor, and brain natriuretic peptide as prognostic markers of survival in congestive heart failure. J Card Fail. 2000;6:201-207. 28. Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. J Vet Intern Med.2004;18:831-839.