

**Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej**

PRACA DOKTORSKA

Doctoral thesis

**Ocena parametrów czerwonych krwinek oraz gospodarki żelazowej
u psów z niewydolnością serca.**

Assessment of red blood cell parameters and iron metabolism in dogs with heart failure.

mgr inż. Ewa Kumiega

Promotor

prof. dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak

Zakład Medycyny Translacyjnej
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotor pomocniczy

dr Monika Kasztura

Zakład Higieny Surowców Zwierzęcych
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WROCLAW 2023

Streszczenie

Choroba zwyrodnieniowa zastawki mitralnej serca (DMVD, *ang. degenerative mitral valve disease*), należy do najczęstszych schorzeń układu krążenia prowadzących do niewydolności serca (NS, HF, *ang. heart failure*), głównie u psów małych ras. Cechuje ją długi, bezobjawowy okres rozwoju, przez co jej rozpoznanie i prawidłowe leczenie, głównie farmakologiczne, rozpoczyna się zwykle w zaawansowanym stadium. Podstawą rozpoznania jest obecność typowego szmeru holosystolicznego w badaniu klinicznym oraz potwierdzenie w badaniu echokardiograficznym zmian zwyrodnieniowych zastawki mitralnej, które prowadzą do jej niedomykalności.

Niedomykalność zastawki mitralnej występuje również u ludzi, u których dostępna jest możliwość leczenia chirurgicznego. Często, choć nie zawsze, współistnieje z niewydolnością serca, której towarzyszą, *min.* duszność i nietolerancja wysiłku oraz niedobór żelaza lub/i anemia. Ocena gospodarki żelaza, podobnie jak sprawdzenie stężenia troponin czy NT-proBNP, u chorych z NS należy dziś do kanonu badań diagnostycznych. Co istotne, niedobór żelaza może występować bez pojawienia się anemii w przebiegu całej choroby, poczynając od jej początkowej fazy. Fenomen tego zjawiska jest wciąż mało poznany, a przez wiele lat uważano, że niedoborowi żelaza musi towarzyszyć anemia. Mimo że, u ludzi z NS korelacja pomiędzy niedoborem żelaza a brakiem anemii jest tematem szczegółowo zgłębianym od wielu lat, to w przypadku psów problem ten nie był prawie w ogóle badany. Niewątpliwie, badania porównawcze na modelach zwierzęcych mogą przyczynić się do zrozumienia tego zjawiska u wszystkich gatunków.

Przeprowadzone przeze mnie badania na populacji 68 psów, miały na celu: ocenę parametrów gospodarki żelaza w surowicy wraz ze szczegółową oceną erytrocytów i retikulocytów we krwi obwodowej. Zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Weterynaryjnego Stowarzyszenia Chorób Wewnętrznych (ACVIM, *ang. American College of Veterinary Internal Medicine*) chore zwierzęta (n= 56) sklasyfikowano, odpowiednio do grup: B1 (n= 9), B2 (n=10), C (n=27) i D (n=10), w zależności od stadium zaawansowania choroby. Do grupy kontrolnej (A) włączono 12 zdrowych zwierząt.

Podstawowe parametry gospodarki żelaza u psów, takie jak: stężenie żelaza i utajoną zdolność wiązania żelaza (UIBC, *ang. unsaturated iron binding capacity*), zbadano w surowicy krwi, przy pomocy standardowo używanego w medycynie weterynaryjnej analizatora

biochemicznego (Konelab Prime 30i, Thermo Scientific), z zastosowaniem reakcji fotometrycznej z Ferene S. Na podstawie tych wyników wyliczono: całkowitą zdolność wiązania żelaza (TIBC, ang. *total binding iron capacity*;) i wysycenie transferyny (%SAT (ang. *transferrin saturation*)). Dodatkowo zbadano: stężenie ferrytyny techniką ELISA oraz metodą immunoturbidymetryczną oraz stężenie transferyny techniką ELISA. Natomiast stężenie rozpuszczalnego receptora transferynowego (sTfR, ang. *soluble transferrin receptor*) oraz lekkiego i ciężkiego łańcucha ferrytyny - techniką Western Blot. Należy podkreślić, że w odróżnieniu od standardowych badań stosowanych w diagnostyce człowieka, ocena tych białek nie jest zaliczana do rutynowych analiz zleczanych przez lekarzy weterynarii u psów.

Za pomocą różnych technik barwienia rozmazu ręcznego oceniono: retikulocyty i erytrocyty. Odsetek retikulocytów policzono przyżyciowo, po uprzednim wybarwieniu błękitem brylantowo-krezyłowym. Dojrzałe erytrocyty oceniono pod względem wielkości i kształtu. W tym przypadku zastosowano podwójne barwienie: May-Grünwalda i Giemsy. Pozostałe parametry czerwonych krwinek, takie jak: RBC (ang. *red blood cell*), HT (ang. *hematocrit*), RDW (ang. *red cell distribution width*), HGB (ang. *hemoglobin concentration*), MCH (ang. *mean corpuscular hemoglobin*), MCHC (ang. *mean corpuscular hemoglobin concentration*) mierzono dwukrotnie, przy pomocy analizatorów hematologicznych wykorzystujących następujące techniki pomiarowe: impedancję elektryczną i laserową cytometrię przepływową. Miało to na celu szczegółową ocenę wyżej wymienionych składników morfotycznych krwi.

U 12,5% chorych psów z zaawansowaną chorobą stwierdzono niedobór żelaza. Zatem, niewydolności serca u psów, podobnie jak u ludzi, towarzyszą zaburzenia w gospodarce żelaza. Jednak, u chorych zwierząt pojawiają się znacznie później i są mniej wyrażone. Wyzwaniem badawczym było znalezienie tanich i dostępnych markerów wskazujących na wczesny, subkliniczny niedobór żelaza. Stwierdzono, że są nimi: anizocytoza oraz poikilocytoza erytrocytów uwidocznione w obrazie mikroskopowym z rozmazów ręcznych krwi. W przebiegu niedomykalności zastawki mitralnej pojawienie się tych cech wyprzedza zmiany w parametrach czerwonych krwinek standardowo ocenianych przy pomocy analizatorów diagnostycznych.

Słowa kluczowe: status żelaza, anizocytoza, poikilocytoza, choroba zastawki mitralnej, psy.

Abstract

Degenerative mitral valve disease (DMVD) is one of the most common cardiovascular diseases leading to heart failure (HF) especially in small breed dogs. It is characterized by a long, asymptomatic period of development, which is why its diagnosis and proper treatment, mainly pharmacological, usually begins at an advanced stage of the disease. The diagnosis is based on the presence of a typical holosystolic murmur in a clinical examination and the confirmation of degenerative changes of the mitral valve on echocardiography which lead to its regurgitation.

Mitral regurgitation also occurs in people for whom surgical treatment is available. Often, but not always, it coexists with heart failure, which is accompanied by, among others, shortness of breath and exercise intolerance as well as iron deficiency and/or anemia. The assessment of iron metabolism, as well as checking the level of troponins or NT-proBNP, in patients with HF is now an important diagnostic test. Importantly, iron deficiency can occur without the appearance of anemia, throughout the course of the disease, starting from its initial phase. The uniqueness of this phenomenon is still little known and for many years it was believed that iron deficiency must be accompanied by anemia. Although in humans with HF the correlation between iron deficiency and the absence of anemia has been a topic studied in detail for many years, in the case of dogs, this problem has hardly been studied at all. Undoubtedly, comparative research on animal models can contribute to understanding this phenomenon in all species.

The research I have conducted on the population of 68 dogs were aimed at: assessing the parameters of serum iron metabolism, and a detailed assessment of erythrocytes and reticulocytes in peripheral blood. According to the recommendations of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), sick animals (n= 56) were classified into groups: B1 (n= 9), B2 (n=10), C (n =27) and D (n=10), depending on the stage of the disease. Twelve healthy animals were included in the control group (A).

The basic parameters of iron metabolism in dogs, such as: iron concentration and UIBC (*unsaturated iron binding capacity*), were tested in blood serum using a standard biochemical analyzer used in veterinary medicine (Konelab Prime 30i, Thermo Scientific), using the photometric reaction with Ferene S. Based on the results, TIBC (*total binding iron capacity*) and %SAT (*transferrin saturation*) were calculated. Additionally, the concentration of ferritin

was tested by the ELISA and immunoturbidimetric technique and transferrin was tested by the ELISA technique. Whereas, the concentration of sTfR (*soluble transferrin receptor*) and ferritin light and heavy chain – the Western Blot technique. It should be emphasized that, unlike standard tests used in human diagnostics, the evaluation of these proteins is not included in the scope of routine analyses ordered by veterinarians in dogs.

Reticulocytes and erythrocytes were assessed using various manual smear staining techniques. The percentage of reticulocytes was counted after staining with brilliant cresyl blue. Mature erythrocytes were assessed for size and shape. In this case May-Grünwald and Giemsa double staining was used. Other red blood cell parameters, such as: RBC (*red blood cell*), HT (*hematocrit*), RDW (*red cell distribution width*), HGB (*hemoglobin concentration*), MCH (*mean corpuscular hemoglobin*), MCHC (*mean corpuscular hemoglobin concentration*) were tested twice, using hematology analyzers using the following measurement techniques: electrical impedance and laser flow cytometry. It was aimed at a detailed assessment of the above-mentioned morphotic components of the blood.

12.5% of studied dogs with advanced disease were found to be iron deficient. Thus, heart failure in dogs, as in humans, is accompanied by disturbances in iron metabolism. However, in sick animals they appear much later and are less pronounced. The research challenge was to find cheap and accessible markers indicating early, subclinical iron deficiency. They were found to be: anisocytosis and poikilocytosis of erythrocytes, which was visible in the microscopic image from blood smears. In the course of mitral regurgitation, the appearance of these features precedes changes in red blood cell parameters, which are usually assessed with diagnostic analyzers.

Key words: iron status, anisocytosis, poikilocytosis, mitral valve disease, dogs