

**Bestimmung von “Brain Natriuretic Peptide“ (BNP)
bei gesunden Hunden**

Katrin Tietgen

Aus der
Medizinischen Kleintierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann

angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Johannes Hirschberger

**Bestimmung von Brain Natriuretic Peptide (BNP)
bei gesunden Hunden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Katrin Tietgen
aus Wolfratshausen
München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Andreas Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Johannes Hirschberger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Hermann Ammer

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meiner lieben Familie und meinem Freund Chri

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
I EINLEITUNG	1
II LITERATUR	2
1 GENETIK UND MOLEKULARBIOLOGIE VON BNP	2
2 SYNTHESE VON BNP	4
3 SEKRETION VON BNP IN DAS PLASMA	5
4 STIMULATION DER AUSSCHÜTTUNG UND SYNTHESE VON BNP	6
4.1 Mechanische Reize	7
4.2 Neuroendokrine Stimuli	8
4.3 Medikamente	9
5 REZEPTOREN	9
5.1 cGMP-abhängige Rezeptoren	10
5.2 cGMP-unabhängige Rezeptoren	12
6 ABBAU DER NATRIURETISCHEN PEPTIDE	14
7 PHYSIOLOGISCHE WIRKUNGEN VON BNP	14
7.1 Kardiovaskuläre Wirkungen	14
7.2 Renale Wirkungen	18
7.3 Wirkungen im zentralen Nervensystem	20
8 MESSUNG VON BNP	21
8.1 Blutentnahme und Stabilität	21
8.2 Physiologische Konzentrationsschwankungen von BNP	21
8.3 Methoden zur Bestimmung von BNP	22
9 KLINISCHE BEDEUTUNG VON BNP IN DER HUMANMEDIZIN	23
9.1 Diagnose von kardialen Erkrankungen anhand von BNP Werten	23
9.2 BNP als prognostischer Marker	31
10 KLINISCHE BEDEUTUNG VON BNP IN DER TIERMEDIZIN	32
11 BEDEUTUNG VON BNP FÜR DIE THERAPIE VON HERZKRANKHEITEN	33
11.1 Die Verabreichung von BNP als Therapie	33
11.2 Hemmung des Abbaus von BNP	34
11.3 Therapiemodifikationen anlehnend an BNP Konzentrationen	35
11.4 Wechselwirkung zwischen BNP und Herzmedikamenten	36
III MATERIAL UND METHODEN	37
1 PATIENTENGUT	37
2 UNTERSUCHUNG	41
2.1 Klinische Allgemeinuntersuchung	41
2.2 Echokardiographische Untersuchung	41
3 PROBENVERARBEITUNG	43
3.1 Probenentnahme	43
3.2 Probenaufbereitung	44

4	<u>DURCHFÜHRUNG DES TESTS</u>	44
4.1	<u>BNP-Extraktion</u>	44
4.2	<u>Radioimmunoassay</u>	45
5	<u>VALIDIERUNG DES RADIOIMMUNOASSAYS</u>	49
5.1	<u>Allgemeines</u>	49
5.2	<u>Präzision</u>	50
5.3	<u>Richtigkeit</u>	51
5.4	<u>Sensitivität</u>	52
5.5	<u>Spezifität</u>	52
5.6	<u>Stabilität</u>	52
5.7	<u>Plausibilität</u>	53
6	<u>STATISTISCHE AUSWERTUNG</u>	53
III	<u>ERGEBNISSE</u>	54
1	<u>VALIDIERUNG DES RADIOIMMUNOASSAYS</u>	54
1.1	<u>Prüfung der Präzision</u>	54
1.2	<u>Prüfung der Richtigkeit</u>	55
1.3	<u>Prüfung der Sensitivität</u>	58
1.4	<u>Prüfung der Spezifität</u>	58
1.5	<u>Prüfung der Stabilität</u>	59
1.6	<u>Prüfung der Plausibilität</u>	60
2	<u>ANALYSE DER MESSWERTE</u>	61
2.1	<u>Deskriptive Statistik</u>	61
2.2	<u>Erstellung des Regressionsmodells mit Parameterschätzung</u>	75
2.3	<u>Erstellung der Referenzwerte</u>	81
IV	<u>DISKUSSION</u>	82
1	<u>ANALYTISCHE ZUVERLÄSSIGKEIT DES RADIOIMMUNOASSAYS (BNP-32 CANINE RIA KIT, PHOENIXPEPTIDE, BELMONT, USA)</u>	82
1.1	<u>Präzision</u>	82
1.2	<u>Richtigkeit</u>	83
1.3	<u>Sensitivität</u>	84
1.4	<u>Spezifität</u>	84
1.5	<u>Stabilität</u>	85
1.6	<u>Plausibilität</u>	86
2	<u>ZUSAMMENHANG ZWISCHEN BNP UND VERSCHIEDENEN VARIABLEN</u>	87
3	<u>ERSTELLUNG DES REFERENZBEREICHES</u>	88
4	<u>AUSBLICK</u>	90
VI	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	92
VII	<u>SUMMARY</u>	94

VIII **LITERATURVERZEICHNIS**..... 96

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
ACEI	Angiotensin-Konversions-Enzym-Hemmer
ANOVA	Varianzanalyse
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ATP	Adenosin-Triphosphat
AIV	anteriore interventrikuläre Vene
BNP	Brain Natriuretic Peptide
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches 3', 5'-Guanosin-Monophosphat
CNP	C-type Natriuretic Peptide
CW-Doppler	kontinuierliches Dopplerverfahren
DCM	idiopathische dilatative Kardiomyopathie
DOCA-salt	deoxycorticosterone acetate-salt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAR	Ziegen-Anti-Kaninchen IgG Serum
GFR	glomeruläre Filtrationsleistung
GTP	Guanosin-Triphosphat
IVS	interventrikuläres Septum
H ₀	Nullhypothese
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
IRMA	immunoradiometrische Methode
KLD	Kinase-like Domäne
LOQ	Limit of Quantification
LVD	Durchmesser des linken Ventrikels
LVFS	linksventrikuläre segmentale Verkürzungsfraction
LVPW	Durchmesser der freien linksventrikulären Wand
m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure
NEP	neutrale Endopeptidase 24.11
NPR-A	natriuretischer Peptid Rezeptor A
NPR-B	natriuretischer Peptid Rezeptor B
NPR-C	natriuretischer Peptid Rezeptor C

NPR-D	natriuretischer Peptid Rezeptor D
NRS	normales Kaninchenserum
NSB	nicht spezifische Bindungen
NYHA	New York Heart Association
PDE	Phosphodiesterase
PS	Polystyren
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
T ₄	Thyroxin
T ₃	Trijodthyronin
TB	gesamte Bindungen
TC	Total Counts
TFA	Trifluoressigsäure
VK	Variationskoeffizient

I Einleitung

Das Herz als endokrines Organ – diese Funktion wurde 1981 erstmals von De Bold postuliert. Er demonstrierte, dass ein Extrakt des atrialen Muskels, der in Ratten injiziert wurde, zu einer erstaunlichen Natriurese, einem Abfall des arteriellen Blutdruckes und einem Anstieg des Hämatokrits führte. Innerhalb weniger Jahre wurde Atrial Natriuretic Peptide (ANP), das erste natriuretische Peptid, aus den Atrien isoliert und sequenziert (1).

Im Jahr 1988 wurde Brain Natriuretic Peptide (BNP) nach ANP als weiteres Mitglied der Familie der natriuretischen Peptide entdeckt (2). BNP wurde zunächst nur im Gehirn von Schweinen isoliert. Bald zeigte sich, dass eine 100mal höhere Konzentration im Herzmuskel vorliegt (3). 1990 gelang es C-type Natriuretic Peptide (CNP) aus dem Gehirn von Schweinen zu isolieren und sequenzieren (4). Die Entdeckung des neuesten synthetischen vasoaktiven, natriuretischen Peptides wurde 2001 publiziert (5).

BNP stellt ein kardiales Neurohormon dar, das vor allem vom Herzmuskel aufgrund von mechanischen und neuroendokrinen Stimuli ausgeschüttet wird. Die Plasmakonzentration von BNP erhöht sich sowohl bei diastolischer als auch bei systolischer Dysfunktion des Herzens. BNP ist bei Herzerkrankungen als Teil eines sehr frühzeitigen körpereigenen Kompensationsmechanismus zu sehen. Nach Bindung an einen Rezeptor wirkt BNP an der Niere, im zentralen Nervensystem und im kardiovaskulären System.

Plasmaspiegel von BNP werden in der Humanmedizin mittlerweile zur zielgerichteten Diagnosestellung bei Herzerkrankungen verwendet und dienen auch als prognostischer Marker.

Gerade in der Tiermedizin wäre ein biochemisches Screening zur Erkennung von Herzerkrankungen sehr hilfreich, da häufig nur begrenzte diagnostische Möglichkeiten zur Erkennung eines herzkranken Tieres zur Verfügung stehen und die Bestimmung von BNP eine einfache und kostengünstige Variante darstellt. Die Unterscheidung herzgesunder Tiere von Tieren mit asymptomatischen Herzerkrankungen stellt eine attraktive Option dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Referenzwerte von BNP bei herzgesunden Hunden zu etablieren. Zur Bestimmung von BNP wurde ein Radioimmunoassay nach einer Plasmaextraktion des Peptides angewendet. Daneben wurde eine Validierung des Testkits durchgeführt.

II Literatur

1 Genetik und Molekularbiologie von BNP

Kurz nach der Entdeckung von BNP im Gehirn von Schweinen wurde festgestellt, dass die größte Konzentration von BNP im Herz vorliegt (6). Das kodierende Gen für BNP liegt beim Menschen auf dem Chromosom 1, in einer Tandemformation mit dem kodierenden Gen für ANP (7). Das humane und Kanine BNP-Gen besteht aus 3 Exons und 2 Introns (6). Ein charakteristisches Merkmal von BNP ist eine innerhalb vieler Spezies konservierte Ribonukleinsäure (RNA)-Sequenz, die aus sich wiederholenden Einheiten von AUUUA in der 3'-UT Region der BNP-messenger-Ribonukleinsäure (m-RNA) besteht (8). Dies impliziert eine gewisse m-RNA-Instabilität.

Die humane BNP-m-RNA geht während der Translation in einen 134 Aminosäuren PreproBNP-Vorläufer über. Nach einem ersten Processing entsteht daraus nach Abspaltung eines 26-Aminosäuren-Restes das aus 108 Aminosäuren bestehende ProBNP. ProBNP wird in den sekretorischen Vesikeln der atrialen und ventrikulären Myozyten gespeichert. Daraus entsteht während der Sekretion nach Abspaltung des N-terminalen Restes (Aminosäuren 27-102) das biologisch aktive BNP-32 (9). Pemberton zeigte 1997 mit einem Versuchsmodell mit Schafen, dass ausgehend von ProBNP alle weiteren Schritte des Processings zur Zeit der Sekretion erfolgen (10). Im Gegensatz zu ANP sind die Stellen für das posttranslationale Processing bei BNP innerhalb der Spezies nicht konserviert, demzufolge bestehen deutliche Unterschiede in der Aminosäurenlänge von BNP innerhalb der Spezies. Die dominierenden zirkulierenden Formen von BNP bestehen bei Schweinen, Ratten und Hunden ebenso wie Menschen aus 26, 45 und 32 Aminosäuren (9).

Der BNP Promotor enthält sowohl positiv als auch negativ regulierende Elemente. Eine Aktivierung des BNP-Gen-Promotors kann *in vitro* durch mechanische Dehnung und Endothelin induziert werden (11).

Aus biochemischer Sicht besteht BNP-32 aus einer Ringstruktur von 32 Aminosäuren mit einem aminoterminalen und einer carboxyterminalen Anteil. Die Ringstruktur wird von zwei Cysteinresten gebildet. Die Molekularmasse von BNP beträgt 3,7 kilo Dalton.

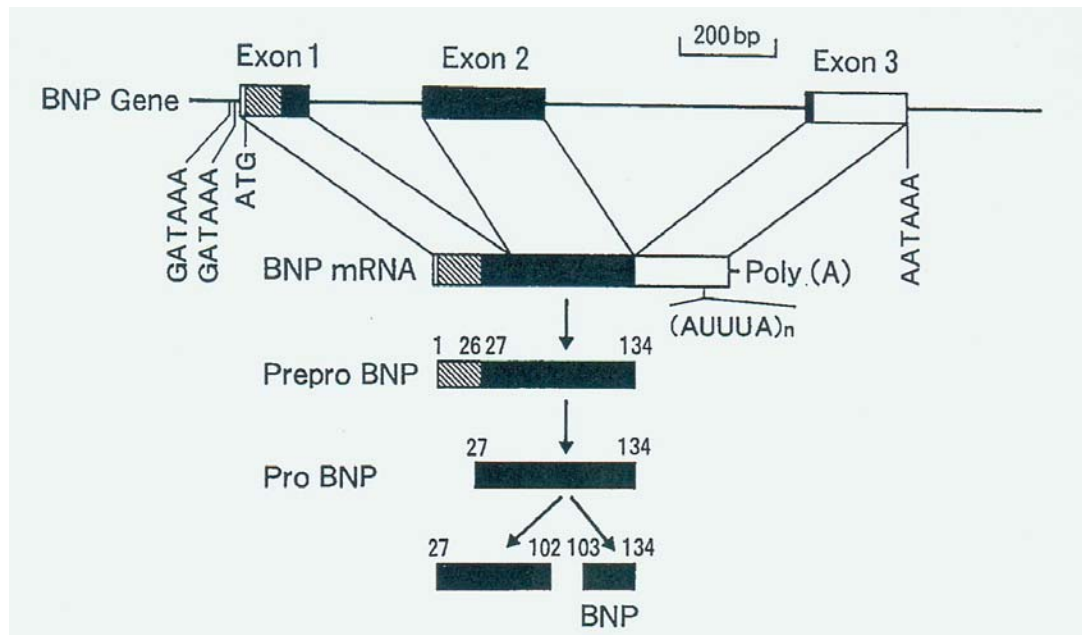


Abbildung 1: Struktur des humanen BNP Gen und seine Biosynthese bis zum reifen Peptid aus Nakao et al. (1992) (9)

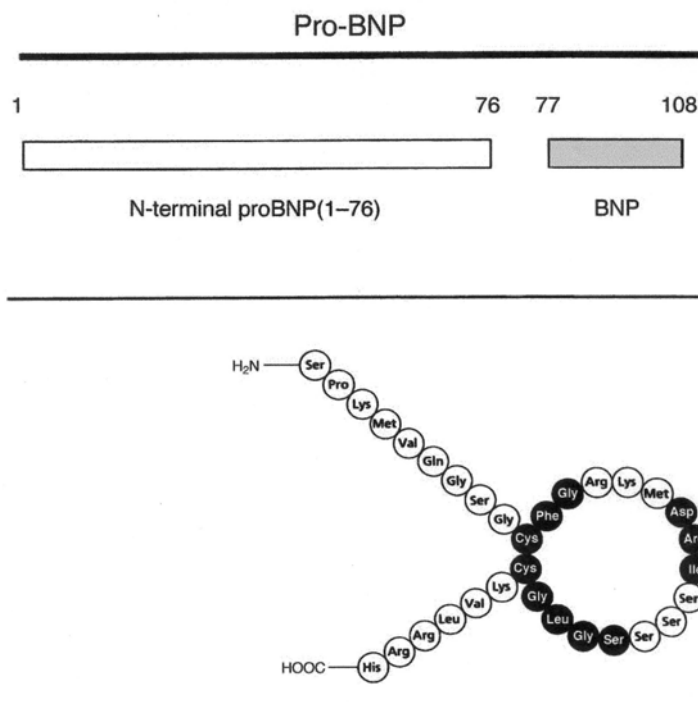


Abbildung 2: Darstellung der biologisch aktiven Formen von BNP (N-terminales BNP und BNP-32), unten die chemische Struktur von BNP-32 aus Nakao et al. (1992) (12)

2 Synthese von BNP

BNP wird im gesunden Herz des Menschen in den atrialen und ventrikulären Myozyten synthetisiert (13). Im Ventrikel kann im Vergleich zum Atrium ungefähr die doppelte Menge an BNP-m-RNA gefunden werden. Dies wird mit der höheren muskulären Masse des Ventrikels begründet (14). Bezüglich der Lokalisation im Atrium zeigten Doyama et al. (1998), dass BNP-m-RNA bei gesunden Menschen hauptsächlich in der subendokardialen Hälfte des rechten Atriums nachzuweisen ist (15).

Bei herzkranken Menschen liegen andere Verhältnisse vor. Die Syntheserate von BNP ist meist in den jeweils spezifischen Arealen der individuellen Herzerkrankung erhöht. So wird z.B. bei Patienten mit primärem Vorhofflimmern BNP vornehmlich im Atrium gebildet, nach Kardioversion des Vorhofflimmerns verringert sich die Produktion von BNP im Atrium wieder in signifikanter Weise (16). Bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (DCM) kann immunohistozytochemisch BNP im Ventrikel nachgewiesen werden (17). Auch bei hypertensiven Ratten war der hypertrophe Ventrikel die Quelle für das zirkulierende BNP (18). Bei einem erhöhten rechtsatrialen Druck ist BNP-m-RNA über das gesamte rechte Atrium verteilt (15). Bei Myokardinfarkten zeigt sich eine erhöhte Konzentration von m-RNA in den ischämischen Bereichen. In einer Studie von Hama et al. (1995) wird berichtet, wie durch operative Ligation der linken Koronararterie bei Ratten ein Myokardinfarkt simuliert wurde, hierbei zeigte sich bereits 4 Stunden nach dem Infarkt eine erhöhte BNP-m-RNA Expression im linken und rechten Ventrikel (19).

Andere Studien zeigen keine Expression von BNP in den Ventrikeln gesunder Menschen (17). So konnten Takemura et al. (1998) keine BNP-m-RNA im Ventrikel gesunder Menschen finden. Bei Patienten mit kardialer Amyloidose wurde in dieser Studie m-RNA in den Ventrikeln nachgewiesen, allerdings nicht bei gesunden Kontrollpatienten (20). Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Expression von BNP im Ventrikel können möglicherweise durch unterschiedliche Nachweismethoden und deren differierende Sensitivität erklärt werden.

Im Gegensatz zum Verhältnis beim Menschen, findet bei gesunden Hunden die Synthese von BNP in den Atrien statt, dabei vor allem im linken Atrium. Untersuchungen bei

Versuchshunden, bei denen durch operative Ligation ein Myokardinfarkt erzeugt wurde, wiesen auch m-RNA in den ischämischen Bereichen des Ventrikels nach (21, 22). Auch Luchner et al. (1998) demonstrierten in einem Tiermodell mit gesunden Hunden und Hunden, bei denen eine Herzinsuffizienz durch eine Erhöhung der Herzfrequenz mithilfe eines Schrittmachers erzeugt wurde, eine veränderte Synthese bei der erkrankten Gruppe. So konnte bei gesunden Hunden eine BNP-Gen-Expression nur im Atrium nachgewiesen werden. Bei kompensierter Herzinsuffizienz zeigte sich nur eine erhöhte BNP-Konzentration in Plasma und Atrium, bei dekompensierter Herzinsuffizienz konnte dagegen eine BNP Gen Expression auch im Ventrikel gefunden werden (23).

Eine Bildung von BNP findet aber auch in anderen Geweben des Körpers statt. Der Grund für die lokale Synthese und die physiologische Wirkung von BNP in nicht-kardialen Geweben bleibt zum Teil noch unklar.

1994 wurde von Lee et al. eine Synthese von BNP im Nebennierenmark nachgewiesen. Erhöhte m-RNA Konzentrationen konnten im Nebennierenmark von Patienten mit Hyperaldosteronismus gefunden werden. Es wird vermutet, dass BNP hier eine Rolle im Wasser- und Elektrolythaushalt spielt oder auch parakrin die adrenokortikale Funktion reguliert (24).

Auch in bestimmten Zelllinien von kleinzelligen Lungentumoren kann BNP-m-RNA gefunden werden (25). Bei Ratten mit obstruktiver Uropathie wird eine lokale Synthese von natriuretischen Peptiden in der Niere beobachtet (26).

In Kulturen von Zellen des proximalen Tubulus der Niere von Ratten kann eine Expression von BNP-m-RNA gesehen werden (27).

3 Sekretion von BNP in das Plasma

ANP und BNP werden in Granula in multipotenten Zellen der atrialen und ventrikulären Kardiozyten gespeichert. Durch immunohistochemische Methoden konnte ein gemeinsames Vorhandensein von ANP und BNP in denselben Granula in der perinukleären Region der Kardiozyten nachgewiesen werden (20, 28). Beide Peptide werden in Form von Vesikeln freigesetzt. Diese Vesikel entstehen aus den unreifen Granula. Die Kapazität der Kardiozyten, BNP nach einer beliebigen Stimulation freizusetzen, hängt hauptsächlich von der Neubildung

der Granula, weniger von der tatsächlich gespeicherten Menge des Peptids ab (29). Im Gegensatz zur Situation bei ANP wird BNP nach der Synthese zu einem geringeren Prozentsatz gespeichert. Vielmehr erfolgt die sofortige Freisetzung in Vesikeln (30). Dies setzt bei erhöhter Freisetzung von BNP auch eine erhöhte Syntheserate von m-RNA voraus.

Bei gesunden Erwachsenen werden die Vesikel pulsatil freigesetzt. Über die Art der Freisetzung bei herzkranken Individuen sind noch keine Studien bekannt. Weitere Studien werden benötigt, um bei eventueller pulsatiler Sekretion bei herzkranken Individuen zu wissen, wie oft eine Blutentnahme benötigt wird, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten (31).

Da die Synthese von BNP in größerem Maße im Ventrikel erfolgt, wird BNP im Gegensatz zu ANP vornehmlich aus den Ventrikeln freigesetzt (32). Auch Yasue et al. demonstrierten 1994, dass BNP im Gegensatz zu ANP hauptsächlich von den Ventrikeln sezerniert wird. Hierbei wurde Patienten mit DCM und Kontrollpatienten Blut aus der Aortenwurzel, dem Sinus Coronarius und der anterioren interventrikulären Vene (AIV) entnommen. AIV ist das abführende Gefäß für die Ventrikel, in den Sinus Coronarius fließt Blut aus den Ventrikeln und den Atrien ein. Hierbei zeigte sich bei beiden Gruppen eine signifikant höhere Konzentration von BNP in den Blutproben der AIV und des Sinus Coronarius im Gegensatz zur Konzentration in der Aortenwurzel. Ein signifikanter Unterschied in den Werten zwischen AIV und Sinus Coronarius wurde dagegen nicht festgestellt. Dies lässt auf eine ausschließliche Sekretion von BNP aus den Ventrikeln schließen (33).

4 Stimulation der Ausschüttung und Synthese von BNP

Die Ausschüttung und Synthese von ANP und BNP werden von zahlreichen neuroendokrinen und mechanischen Reizen angeregt. Mechanische und neuroendokrine Reize lösen durch Vergrößerung der Zellen und Steigerung der Proteinsynthese eine Hypertrophie des Herzmuskels aus.

4.1 Mechanische Reize

4.1.1 Volumenüberlastung

Eine Volumenüberlastung in den Atrien und Ventrikeln eines Individuums führt unweigerlich zu einer Dehnung der Kardiozyten. Die Dehnung der atrialen Myozyten wurde wiederholt als Stimulus für die Ausschüttung von ANP und BNP dargestellt, dies belegen zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Studien. Die Freisetzung von BNP erfolgt nach einer Dehnung der mechanosensitiven Ionenkanäle. Diese Art der Ausschüttung führt zu der Bezeichnung von BNP als Stresshormon (34-36).

Man unterscheidet drei Reaktionen des Körpers auf Volumenüberlastung:

Die erste Antwort auf eine Dehnung der Myozyten wird als akuter Typ der Stimulation bezeichnet. Hierbei kommt es zu einer nur geringen Ausschüttung von BNP in die Blutbahn, die Syntheserate von BNP wird nicht beeinflusst.

Bei längerdauernder Volumenüberlastung wird die BNP Gen Expression nicht beeinflusst, allerdings wird die BNP Gen Transkription erhöht, die Plasmakonzentration in geringem Maße erhöht.

Im dritten Fall einer Volumenüberlastung, wie z.B. bei einem in Deoxycorticosterone acetate-salt (DOCA-salt) Modell im hypertensiven Stadium wird die Expression des BNP Gens beeinflusst und die Plasmakonzentration von BNP erhöht (30).

Auch Borgeson et al. (1998) unterstützen diese Untersuchungen in einer experimentellen Volumenüberlastung bei Hunden. Hier zeigte sich allerdings keine Erhöhung des Plasma-BNP (37).

4.1.2 Drucküberlastung

Eine Drucküberlastung des Herzens wird ebenfalls als Ursache für eine erhöhte BNP Synthese und Ausschüttung beschrieben. Ogawa et al. simulierten 1996 in einem Versuchsmodell mit Ratten eine Drucküberlastung des Herzens durch eine operative Einengung der Bauchorta. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der BNP m-RNA bei den Tieren mit Aortenstenose im Vergleich zu Kontrolltieren (38). Eine andere Studie demonstrierte, dass ANP bei Patienten mit Herztamponade, bei denen ein hoher Druck im

Atrium zusammen mit geringem Volumen besteht nur eine geringe Plasmakonzentration vorwies. Nach Punktion des Perikardergusses stieg ANP auf signifikante Weise an (39). Inwieweit diese Untersuchung auch auf BNP anzuwenden ist, da die Synthese und Sekretion doch ähnlichen Mechanismen unterliegen, ist fraglich.

BNP ist nach Untersuchungen von Rademaker et al. ein weniger sensitiver Marker für Änderungen des intrakardialen Druckes, ist aber wesentlich aussagekräftiger für hämodynamische Veränderungen wie sie z.B. bei einer kongestiven Herzinsuffizienz auftreten (40).

4.2 Neuroendokrine Stimuli

Verschiedene parakrine Faktoren scheinen einen Einfluss auf die Synthese und Sekretion von BNP zu haben.

Endothelin-1, ein potenter Vasokonstriktor, wird im Myokard produziert. Bekannt sind seine Auswirkungen auf den Phänotyp und das Wachstum der kardialen Myozyten, sowie sein Einfluss auf Synthese und Ausschüttung seiner natürlichen Antagonisten ANP und BNP.

Bruneau und De Bold zeigten 1994, dass in einem Modell mit isolierten Atrien von Ratten 2 Stunden nach Exposition mit Endothelin ein signifikanter Anstieg von BNP m-RNA erfolgte. Außerdem wurde bereits wenige Minuten nach Exposition eine erhöhte BNP Sekretion aus den kardialen Myozyten beobachtet (41, 42). Auch in Kulturen von atrialen und ventrikulären neonatalen Kardiozyten von Ratten, sowie in einem *in vivo*-Modell mit Ratten konnte die Ausschüttung von BNP durch Stimulation mit Endothelin-1 signifikant gesteigert werden (43, 44).

Die BNP Sekretion durch Endothelin wird durch den Endothelin-A-Rezeptor vermittelt (36). Die Dichte dieses Rezeptors ist in erkrankten Herzen, wie einer DCM, stark erhöht, damit zeigen sich neben erhöhten Plasmawerten von Endothelin durch die Stimulation der Synthese und Sekretion auch erhöhte Plasmawerte von BNP (45).

Die BNP Synthese und Ausschüttung wird auch durch Stimulation mit adrenergen Agonisten stimuliert. Phenylephrin, ein typischer adrenerger Agonist steigert in einem *in vitro*-Modell die Synthese von BNP-m-RNA und nachfolgend auch die Transkription (46). Ebenso zeigt sich

eine erhöhte Konzentration von BNP m-RNA bereits 6 Stunden nach Stimulation mit Phenylephrin in isolierten Atrien von Ratten. Die Sekretion von BNP steigt nach 15 Minuten an; die Anstiege von BNP m-RNA und BNP können nachfolgend von einem alpha-1-adrenergen Antagonisten (Prazosin) wieder gehemmt werden (47).

Auch andere vasokonstriktorisch aktive Substanzen wie Angiotensin II und Arginin-Vasopressin führen zu einer vermehrten Ausschüttung von BNP, vermutlich über eine Veränderung des arteriellen Blutdrucks. In *in vitro*-Studien konnte dieser stimulierende Effekt von Angiotensin II und Arginin Vasopressin nicht belegt werden (44). Ebenso wird eine BNP Gen Expression von Angiotensin II in Muskelpräparationen der humanen Atrien und Ventrikel stimuliert (48).

Schilddrüsenhormone führen zu einer vermehrten Sekretion von BNP. Bei Patienten mit Hyperthyreose, aber auch bei Ratten mit experimenteller Hyperthyreose durch Gabe von Thyroxin (T₄), sind erhöhte Plasma BNP-Werte zu sehen. Die Stimulation von neonatalen kardialen Myozyten mit Trijodthyronin (T₃) und T₄ demonstrieren eine dosisabhängige Sekretion von BNP (49).

4.3 Medikamente

Ohta et al. (2000) beschreiben einen Anstieg der Plasma BNP- und ANP-Werte, sowie eine Hochregulation der BNP- und ANP-m-RNA Expression durch die orale Gabe von Carvedilol bei Ratten (50). Carvedilol ist ein nichtselektiver β -Blocker.

5 Rezeptoren

Die natriuretischen Peptide sind Liganden von 4 unterschiedlichen Rezeptoren: der natriuretische Peptid Rezeptor A (NPR-A), B (NPR-B), C (NPR-C) und D (NPR-D). Diese Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche der jeweiligen Zielorgane.

Man unterscheidet von zyklischem 3', 5'-Guanosin-Monophosphat(cGMP)-abhängige und cGMP-unabhängige Rezeptoren.

5.1 cGMP-abhängige Rezeptoren

Der NPR-A und NPR-B agieren über eine von zyklischen cGMP-abhängige Kaskade. Die beiden Rezeptoren sind strukturell sehr ähnlich, mit ungefähr 43%iger Homologie in der ligandenbindenden extrazellulären Domäne bei der Ratte. Die extrazelluläre Domäne ist mit dem intrazellulären Anteil über ein einzelnes membranüberspannendes Segment verbunden (51, 52). Im intrazellulären Anteil befindet sich eine kinaseähnliche Domäne, die möglicherweise als nukleotid-bindende (Adenosin-Triphosphat) regulatorische Einheit fungiert. Anschließend folgt die katalytische Guanylat-Zyklase. Die Guanylat-Zyklase ist ein zytoplasmatisches, membranassoziiertes Enzym, das die Umwandlung von Guanosin-Triphosphat (GTP) zu cGMP katalysiert (53). Eine Bindung der natriuretischen Peptide an ihre Rezeptoren führt nach einer Phosphorylierung zu einer Aktivierung der Guanylat-Zyklase. Dadurch kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP (54). Der second messenger cGMP ist für die größte Anzahl der biologischen Aktionen der natriuretischen Peptide verantwortlich und wird nach seiner Bildung von den jeweiligen Zielzellen in die extrazelluläre Substanz abgegeben. cGMP wird proportional zur Konzentration der natriuretischen Peptide im Extrazellulärmedium akkumuliert (55). In der Folge aktiviert cGMP eine Proteinkinase, die in die Phosphorylierung von Ionenkanälen involviert ist. Verschiedene Ionenkanäle werden mit den Aktionen von natriuretischen Peptiden in Verbindung gebracht:

- a. Calcium-aktivierte Kalium-Kanäle
- b. ATP-sensitive Kalium-Kanäle
- c. Einwärts gerichtete Kalium-Kanäle
- d. Auswärts gerichtete Kalium-Kanäle
- e. L-Typ Calcium²⁺-Kanäle
- f. Chlorid-Kanäle
- g. Natrium-Kalium-Chlorid Co-Transporter
- h. Natrium-Kalium-ATPase
- i. Natrium-Kanäle
- j. Dehnungs-aktivierte Kanäle
- k. Wasser-Kanäle

Es scheint, als ob die natriuretischen Peptide hierbei die Kinetik und weniger die Leitfähigkeit der Kanäle modulieren. Manche dieser Kanäle (z.B. die dehnungs-aktivierten Kanäle) spielen auch bei der Sekretion der natriuretischen Peptide eine Rolle (56).

Eine Stimulation des NPR-A führt zu einer Vasorelaxation und Natriurese; zudem wird die Aldosteronsynthese gehemmt. Mäuse mit einem Fehlen des NPR-A Gens entwickeln eine kardiale Hypertrophie und Dilatation sowie Hypertonie. Männliche Mäuse zeigen verringerte Testosteronwerte und neigen zu plötzlichen Todesfällen; außerdem scheinen sie sehr empfänglich für pulmonale Hypertonie zu sein (57, 58).

Die resultierende kardiale Hypertrophie übersteigt bei NPR-A-Knockout-Mäusen die normale Antwort auf eine dauerhafte Hypertonie; man vermutet eine lokale Regulation der Hypertrophie durch NPR-A über eine cGMP abhängige Reaktion (59).

NPR-A bindet sowohl ANP als auch BNP. Es besteht aber eine 10-mal höhere Affinität für ANP (51). Suga et al. beschreiben 1992 die Selektivität der einzelnen Rezeptoren bei Mensch und Rind. Hierbei besteht für NPR-A die größte Affinität für ANP und BNP vor CNP. CNP ist der natürliche Ligand für NPR-B, allerdings besteht auch eine geringere Affinität für ANP und BNP (60). Andere Autoren führen aus, dass NPR-B beim Menschen ausschließlich von CNP aktiviert werden kann, beim Schwein allerdings auch BNP über NPR-B wirkt (61). Die relativ geringe Affinität von BNP zu NPR-A führte bei Goy et al. (2001) zu der Vermutung, dass noch ein weiterer Rezeptor für BNP existieren könne. Hierbei zeigten bestimmte Gewebe (Hoden und Nebenniere) bei Knockout-Mäusen ohne NPR-A ein signifikantes Ansprechen auf BNP; ein spezifischer Rezeptor vor allem in steroidproduzierenden Geweben wurde vermutet (62).

NPR-A befindet sich zu einem großen Anteil im Endothel von großen Blutgefäßen, in den Nebennieren, der Niere und im Herzen selbst. NPR-A wurde mit immunohistochemischen Methoden bei der Ratte speziell in den Glomeruli, den dünnen Schenkeln der Henleschen Schleife, in den kortikalen und medullären Sammelrohren und im Gefäßsystem der Niere lokalisiert (63). Lin et al. (1995) fanden eine Expression von NPR-A in ventrikulären Myozyten (64).

NPR-B dominiert im zentralen Nervensystem, hier vor allem in der Hypophyse; einige Rezeptoren liegen auch im Ziliarkörper, den Blutgefäßen und der Niere (51, 63). Kim et al. (1999) beschrieben NPR-B als den am häufigsten im ventrikulären Endokard vorkommenden natriuretischen Rezeptor. Die meisten Bindungsstellen befinden sich im rechtsventrikulären

Endokard. Bei ventrikulärer Hypertrophie findet in der Folge eine Downregulation der natriuretischen Peptid Rezeptoren statt (65).

5.2 cGMP-unabhängige Rezeptoren

Der natriuretische Peptid-Rezeptor C ist ein so genannter „Clearance-Rezeptor“, d.h. er katalysiert zusammen mit der neutralen Endopeptidase 24.11 (NEP) den Abbau der natriuretischen Peptide. NPR-C nimmt auch an anderen biologischen Aktionen im Körper teil. So sind bei NPR-C-Knockout-Mäusen neben der Unfähigkeit Urin zu konzentrieren auch Hypotension und Skelettdeformationen zu beobachten. Man vermutet, dass NPR-C die Verfügbarkeit der natriuretischen Peptide an den Zielorganen moduliert (66).

NPR-C wurde zuerst aus bovinen glatten Gefäßmuskelzellen isoliert, anschließend wurden die c-DNA (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)-Klone isoliert und sequenziert (67).

NPR-C ist ein homodimeres Peptid, verbunden über eine Disulfidbrücke; jedes Monomer hat ein einzelnes membranüberspannendes Segment. BNP besitzt offensichtlich eine geringere Affinität für NPR-C als ANP und CNP, die längere Halbwertszeit im Plasma scheint damit erklärbar (68).

NPR-C hat nur eine sehr kurze zytoplasmatische Domäne, die biologische Wirkung ist nicht cGMP gekoppelt, sondern wird über G-Proteine mit einer Inhibition der Adenylatzyklase und einer Stimulation des Phosphoinositolwegs erreicht (69).

NPR-C stellt den größten Anteil der natriuretischen Peptid-Rezeptoren und ist in vielen Geweben, z.B. Gefäßendothelien, -intima, Herz, Plazenta, Nebenniere und Niere nachzuweisen (70). Giannessi beschrieb 2001 das Vorhandensein von NPR-C auch auf intakten Thrombozyten (71).

Es existiert ein weiterer natriuretischer Peptid Rezeptor: NPR-D. Dieser ist vornehmlich im Gehirn lokalisiert (72). Nach Kashiwagi et al. besteht beim Aal eine 70-prozentige Sequenzhomologie zu NPR-C (73).

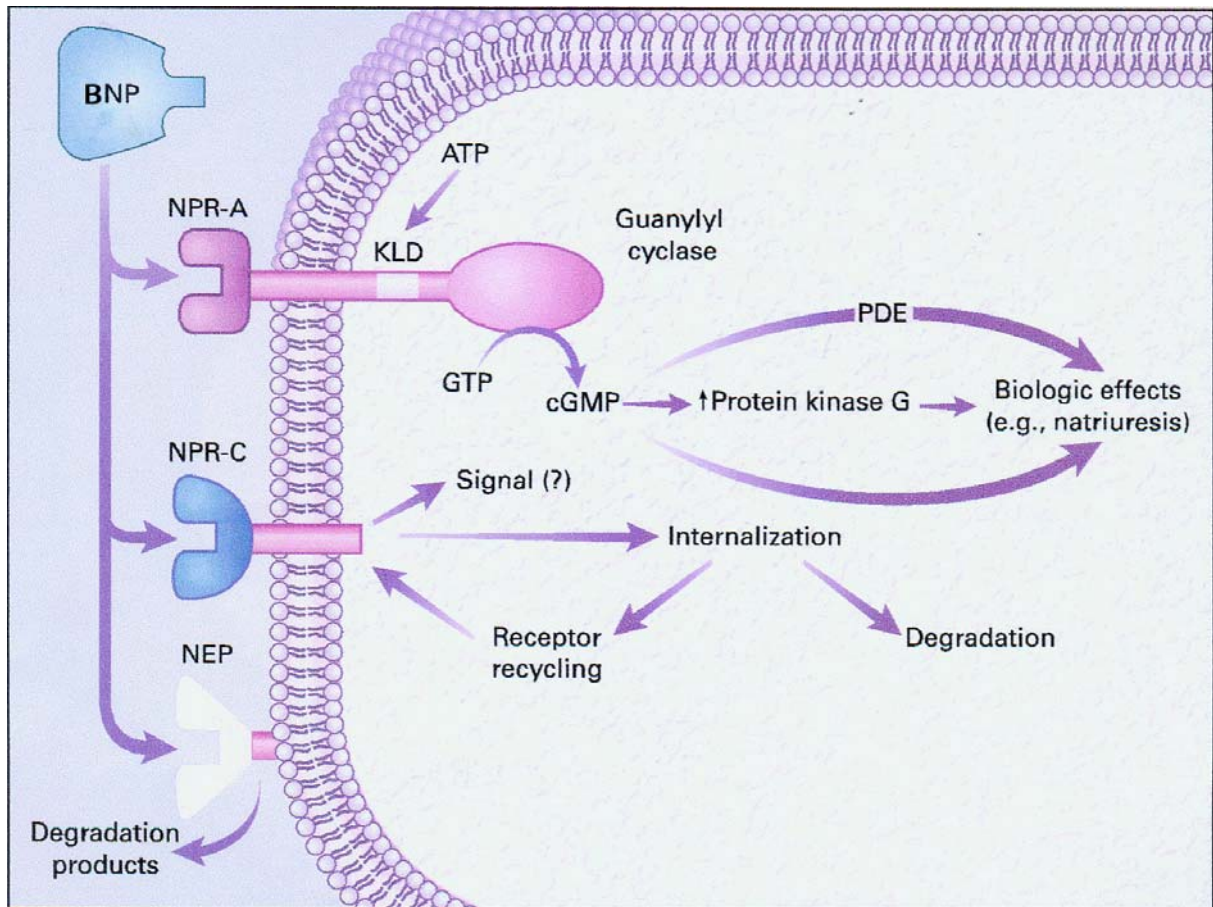


Abbildung 3: Wirkungen von BNP an Zielzellen

Brain Natriuretic Peptide (BNP) bindet an den natriuretischen Peptidrezeptor A (NPR-A) in einer Adenosin-Triphosphat (ATP)-abhängigen Weise und stimuliert die intrinsische Guanylatzyklase-Aktivität des Rezeptors. Die biologischen Wirkungen werden durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelt. Eine cGMP-abhängige Proteinkinase G oder Phosphodiesterase (PDE) werden dann aktiviert. ATP benötigt die Kinase-like Domäne (KLD), um wirken zu können. Der natriuretische Peptidrezeptor C (NPR-C) degradiert BNP, zum anderen wird eine Signalfunktion vermutet. BNP wird auch durch die neutrale Endopeptidase (NEP) degradiert. Modifiziert aus Levin et al. (1998) (74)

6 Abbau der natriuretischen Peptide

Alle natriuretischen Peptide werden im Körper entweder nach Bindung an den NPR-C oder durch eine neutrale Endopeptidase (NEP), die von der Enzymkommission als EC 3.4.24.11 klassifiziert wurde, abgebaut.

Nach Bindung an den NPR-C kommt es zu einem Abbau der natriuretischen Peptide mittels einer Endozytose, gefolgt von einer lysosomalen Degradation.

Die neutrale Endopeptidase ist eine membranständige Zink-Metalloprotease. Es zeigt sich eine große stereochemische Ähnlichkeit zum Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) (75). Beides sind Zink enthaltende Peptidasen mit der aktiven Stelle an der Zelloberfläche. NEP bricht die Ringstruktur der natriuretischen Peptide auf und inaktiviert damit das Peptid. NEP findet man beim Schwein an der Bürstenmembran der Niere, v.a. an den proximalen Tubuli, aber auch im ZNS, der Lunge, den Lymphknoten und dem Magen-Darm-Trakt. Sie inaktiviert auch andere vasodilatierende Peptide wie Bradykinin, Adrenomedullin und das Angiotensinfragment (76). BNP zeigt eine geringere Affinität zur NEP als ANP (77).

NEP und NPR-C tragen bei Schafen mit Herzinsuffizienz gleichermaßen zum Abbau der natriuretischen Peptide bei (78). Die Verhältnisse beim Menschen und Hund sind nicht bekannt.

7 Physiologische Wirkungen von BNP

7.1 Kardiovaskuläre Wirkungen

Die Wirkungen der natriuretischen Peptide wurden in verschiedenen humanen und experimentellen Studien durch Infusion von BNP bzw. durch Gabe eines Rezeptorantagonisten bei gesunden und kranken Individuen herausgearbeitet. So konnten

Auswirkungen auf Vor- und Nachlast, den Sympathikustonus, die glatte Gefäßmuskulatur, die systolische und diastolische Funktion des Herzens und das Ventrikelmyokard festgestellt werden.

7.1.1 Nachlast und Vorlast

Als Vorlast wird die Kraft bezeichnet, die die ventrikulären Fasern am Ende der Diastole dehnt und damit die maximale Ruhelänge der Sarkomere bestimmt. Klinisch wird die Vorlast durch das end-diastolische Volumen oder den end-diastolischen Druck abgeschätzt.

Die Nachlast ist die Kraft, die sich dem ventrikulären Auswurf entgegensetzt. Dieser Widerstand wird von dem jeweiligen Spannungszustand der Gefäße gebildet (79).

Um die mögliche Wirkung von BNP auf die Nachlast zu definieren, wurden gesunden Hunden und Hunden mit experimenteller Herzinsuffizienz Infusionen mit BNP verabreicht. Als Indizes für die linksventrikuläre Nachlast wurden das end-systolische Volumen und der end-systolische Druck definiert. In dieser Studie zeigte sich eine durch BNP induzierte signifikante Nachlastsenkung (80).

BNP bewirkt eine Vorlastsenkung, dies bewiesen La Villa et al. (1995) durch Infusion mit BNP bei Patienten mit Hypertension. Es konnte eine Reduktion des linksventrikulären end-diastolischen und –systolischen Volumens ermittelt werden (81).

Die Vorlast- und Nachlastsenkung können die Folge einer BNP-induzierten Vasodilatation oder aber durch ein Verlagern der intravaskulären Flüssigkeit in das extrazelluläre Kompartiment darstellen. Der Shift vom intravaskulären in das extravaskuläre Kompartiment wird auf eine höhere Permeabilität des Endothels sowie einen erhöhten hydrostatischen Druck im Kapillarbett zurückgeführt (81).

Diese beiden Phänomene sind nicht die einzigen Mechanismen, die die Vor- und Nachlast senken, hinzu kommen noch die renalen Effekte von BNP und die Unterdrückung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS).

Unzweifelhaft reduzieren natriuretische Peptide die Vorlast und die Nachlast, trotzdem herrscht Uneinigkeit über die Wirkung auf die arterielle und venöse Gefäßmuskulatur.

In vitro-Studien stellten BNP als potenten arteriellen Vasodilator dar (82).

Nach Schirger et al. (2000) führt BNP zu einer Vasorelaxation, dies demonstrierten sie in einer *in vitro*-Studie. Hierbei relaxiert BNP die isolierte Aorta von Kaninchen, und dies unabhängig vom Gefäßendothel. Diese Vasorelaxation wird durch eine experimentelle Arteriosklerose aufgehoben (83). Auch Van der Zander induzierte eine Vasodilatation nach Injektion von BNP beim Menschen (84). Interessanterweise war eine Reduktion des systemischen peripheren vaskulären Widerstandes vor allem mit hohen Dosen von BNP zu beobachten (85), wohingegen niedrige Dosen von BNP neutral oder vasokonstriktorisch wirkten (86). In einer Studie von Woods et al. (1999) resultierten Infusionen von BNP in einer reversiblen Vasokonstriktion der Gefäße der Mesenteriums bei Hunden, allerdings steigerte sich hierbei der systemische arterielle Blutdruck nicht, sondern verringerte sich. Dies impliziert gegenregulierende Systeme, demzufolge entweder eine Vasodilatation des Nicht-Splanchnikus-Gebietes oder ein sinkender Herzauswurf. Die Autoren vermuten – wenn auch unbewiesen – eine Vasodilatation anderer Gefäße (87).

Die natriuretischen Peptide induzieren schon in niedrigen Dosen in der Koronarzirkulation von Hunden eine Vasorelaxation (88).

Der systemische Blutdruck ist proportional zum kardialen Auswurf und dem totalen peripheren Widerstand. Der kardiale Auswurf seinerseits hängt von der Herzfrequenz und dem Schlagvolumen ab, das natürlich vom Hydratationsstatus des Individuums beeinflusst wird. Der periphere Widerstand ist neben dem Einfluss von Vasopressoren und –dilatoren von der vaskulären Struktur abhängig (79). Bei Injektion von BNP ist bei gesunden Individuen keine Veränderung des Blutdruckes festzustellen, bei Patienten mit essentieller Hypertonie zeigt sich ein signifikanter Abfall des Blutdruckes (68).

Der Mechanismus der Vasodilatation der natriuretischen Peptide ist noch weitgehend im Unklaren, für ANP wird eine Vasodilatation durch Nitritoxid vermutet (89). Für BNP nimmt man eine Öffnung von Kalium-Calcium-Kanälen neben einer Stimulation der Nitritoxidproduktion an (90).

BNP verursacht im Vergleich zu ANP eine wesentlich geringere Vasodilatation (84). Dies kann zum einen durch die höhere Affinität von ANP zum gemeinsamen Rezeptor NPR-A bedingt sein. Andererseits wäre es denkbar, da BNP außer der Vasodilatation auch in gewissem Maße eine Vasokonstriktion bewirkt, dass der Endeffekt der BNP-Wirkung von der Balance dieser zwei Mechanismen abhängt.

7.1.2 Sympathikus

Brunner-La Rocca et al. veröffentlichten 2001 eine Studie über den Einfluss von BNP auf die Sympathikuswirkung mit gesunden Kontrollpatienten und Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz. Die kardiale Sympathikusaktivität war abhängig von der Dosis der BNP-Infusion. Mit niedrig dosiertem BNP zeigte sich ein Abfall der Sympathikusaktivität. Dies demonstriert die kardioprotektive Wirkung von BNP, da eine hohe Sympathikusaktivität ein wichtiger Faktor für das Fortschreiten einer Herzerkrankung ist. Bei höheren Dosen von BNP wird die Sympathikuswirkung nicht mehr unterdrückt, wahrscheinlich durch die Aktivierung der Barorezeptoren (91).

Bei Hunden mit sehr hohen myokardialen Konzentrationen von BNP (durch Infusion mit BNP) – dies soll die Situation bei herzkranken Individuen darstellen – zeigt sich ein Abfall der Herzfrequenz. Dies ist möglicherweise auf eine Stimulation der vagalen Afferenzen oder einen direkten Effekt von cGMP zurückzuführen (92).

7.1.3 Systolische Funktion

Es wird eine indirekte Wirkung von BNP auf die systolische Funktion des Herzens bei Hunden beschrieben. Diese Wirkung wird durch cGMP erreicht, das allerdings nur bei gesunden Hunden positiv inotrop wirkt (80).

7.1.4 Diastolische Funktion

Nach BNP Infusion in die Koronargefäße von gesunden Hunden kann eine Verbesserung der diastolischen Funktion bewirkt werden. Es zeigt sich eine schnellere Anfangsphase der linksventrikulären Relaxation sowie eine höhere Relaxationsrate (92).

7.1.5 Antiproliferative Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur

Die natriuretischen Peptide induzieren die Apoptose von Endothelzellen über einen cGMP abhängigen Reaktionsweg. Diese Effekte werden nachweislich von Endothelin antagonisiert.

Demzufolge kann ein Ungleichgewicht zwischen Endothelin und den natriuretischen Peptiden zum Fortschreiten oder der Entwicklung einer vaskulären Pathologie beitragen (93).

Außerdem zeigen die natriuretischen Peptide (ANP, BNP und CNP) ausgeprägte antiproliferative und antimigrative Wirkungen auf glatte Gefäßmuskelzellen. Natriuretische Peptide spielen bei der humanen Koronararteriosklerose eine protektive Rolle, da vaskuläre Zellproliferation und Migration die zentralen pathophysiologischen Mechanismen der Arteriosklerose darstellen (94). Schirger et al. (2000) zeigten, dass BNP nach Bindung an NPR-A eine antimitogene Wirkung in den glatten Gefäßmuskelzellen ausübt und ein antireplikativer Mechanismus in *in vitro*-Studien besteht (83). Die antimitogene Wirkung wird durch einen cGMP abhängigen Mechanismus vermittelt (95).

7.1.6 Myokard

Kardiale Fibrose ist definiert als eine überschießende Proliferation von interstitiellen Fibroblasten und Biosynthese von Komponenten der Extrazellulärmatrix. Dies ist eine Folge des sog. Remodelings, ein Zustand, der nach verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen (z.B. Infarkten) auftritt. Bei Knockout-Mäusen mit einem Fehlen des BNP Gens können multifokale fibrotische Läsionen in den Ventrikeln gefunden werden. Dies stellt BNP in seiner Funktion als einen antifibrotischen Faktor heraus (96).

7.2 Renale Wirkungen

Die natriuretischen und diuretischen Wirkungen der natriuretischen Peptide sind eine Folge von Änderungen in der renalen Durchblutung und direkten tubulären Wirkmechanismen.

Nach Ritter et al. (1995) findet die Natriuresis und Diuresis vorzugsweise in den Glomeruli und den medullären Sammelrohren statt, da hier eine große Konzentration von NPR-A vorhanden ist (63). Jensen et al. (1998) konnten nachweisen, dass BNP die Natriumrückresorption vorzugsweise in den distalen Segmenten des Nephrons hemmt (97). Nach Bindung an NPR-A wird über einen cGMP abhängigen Reaktionsweg eine Änderung der Kaliumleitfähigkeit an der apikalen Membran der humanen Zellen des proximalen

Tubulus verursacht. Dies zieht durch eine noch unbekannte Veränderung der Natriumtransportvorgänge die natriuretischen Vorgänge nach sich (69).

Nach Infusion von BNP bei gesunden Kontrollpatienten und Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz kann bei den Gesunden eine noch stärkere Natriurese gefunden werden. Man führt die geringere Natriumausscheidung bei herzkranken Individuen auf eine geringere Sensibilität des distalen Nephrons aufgrund einer verminderten Rezeptordichte von NPR-A, auf ein schlechteres Ansprechen auf cGMP und auf gegenregulierende hormonelle Systeme zurück (98). Auch bei intrarenaler und intravenöser Injektion von kaninem BNP bei Hunden kann ein signifikanter Anstieg der Natriurese gemessen werden (99).

Bei Hunden mit experimenteller Herzinsuffizienz, die eine Verringerung der Auswurfleistung zur Folge hat, bleibt die glomeruläre Filtrationsleistung (GFR) erhalten. Nach Zugabe eines Inhibitors der natriuretischen Rezeptoren (HS-142-1) kommt es in der Folge zu einem Absinken der GFR. Dies unterstreicht die Funktion von BNP, trotz akuter Herzinsuffizienz die GFR aufrechtzuerhalten (100).

Nach Infusion von BNP bei Menschen wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in signifikanter Weise gesteigert. Die Erhöhung der GFR wird – dies ist bei ANP bekannt – durch eine Dilatation der afferenten Arteriole und Konstriktion der efferenten Arteriole verursacht. Die unmittelbare Folge ist ein erhöhter Filtrationsdruck, wodurch die Filtrationsleistung der Niere steigt. Man vermutet denselben Mechanismus für BNP (101). La Villa et al. (1994) konnten mithilfe einer Para-Aminohippurat-Clearance eine Erhöhung des effektiven renalen Plasmaflusses nach Infusion von BNP nachweisen (102). Im Gegensatz hierzu steht die Studie von Van der Zander et al. (2003), in der nach BNP Infusion in die Arteria renalis keine Veränderung im renalen Blutfluss gemessen werden konnte (103).

Der Grund für die Stimulation der Natriurese durch BNP ist die Folge eines Zusammenspiels von erhöhter GFR und/oder einem Abfall der tubulären Rückresorption von Natrium (98). Allerdings zeigen sich Veränderungen im renalen Plasmafluss und der GFR erst bei höheren Plasmawerten von BNP. Dies bedeutet, dass im physiologischen Bereich von BNP ausschließlich eine reduzierte tubuläre Rückresorption für die Natriurese verantwortlich ist (104).

Neben der Natriurese und Diurese führt BNP zu einer Antagonisierung von hormonellen Systemen. In seiner Funktion als Gegenspieler des RAAS inhibiert BNP die Reninsekretion an der Macula Densa, vermutlich durch Natrium-Austausch-Vorgänge (105).

Es ist bekannt, dass ANP Angiotensin II-vermittelte Transportvorgänge von Wasser und Natrium im proximalen Konvolut hemmt. Es wird vermutet, dass BNP auf dieselbe Weise wirkt (106).

Außerdem ist BNP als ein natürlicher Antagonist von Aldosteron anzusehen. BNP unterdrückt die Aldosteronsekretion bei gesunden wie bei herzkranken Patienten (107). Auch in Kulturen von humanen Nebennierenzellen stellt sich BNP als sehr potenter Hemmer der Aldosteronausschüttung heraus (108).

Nach Infusion von BNP in Dosen, die nur eine geringe Erhöhung des Plasmaspiegels von BNP nach sich ziehen, zeigten sowohl gesunde Patienten als auch herzkranken Patienten eine Diurese und Natriurese, es konnte keine Veränderung des Blutdruckes und der Herzfrequenz festgestellt werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die BNP-induzierten Mechanismen auf renaler Ebene bereits bei geringeren Plasmaspiegeln von BNP als die kardiovaskulären und neurogenen Wirkungen stattfinden (102).

7.3 Wirkungen im zentralen Nervensystem

Die natriuretischen Peptide können die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Sie erreichen nur Lokalisationen außerhalb und am Rande dieser Barriere, z. B. Teile des Hypothalamus, die Area postrema und das subfornische Organ. Alle 3 natriuretischen Peptide werden auch im Gehirn produziert, BNP wurde zunächst nur im Gehirn entdeckt.

Die Wirkungen der natriuretischen Peptide im Gehirn verstärken die peripheren Wirkungen. So werden die natriuretischen Effekte in der Peripherie durch die zentrale Inhibition des Salzappetits und Durstes vervielfacht (109).

Im Hirnstamm wird der Sympathikustonus durch die natriuretischen Peptide erniedrigt.

Die Wirkmechanismen der natriuretischen Peptide im Gehirn werden am leichtesten durch die Verteilung der natriuretischen Peptidrezeptoren und deren Subtypen erklärt. Der natriuretische Peptidrezeptor A dominiert in Lokalisationen, die an den dritten Ventrikel angrenzen und damit außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegen. Diese Position erlaubt zirkulierenden natriuretischen Peptiden, ebenso wie lokal produzierten an die Rezeptoren zu binden. NPR-A ist hier der Effektor für den Salzappetit und den Durst. Der NPR-C befindet sich im ganzen zentralen Nervensystem und dient hier möglicherweise als

Antiwachstumsfaktor für Gliazellen (110, 111). NPR-B kommt vor allem im Hypothalamus und anderen rostralen Gehirnregionen vor. Dort erfolgt eine direkte Hemmung der Sekretion von Vasopressin (112).

8 Messung von BNP

8.1 Blutentnahme und Stabilität

Die Peptidstruktur von BNP und sein physiologischer Abbau durch eine Protease ließen befürchten, dass nur eine geringe Stabilität vorhanden sei. Zu Beginn der Forschungen über das natriuretische Peptid BNP wurde jede Blutprobe mit einem Proteasehemmer (Aprotinin) versehen und sofort bei 4°C zentrifugiert, um eine Degradation von BNP zu verhindern.

Davidson et al. (1995) zeigten, dass eine Blutprobe bei Raumtemperatur in einem Standard Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen, das innerhalb von 6 Stunden zentrifugiert wird, noch akkurate Werte von BNP liefert (113). Gobinet-Georges et al. (2000) demonstrierten sogar eine Stabilität bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur (114). Die Zugabe von Aprotinin zu den Blutproben ist nicht erforderlich, um genaue BNP Werte zu erhalten (115). Dies erleichtert die praktische Anwendung der Messung von Plasma BNP beträchtlich. Eine Studie von Shimizu (1999) zeigt, dass ein Auffangen von Blut in Polyethylen-Terephthalat-Röhrchen eine höhere Stabilität von BNP zur Folge hat (116). Koagulationsfaktoren, im Speziellen Kallikrein, spielen bei der Degradation von BNP eine wichtige Rolle (117).

8.2 Physiologische Konzentrationsschwankungen von BNP

Es gibt nur wenig Hinweise, dass demographische Faktoren einen Einfluss auf die Plasmakonzentration von BNP haben.

Frauen haben geringfügig höhere Werte. Die BNP Plasmawerte zeigen keinen zirkadianen Rhythmus (118).

Bei gesunden Kindern im Vergleich zu gesunden Erwachsenen findet man signifikant höhere BNP Werte im Plasma kurz nach der Geburt. Bereits im Alter von 3 Monaten werden allerdings die Plasmawerte von Erwachsenen erreicht (119, 120). Auch gesunde ältere Menschen (> 75 Jahre) haben höhere Plasmakonzentrationen. Ihre Werte sind ungefähr zweimal so hoch wie bei gesunden Erwachsenen unter 75 Jahren (121, 122).

Alle Schwankungen der BNP Plasmawerte innerhalb der gesunden Population sind gering im Vergleich zu den Verhältnissen bei herzkranken Patienten. Dennoch sollten diese Schwankungen bei moderat erhöhten Werten miteinbezogen werden.

Über die Verhältnisse bei gesunden Hunden gibt es bisher nur sehr wenige Studien. So fand Eriksson (2001) keine höheren Werte bei älteren Hunden, diese Studie beschränkt sich allerdings nur auf eine Hunderasse (Cavalier-King-Charles-Spaniels) (123).

8.3 Methoden zur Bestimmung von BNP

Für die Messung von BNP stehen 3 verschiedene kommerzielle Messmethoden in der Humanmedizin zur Verfügung:

- Radioimmunoassay
- Immunoradiometrische Methode (IRMA)
- Immunofluorometrischer Test

Die älteste Methode zur Bestimmung von BNP ist der Radioimmunoassay. Es handelt sich hier um einen kompetitiven Immunoassay, d.h. BNP konkurriert mit einem markierten Antigen um eine limitierte Konzentration eines spezifischen Antikörpers. Da physiologischerweise im Plasma niedrige Konzentrationen von BNP vorliegen, muss, um verlässliche Werte von BNP zu erhalten, eine Plasmaextraktion des Peptids erfolgen. Man kennt verschiedene Methoden zur Plasmaextraktion, z. B. mit C-18 oder C-8 Trennsäulen oder Vycor Glas (124). Aufgrund der Plasmaextraktion werden relativ große Plasmavolumen benötigt.

Als nicht-kompetitive Messmethode wurde ein IRMA etabliert. Dies ist ein sog. "Sandwich-Assay", der keine vorhergehende Plasmaextraktion benötigt. Generell ist diese Messmethode sensitiver und auch präziser als der kompliziertere RIA (125).

In neuester Zeit wurde eine weitere Messmethode für BNP entwickelt. Dies ist ein nicht-kompetitiver immunofluorometrischer Test. Hier bedient man sich zwei verschiedener Bindungsphasen, die spezifisch für die zwei verschiedenen Epitope von BNP sind. Der Vorteil dieser Methode besteht in der schnellen Durchführbarkeit (15 Minuten). Trotzdem ist ihm der IRMA in Bezug auf Präzision und Sensitivität eindeutig überlegen (126).

Plasmawerte von BNP können aufgrund der verschiedenen zur Verfügung stehenden Messmethoden und deren unterschiedlicher Präzision und Sensitivität nur verglichen werden, wenn sie mit derselben Methode bestimmt wurden.

9 Klinische Bedeutung von BNP in der Humanmedizin

9.1 Diagnose von kardialen Erkrankungen anhand von BNP Werten

Die Diagnose von Herzerkrankungen stellt große Anforderungen an den betreuenden Arzt, insbesondere in der Notaufnahme, wo eine schnelle Diagnose lebensrettend sein kann. Studien besagen, dass ungefähr 40% der Patienten, die mit Dyspnoe in die Notaufnahme kamen, an einer zugrunde liegenden Herzerkrankung leiden (127). Unzweifelhaft kann eine Echokardiographie meist schnell und verlässlich die Diagnose liefern, aber diese Methode ist nicht immer anwendbar bzw. verfügbar. Demzufolge wäre eine Methode, die schnell und zuverlässig den klinischen Verdacht einer Herzerkrankung bestätigt oder ausschließt, sehr nützlich (128).

9.1.1 BNP in der Notfallmedizin

Besondere Bedeutung hat die Bestimmung von BNP demzufolge in der Notfallmedizin. Die Angaben über Spezifität (74 % - 92 %) und Sensitivität (77 % - 98 %) von BNP als diagnostischer Marker variieren je nach Studie (128-130). Die Faktoren, die die Sensitivität und Spezifität von BNP für die Diagnose einer Herzerkrankung beeinflussen, schließen das Alter der Patienten, die Schwere einer Herzerkrankung und die Art der ventrikulären Dysfunktion ein.

In einer Studie mit 250 Patienten, die sich wegen akuter Dyspnoe als Notfall in der Ambulanz einfanden, wurde die diagnostische Bedeutung einer BNP Messung zur Abklärung einer Herzerkrankung getestet. Hierbei korrelierten die BNP Plasmawerte mit dem klinischen Grad der Herzerkrankung. Bei einem Wert unter 80pg/ml lag der negative prädiktive Wert bei 98% (129).

Die zweite kürzlich veröffentlichte Studie bestätigte und erweiterte diese Ergebnisse. Hier wurden BNP Plasmawerte bei 1586 Patienten mit Dyspnoe ermittelt. Ein BNP Wert von 100pg/ml hatte einen hohen negativen prädiktiven Wert. Ein hoher negativer prädiktiver Wert für ein diagnostisches Hilfsmittel ist in der Notfallmedizin unerlässlich, da dies einen schnellen Ausschluss einer kardialen Ursache erlaubt (131).

Dies macht BNP zu einem hochwertigen diagnostischen Parameter zur Erkennung von Herzerkrankungen in der Notfallmedizin.

9.1.2 Korrelation von BNP mit der Schwere einer Herzerkrankung

Um die Schwere einer Herzerkrankung einzustufen, teilt man herzkranken Patienten in die funktionellen Klassen der New York Heart Association ein (NYHA) (132).

FUNKTIONAL CLASSIFICATION OF HEART FAILURE

Modified from the New York Heart Association classification

- I. normal activity does not produce undue fatigue, dyspnea or coughing
- II. The patient is comfortable at rest, but ordinary physical activity causes fatigue, dyspnea or coughing
- III. The patient is comfortable at rest, but minimal exercise may produce fatigue, dyspnea or coughing. Signs may also develop while the patient is in a recumbent position
- IV. Congestive heart failure, dyspnea and coughing are present even when the patient is at rest. Signs are exaggerated by any physical activity

Tabelle 1: Einteilung der Schwere einer Herzerkrankung nach der funktionellen Klassifikation der New York Heart Association aus Ettinger et al. (1970) (132)

Es besteht eine Abhängigkeit der NYHA-Klassen zur Konzentration der BNP Werte. In einer Studie von Dao (2000) lag der mittlere BNP-Wert bei 150pg/ml für die Klasse 1, 250pg/ml für die Klasse 2, 550pg/ml für die Klasse 3 und 900pg/ml für die Klasse 4 (129).

Dieselbe Abhängigkeit belegen auch andere Studien. Lee et al. (2002) untersuchten BNP im Plasma von Patienten in unterschiedlichen NYHA-Klassen. BNP korrelierte auch hier mit der Schwere der Erkrankung. Bei Folgeuntersuchungen verbesserte oder verschlechterte sich zum Teil die klinische Symptomatik der Patienten. Auch die BNP Werte veränderten sich je nach der neuen NYHA-Einteilung (133). Im Gegensatz hierzu steht die Studie von Yoshimura et al. (1993). Hier konnte anhand von BNP keine Unterscheidung der NYHA-Klassen getroffen werden. Limitierend war an dieser Studie sicherlich, dass alle untersuchten Patienten an einer Mitralstenose litten. Da hier vor allem die Atrien volumenüberlastet sind und die Synthese von BNP beim Menschen hauptsächlich in den Ventrikeln stattfindet, könnte dies die Ursache für das abweichende Resultat sein (13).

9.1.3 BNP zur Diagnose einer systolischen Dysfunktion

Charakteristische Kennzeichen einer systolischen Dysfunktion sind eine normale Füllung des Ventrikels und eine geringere Auswurfleistung. Eine geringe Auswurfleistung resultiert aus einer verringerten Kontraktilität (Myokardversagen) oder einer ventrikulären Volumenüberladung. Grundsätzlich führt auch eine Drucküberlastung zu einem späteren Zeitpunkt zu einer systolischen Dysfunktion. Allerdings erhöht eine Hypertrophie zunächst

die Kontraktilität (79). Aus diesem Grund werden hier Krankheiten, die zu einer Drucküberlastung führen, diastolischen Dysfunktionen zugeführt.

Die Möglichkeit asymptotische Patienten mit bereits bestehender kardialer Dysfunktion zu einem frühen Zeitpunkt zu erkennen, könnte zu einem großen Fortschritt in der Diagnostik von Herzerkrankungen führen. Die richtige Diagnosestellung bei NYHA I-Patienten würde eine sehr frühe medikamentöse Intervention erlauben und das klinische Fortschreiten verhindern (134).

Das Potential von BNP asymptotische Patienten, welche echokardiographisch eine milde linksventrikuläre Dysfunktion zeigen, herauszufiltern, wird kontrovers diskutiert. So konnten Dao et al. in einer Studie demonstrieren, dass Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion ohne klinische Symptomatik 3-4mal höhere Werte als gesunde Kontrollpatienten aufwiesen (129). Auch Yoshimura et al. (1993) zeigten, dass BNP bei NYHA I-Patienten mit Mitralkstenose signifikant höhere Werte als gesunde Kontrollpatienten hatten (13). Nach Friedl et al. (1996) war nur BNP – nicht die anderen untersuchten Neurohormone - bei asymptotischen NYHA I-Patienten signifikant höher als bei gesunden Kontrollen. In kritischer Weise stellt er BNP allerdings als unzureichenden Faktor für ein Screening von Populationen zur Diagnose von symptomloser linksventrikulärer Dysfunktion dar, da Sensitivität und Spezifität nicht ausreichend sind (135).

In einer vergleichenden Studie von Daggubati et al. (1997), in der verschiedene neurohumorale Marker dargestellt wurden, konnte anhand von BNP keine Unterscheidung von gesunden Kontrollpatienten und asymptotischen Patienten der NYHA-Klasse I gemacht werden (136). Um eine marginal veränderte linksventrikuläre Funktion zu entdecken, kann die Messung von BNP demnach nicht empfohlen werden (137, 138). Nielsen et al. (2003) empfehlen in einer Studie mit 1257 willkürlich ausgewählten Personen, bei denen BNP Plasmawerte gemessen wurden, als ersten Ausschlusstest einen Fragebogen (mit spezifischen Fragen zu Vorerkrankungen, familiärer Prädisposition etc.) und Blutdruckmessung. Ein anschließender BNP Test könne anschließend die Patienten aufzeigen, die zu einer echokardiographischen Untersuchung weiter überwiesen werden sollten (139).

Anders ist die Situation bei Patienten mit bereits bestehender kardialer Problematik. Bei Patienten mit vermuteter oder bestehender kardialer Erkrankung eignet sich BNP als Screening Faktor einer Population. Anhand einer Messung der Ejektionsfraktion mit einer Radionuklid-Ventrikulographie, kann eine schwache Abhängigkeit von BNP zur Ejektionsfraktion gefunden werden. Eine Ejektionsfraktion von 55% wird als normal erachtet,

Patienten mit einer Ejektionsfraktion niedriger als 55% haben bereits signifikant höhere Werte. Demnach eignet sich BNP als Screening-Test für Patienten mit vermuteter oder bestehender linksventrikulärer Dysfunktion (140). Auch Yamamoto et al. (2000) veröffentlichten, dass BNP Plasmawerte bei symptomatischen Patienten das Vorhandensein einer systolischen Dysfunktion vorhersagen (141). Eine Vielzahl von Studien unterstreichen dies bei Patienten mit symptomatischer oder vermuteter kardialer Problematik aufgrund von systolischer Dysfunktion (142-146). Effektiv könne demnach eine Messung von BNP bei Risikopatienten, d.h. Patienten mit Hypertonie, Adipositas, familiären Herzerkrankungen etc. sein (147).

Im Folgenden wird BNP als diagnostischer Marker bei ausgewählten Erkrankungen, die zu einer systolischen Dysfunktion führen, beleuchtet. Tabelle 2 zeigt Erkrankungen auf, die mit einer vornehmlich systolischen Dysfunktion verbunden sind.

Mechanisms leading to systolic heart failure

1. Myocardial failure
 - l. DCM
 - m. Myocarditis
 - n. Doxorubicin toxicity
 - o. Myocardial infarct
2. Volume overload
 - p. Valvular diseases: Endocardiosis, Endocarditis, valvular dysplasia
 - q. Patent ductus arteriosus
 - r. Atrial septal defect

Tabelle 2: Mechanismen, die zu einer systolischen Dysfunktion führen modifiziert aus Ettinger et al. (1970) (132)

Dilatative Kardiomyopathie

Bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie kann BNP neben Röntgen, Elektrokardiographie, Echokardiographie und Herzkathetern zur Diagnose herangezogen werden. Im Vergleich mit der hypertrophen Kardiomyopathie (HKM) findet man hier eine wesentlich höhere BNP Ausschüttung. Dies ist wahrscheinlich auf die hochgradige Volumenüberlastung bei einer DCM zurückzuführen (148).

Myokardinfarkte

Die linksventrikuläre Funktion von Patienten mit Myokardinfarkten steht in enger Abhängigkeit zur Höhe der BNP Plasmawerte. Diese Erkenntnis ist von besonderer Bedeutung, da Captopril die Mortalität von Infarktpatienten mit linksventrikulärer Dysfunktion bei rechtzeitiger Gabe verringert (149).

Gerade die Messung von BNP 1-4 Tage nach einem akuten Infarkt gibt zuverlässige Information über die Funktionsfähigkeit des linken Ventrikels und den Grad der momentanen Herzinsuffizienz und ist dabei anderen neuroendokrinen Markern (ANP, cGMP, Katecholamine) deutlich überlegen (150). Die Höhe der BNP Plasmakonzentration steht in engem Zusammenhang zum Zeitpunkt der Rekanalisation des betroffenen Koronargefäßes. Eine frühe Rekanalisation (<6 Stunden) hat einen Anstieg der BNP Werte bis 24 Stunden nach dem Infarkt zur Folge, wohingegen bei späterer Rekanalisation ein stärkerer Anstieg bis 48 Stunden danach zu beobachten ist. Um die zukünftige ventrikuläre Funktion nach einem Infarkt abzuschätzen, wird eine BNP Messung 24 Stunden nach einer Ischämie empfohlen (151).

Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die Identifikation von Risikopatienten anhand von übermäßig hohen BNP Werten und deren dementsprechend aggressivere Therapie (152).

Kardiomyopathie nach Anthrazyklingabe

Eine Komplikation der Therapie mit Anthrazyklinen besteht in der Kardiotoxizität, die zu einer kongestiven Herzinsuffizienz führen kann. Zur Gruppe der Anthrazykline gehören z. B. Doxorubicin (Adriamycin®). Nach Anthrazyklintherapie zeigen sich meist transiente Erhöhungen von BNP im Plasma, für Patienten mit persistierender Erhöhung von BNP besteht ein hohes Risiko, eine dilatative Kardiomyopathie zu entwickeln (153). Ein Anstieg der BNP Plasmawerte wird hierbei mit einer Verschlechterung der systolischen, aber auch diastolischen Funktionsfähigkeit des Herzens assoziiert (154).

Zusammenfassend ist der Nutzen von BNP als früher und sensitiver Marker für eine Anthrazyklin-induzierte Kardiomyopathie hervorzuheben, da späte und irreversible Schäden verhindert werden können (155).

Kardiomyopathie bei der Duchenne-Muskeldystrophie

Diese X-Chromosom gebundene progressive Krankheit führt zu einer Degeneration von Muskelfasern. BNP wird hier zur schnelleren Diagnose der häufig entstehenden Kardiomyopathie verwendet, zumal aufgrund der schweren Muskelatrophie und

Thoraxdeformation eine echokardiographische Untersuchung oft unmöglich ist. Die BNP Plasmawerte korrelieren hier mit der linksventrikulären Verkürzungsfraktion (156).

Myokarditis

Die Chagas-Krankheit ist eine chronische Infektionskrankheit hervorgerufen durch *Trypanosoma cruzi*. Diese Erkrankung ist in Lateinamerika endemisch und verursacht im chronischen Stadium häufig eine Myokarditis. Auch hier zeigen Patienten mit beginnender oder manifester Myokarditis erhöhte BNP Werte aufgrund der veränderten Funktionsfähigkeit des linken Ventrikels. Die hohen Werte erlauben eine kostengünstige Identifikation der Patienten, die weitergehende Untersuchungen benötigen (157).

Das Kawasaki-Syndrom bezeichnet eine Krankheit mit unbekannter Ätiologie, die bei Kindern neben entzündlichen Veränderungen der Lymph- und Blutgefäße zu einer Myokarditis (mit folgender Herzinsuffizienz) führen kann. BNP wird hier als diagnostischer Marker für eine Myokarditis verwendet (158).

Chronische Mitralklappeninsuffizienz

Brookes et al. (2002) untersuchten BNP Plasmawerte bei Patienten mit chronischer Mitralklappeninsuffizienz. Bei allen Patienten lagen – verglichen mit Gesunden – höhere BNP Werte vor. Diese korrelierten mit den NYHA-Klassen. Die schon bei echokardiographisch unauffälligen Befunden erhöhten Werte lassen auf Veränderungen im ventrikulären Myokard schließen, die bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung auftreten. In der Zukunft kann die defekte Herzklappe bei Patienten, die besonders hohe BNP Werte aufweisen, schneller ersetzt werden (159).

9.1.4 BNP zur Diagnose einer diastolischen Dysfunktion

Eine diastolische Dysfunktion ist durch eine veränderte ventrikuläre Füllung gekennzeichnet. Das veränderte ventrikuläre Füllungsmuster kann das Resultat einer schlechteren Relaxationsphase des Ventrikels oder aber einer vermehrten Steife des Ventrikels sein. Eine diastolische Dysfunktion führt zu erhöhten Füllungsdrücken.

BNP wurde hinsichtlich seines prädiktiven Wertes evaluiert und Lubien et al. ermittelten einen Cut-off-Wert von 62 pg/ml zur Diagnose eines pathologischen Mitraleinstromprofils (diastolische Dysfunktion) bei der Dopplerechokardiographie (160)

BNP Werte stehen in Abhängigkeit zur Progression einer diastolischen Dysfunktion (161). Yamamoto et al. zeigten 1996, dass BNP zur Diagnose einer diastolischen Dysfunktion anderen Markern (C-terminales ANP und N-terminales ANP) überlegen ist (142).

Die Plasmawerte von BNP können verlässlich das Vorhandensein einer diastolischen Dysfunktion (bestätigt durch Echokardiographie) vorhersagen (160). Allerdings sind die Konzentrationssteigerungen von BNP weniger groß als bei Patienten mit systolischer oder systolischer und diastolischer Dysfunktion (144).

BNP zur Diagnose einer Hypertrophie bei systemischer Hypertonie

Bei hypertensiven Patienten ohne linksventrikuläre Hypertrophie kann nur eine moderate Erhöhung der BNP Werte festgestellt werden (162).

Suzuki et al. (2000) demonstrierten, dass BNP Plasmawerte ein geeigneter Marker für die Identifikation von solchen hypertensiven Patienten sind, die eine progressive kardiale Hypertrophie entwickeln (163). Dabei kann BNP bei hypertensiven Patienten auch unabhängig von der Hypertrophie erhöht sein kann. Dies besonders bei Patienten, die eine deutliche echokardiographische diastolische Dysfunktion vorweisen (164).

BNP korreliert zum einen mit dem Grad der linksventrikulären Hypertrophie, zum anderen mit der diastolischen Funktion. BNP kann als Marker für das ventrikuläre Remodeling bei hypertensiven Patienten verwendet werden (165).

9.1.5 Rolle von BNP bei respiratorischen Erkrankungen

Chronische schwerwiegende Atemwegserkrankungen können als Komplikation zu pulmonaler Hypertension und daraus resultierend zu Veränderungen des rechten Herzens im Sinne eines sog. Cor Pulmonale führen. Untersuchungen ergaben, dass hohe BNP Werte ein sehr nützlicher und kostengünstiger Marker für das Vorhandensein eines Cor Pulmonale sind (166).

Nagaya et al. (1998) zeigten, dass BNP Plasmawerte bei rechtsventrikulärer Drucküberlastung und auch bei rechtsventrikulärer Volumenüberlastung anstiegen. Als Modell für eine rechtsventrikuläre Volumenüberlastung wurden Patienten mit Atriumseptumdefekten herangezogen, für die Drucküberlastung wurde BNP bei Patienten mit pulmonärer Hypertension herangezogen. Besonders hohe Werte waren bei Drucküberlastung zu beobachten. Die Autoren folgerten, dass die BNP Sekretion im Verhältnis zum Grad der rechtsventrikulären Dysfunktion anstieg (167).

9.2 BNP als prognostischer Marker

Man vermutete schon früh, dass BNP anderen Neurohormonen (z.B. ANP) in der Risikoeinschätzung nach Myokardinfarkten überlegen sein könnte. Dies liegt unter anderem daran, dass BNP zwar vom gesamten ventrikulären Myokard freigesetzt wird, aber besonders von der Infarktzone (168). Dies führt zu der Annahme, dass ein Anstieg des Plasma BNP abhängig von der Größe des Infarktes und der Schwere der ventrikulären Dysfunktion sei. Diese Faktoren ihrerseits stehen in enger Beziehung zur Prognose (169). Die Höhe der BNP Plasmawerte in den ersten Tagen nach einem akuten Myokardinfarkt korrelieren mit der Entwicklung einer kongestiven Herzinsuffizienz und der Mortalität in den nächsten 12 Monaten (152). Myokardinfarkte verursachen komplexe Umbauvorgänge in der ventrikulären Architektur, die in einer Dilatation und Hypertrophie des nicht infarzierten Myokards resultieren, sowie in einer Wandverdünnung in der Infarktzone. Die Vergrößerung nicht infarzierten Myokards (sog. Remodeling) vollzieht sich über Monate nach dem Infarkt und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden. Persistierend hohe BNP Werte nach einem Myokardinfarkt dienen als komplexer prognostischer Indikator für progressives ventrikuläres Remodeling (170, 171).

Auch bei Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris sind BNP Werte von prognostischem Wert. Patienten mit instabiler Angina haben höhere Werte als solche mit stabiler Angina (172). Auch hier zeigen Patienten, die eine kurze Überlebenszeit haben, höhere Werte (173).

Bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz kann BNP Risikopatienten herausfiltern (174). Unter den Patienten, die während ihres Klinikaufenthaltes steigende BNP Werte trotz Therapie zeigen, sind häufiger Todesfälle und stationäre Wiederaufnahmen zu sehen. Dabei zeigen BNP Werte unter 430pg/ml einen starken negativ prädiktiven Wert für die Wiederaufnahme der Patienten (175). Maeda et al. (2000) führten in einer Studie mit 112 Probanden mit kongestiver Herzinsuffizienz (NYHA-Klassen 3 oder 4), Messungen von BNP vor und 3 Monate nach optimierter Therapie durch. Hierbei zeigte sich, dass hohe BNP Werte auch nach verbesserter Therapie ein unabhängiger prognostischer Marker für Mortalität und Morbidität sind – und dies unabhängig von einer Verbesserung der echokardiographischen Parameter oder Symptome (176). Dies legt Plasma BNP als sinnvollen und kosteneffizienten Prognosemarker nahe, welcher im klinischen Alltag die Patienten identifizieren kann, die eine intensivere Therapie und häufigere Kontrollen benötigen (174).

Auch bei pulmonaler Hypertension, verbunden mit rechtsventrikulären Veränderungen (Cor Pulmonale), können erhöhte BNP Werte wichtige prognostische Hinweise liefern. Sehr hohe Plasmawerte sind mit einer erhöhten Mortalität (innerhalb 24 Monaten) verbunden. Diese sind unabhängig von bestimmten hämodynamischen und klinischen Variablen (167). Auch andere Studien belegen, dass erhöhte BNP Werte bei Patienten mit Cor Pulmonale mit einer erhöhten Mortalität korrelieren (177).

10 Klinische Bedeutung von BNP in der Tiermedizin

In der Veterinärmedizin könnte aus vielen Gründen eine Messung von BNP und auch anderen biochemischen Markern von großem Nutzen sein. Die Aussicht, Hunde mit asymptomatischen Herzerkrankungen mithilfe von Plasma BNP zu identifizieren, erscheint in vielerlei Hinsicht sinnvoll. Damit könnten auch Tierärzte ohne spezielle kardiologische Ausbildung Tiere mit Herzerkrankungen sicherer und früher erkennen. Dies würde bei gesunden Tieren unnötige Medikationen vermeiden helfen und andererseits bei kranken Tieren eine frühere medikamentöse Intervention ermöglichen. Die BNP Messung kann andere diagnostische Mittel wie z. B. Röntgen im Falle eines Befundes (z. B. Kardiomegalie) ergänzen. Eine andere Anwendungsmöglichkeit ist das Messen von BNP bei bestimmten Rassen, die zu Kardiomyopathien neigen (178).

Auch bei Hunden korreliert der BNP-Spiegel mit Veränderungen des intrakardialen Druckes, wie sie bei der Entstehung einer kongestiven Herzinsuffizienz vorliegt. Allerdings zeigt BNP eine geringere Plasmaspiegelerhöhung als ANP (179). Ein signifikanter Unterschied liegt in der Höhe von BNP bei Hunden mit kompensierten Herzkrankheiten gegenüber dekompensierten Herzkrankheiten. Die Höhe des Plasma BNP steht in Zusammenhang mit den NYHA-Klassen, allerdings bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen NYHA IV und III gegenüber I und II. Einschränkend muss erwähnt werden, dass dieser Studie sehr geringe Fallzahlen zugrunde liegen (6 Hunde) (180).

Tessier et al. demonstrierten 2002, dass sich BNP als biochemischer Marker für asymptomatische linksventrikuläre Dysfunktion eignet. Hierbei wurden asymptomatische Hunde mit einer X-chromosomalen Mutation des Dystrophingens (Tiermodell für DCM) anhand von BNP Messung und Echokardiographie mit gesunden Kontrollen verglichen. Trotz

unauffälliger echokardiographischer Ergebnisse war ein signifikanter Unterschied der BNP Plasmawerte der Hunde mit normalem Genotyp und der Hunde mit Golden Retriever-Muskeldystrophie (181).

MacDonald et al. veröffentlichten 2003 eine Studie über Hunde mit erworbener Mitralklappeninsuffizienz. Hier wurde eine progressive Erhöhung der BNP Werte im Verhältnis zur Schwere der Krankheit festgestellt. Außerdem bestand ein signifikanter Unterschied der BNP Werte von gesunden Hunden und solchen, die an einer mittelgradigen Mitralinsuffizienz ohne röntgenologische Hinweise auf Kongestion litten. Außerdem zeigte sich eine Korrelation der BNP Werte mit der Mortalität der Patienten (182).

Auch beim Hund bietet die BNP Messung eine zukunftsweisende Perspektive, respiratorische Krankheiten schnell von kardialen Problemen abzugrenzen (183).

11 Bedeutung von BNP für die Therapie von Herzkrankheiten

11.1 Die Verabreichung von BNP als Therapie

Der Gebrauch von BNP als therapeutisches Agens profitiert von seinen physiologischen Wirkungen wie z. B. Vasodilatation, Natriurese, Diurese, aber vor allem durch die Antagonisierung des RAAS. Im Gegensatz hierzu stimulieren viele Vasodilatoren und Diuretika das RAAS (184).

Die Infusion von BNP bei gesunden Hunden und bei Hunden mit kongestiver Herzinsuffizienz führt zu einer Vor- und Nachlastsenkung mit einer Verringerung des pulmonalen Druckes und des systemischen Widerstandes sowie einer Stärkung der diastolischen und systolischen Funktion des Herzens (80). Die Stärke und die Dauer dieser hämodynamischen Verbesserungen sind bei herzkranken Patienten dosisabhängig (185).

In einer Studie von Chen et al. (2000) wurden die kardioresalen und endokrinen Wirkungen bei wiederholter subkutaner Gabe von BNP bei Hunden mit experimenteller Herzinsuffizienz dargestellt. Die subkutane Gabe von BNP führte zu einer raschen Absorption von BNP, einer Verbesserung des Herzauswurfes, einer Verringerung des systemischen peripheren

Widerstandes und zu keiner Aktivierung des RAAS. Die subkutane Verabreichung von BNP stellt eine potentiell neue Therapiestrategie dar (186).

Bei Patienten mit Hypertension verändert eine BNP Infusion die kardiale Funktion nicht, allerdings wird die Natriurese und Diurese angeregt (187).

Cargill et al. (1996) demonstrierten, dass eine BNP Infusion bei Patienten mit Cor Pulmonale zu einer pulmonalen Vasodilatation und einer Unterdrückung der Aldosteronsekretion führt und dies ohne Verschlechterung der Sauerstoffsättigung (188).

Die klinische Anwendung von BNP als Therapeutikum bleibt dennoch beschränkt, da nur eine sehr kurze Wirkzeit nach Infusion von BNP besteht. Dies ist in der kurzen Plasmahalbwertszeit begründet. Eine orale Gabe von BNP ist aufgrund der Peptidstruktur nicht möglich; so eignet sich eine BNP Infusion nur für kurzfristige Fragestellungen (184). Die subkutane Gabe von BNP stellt ein neues Therapieprinzip dar, die Untersuchung der Wirksamkeit dieses neuen Konzeptes benötigt noch weitere klinische Studien.

11.2 Hemmung des Abbaus von BNP

Ein neuer therapeutischer Ansatz in der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz ist die Gabe von Hemmern der neutralen Endopeptidase. Damit wird eine Degradation von BNP und ANP verhindert und damit die Halbwertszeit der natriuretischen Peptide erhöht. Die Stabilität und Selektivität der Bindung der Inhibitoren an die NEP wird durch eine Kombination von Wasserstoffbrücken, Van der Waalschen Kräften und ionischen Interaktionen erreicht. Im Moment gibt es vier verschiedene Wirkstoffklassen (75).

Bei Patienten mit chronischer kongestiver Herzinsuffizienz führt die Gabe des Endopeptidasehemmers Candoxatrilat zu einer signifikant erhöhten Natriurese und verminderten kardialen Füllungsdrücken (189). Allerdings bewirkt Candoxatrilat keine Blutdrucksenkung bei Patienten mit essentieller Hypertension. Dies ist wahrscheinlich die Folge einer Angiotensin II vermittelten Vasokonstriktion (190). Experimentelle Voruntersuchungen lassen vermuten, dass eine NEP-Hemmung eine protektive Wirkung auf die Gefäßwand habe. Dies lässt den Schluss zu, dass NEP-Inhibition auch die kardiovaskuläre Prognose positiv beeinflussen könne (83).

Ein weiteres neues Therapiekonzept in der Behandlung der Hypertonie und der Herzinsuffizienz ist die sog. Vasopeptidase-Hemmung. Dies ist die gleichzeitige Hemmung des Angiotensin-Konversions-Enzyms und der NEP durch eine einzige chemische Substanz.

Dadurch werden gleichzeitig die ungünstige Wirkung des RAAS vermindert und die günstigen Effekte der endogenen natriuretischen Peptide verstärkt. Die Folge einer derartigen dualen Inhibition besteht in einer synergistischen Reduktion der Vasokonstriktion und Verstärkung der Vasodilatation; dadurch wird eine effektivere Blutdrucksenkung erreicht (75). In einer Studie von Favrat et al. (1995) konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit essentieller Hypertension weder ein NEP-Hemmer alleine noch Captopril alleine zu einer signifikanten Veränderung des Blutdruckes führte, die Kombination dieser beiden allerdings senkte den Blutdruck in signifikanter Weise (191). Omapatrilat ist der bekannteste und modernste Vasopeptidase-Hemmer, es besteht eine gleichgroße Affinität in der Hemmung von ACE und NEP. Omapatrilat senkt den Blutdruck stärker als Lisinopril und als Amlodipin (Calcium-Kanal-Blocker). Außerdem zeigt eine Behandlung mit Omapatrilat gegenüber Lisinopril bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz eine Verbesserung der NYHA-Klasse und eine Verbesserung der Langzeitprognose (192). Auch bei Hunden bewirkt Omapatrilat mit oder ohne Diuretikum vergleichbar günstige kardioresnale und humorale Antworten wie ein Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (ACEI) und ein Diuretikum (193).

Momentan wird große Hoffnung in die Vasopeptidasehemmer gesetzt, die als Therapie bei Hypertension, kongestiver Herzinsuffizienz und vaskulärem Remodeling dienen könnten. Die Sicherheit der Vasopeptidasehemmer wird in zahlreichen Studien erprobt, besonders die Gefahr des Angioödems (75).

11.3 Therapiemodifikationen anlehnend an BNP Konzentrationen

Neben der Suche nach spezifischen Medikamenten zur Verbesserung der Symptomatik bei kardiovaskulären Erkrankungen stellt die Anlehnung der Therapie an biochemische Parameter einen Meilenstein dar. Troughton et al. (2000) verwendeten BNP Plasmawerte als Vorlage für die Titration einer Therapie. In dieser Studie wurde bei 69 Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz die Therapie (ACEI, Vasodilatoren, Diuretika) von Plasmakonzentrationen von N-terminalem BNP oder einer klinischen Einteilung (sog. Framingham Kriterien) geleitet. Bei Patienten, bei denen die jeweiligen Ziele während der Therapie nicht erreicht wurden, wurde die Therapie schrittweise erhöht. Das Ziel bezüglich der BNP Werte war, unter Therapie BNP Werte im Referenzbereich zu erreichen.

In der BNP Gruppe führte dieses Protokoll zur Gabe von höheren ACEI und Diuretika Gaben im Vergleich zur Framingham-Gruppe. Nach 9,5 Monaten zeigten sich häufiger kardiovaskuläre Zwischenfälle in der Framingham-Gruppe (194). Diese Studie repräsentiert einen neuen Schritt bei der Suche nach Therapieverbesserungen. Eine andere Studie mit 20 Patienten zeigte bei der Gruppe, in der die ACEI Dosen nach BNP Werten titriert wurde, eine stärkere Inhibition des RAAS und eine stärkere Reduktion der Herzfrequenz (195).

11.4 Wechselwirkung zwischen BNP und Herzmedikamenten

ACEI und β -Blocker sind Standardmedikamente in der Behandlung der Herzinsuffizienz, da sie nachweislich die Mortalität reduzieren. Da diese Substanzen das neurohumorale System antagonisieren, führt der Gebrauch von ACEI zu einer frühen, dosisabhängigen und anhaltenden Reduktion der natriuretischen Peptide im Blut (195, 196). In der Folge eines Myokardinfarktes kann die Gabe eines ACEI den zweiten Anstieg der BNP Werte verhindern, der bei beginnendem ventrikulärem Remodeling auftritt (197).

Die Wechselwirkungen zwischen β -Blockern und BNP Werten scheinen komplexerer Natur zu sein. Einerseits senken natriuretische Peptide den Sympathikustonus, andererseits erhöht die Gabe von β -Blockern die BNP Plasmawerte (198). Möglicherweise spiegeln BNP Plasmawerte die Wirksamkeit der β -Blocker wieder. In einer Studie mit 415 Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz, die mit Carvedilol behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Mortalität bei den Patienten, bei denen die BNP Werte über 82 pg/ml lagen (199).

III Material und Methoden

1 Patientengut

Zur Erstellung der Referenzwerte wurden Blutproben von 79 Hunden untersucht. Die Hunde waren entweder Patienten der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München oder gesunde Hunde im Privatbesitz von Tierärzten und Tiermedizinstudenten. Den Hunden wurde im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen Blut genommen.

Klinikpatienten wurden nur dann in die Studie aufgenommen, wenn sie ohne kardiale Krankheitssymptome vorgestellt wurden oder die Blutentnahme kurz vor Entlassung erfolgte und sie nach erfolgreicher Behandlung als geheilt entlassen werden konnten.

Bei den Hunden handelte es sich um 23 Mischlingshunde und 56 Rassehunde (Tabelle 3), die sich 27 Hunderassen zuordnen ließen: Boxer, Deutscher Schäferhund, Golden Retriever, Husky, Howawart, Mischlingshund, Rottweiler und Sheltie waren dabei die am häufigsten vertretenen Rassen (Abbildung 4). Für die statistische Auswertung wurden dabei nur die häufigsten Rassen verwendet, die anderen Rassehunde wurden in einer Gruppe zusammengefasst.

41 Rüden und 38 Hündinnen wurden in die Studie aufgenommen. Dies entspricht 52 % männliche Tiere und 48 % weibliche Tiere. Dabei waren 13 männliche und 21 weibliche Tiere kastriert bzw. ovariohysterektomiert (Abbildung 5).

Das Alter der in die Studie aufgenommenen Hunde lag zwischen 3 Monaten und 15 Jahren bei einem Mittelwert von 4,8 Jahren (Abbildung 6).

Je nach Gewicht wurden die untersuchten Probanden in verschiedene Gruppen eingeteilt: Gruppe K (klein): <10kg, Gruppe M (mittel): 10-25kg, Gruppe G (groß): >25kg. Dabei waren 11 Hunde in der Gruppe K, 18 Hunde in der Gruppe M und 50 Hunde in der Gruppe G

(Abbildung 7). Bei prozentualer Berechnung gehörten 14 % der Probanden zu der Gruppe K, 23 % zu der Gruppe M und 63 % zu der Gruppe G.

Hunderasse	Anzahl	Prozent	Hunderasse	Anzahl	Prozent
Berger de Beauce	n = 1	1,3 %	Howawart	n = 3	3,8 %
Boxer	n = 3	3,8 %	Kleiner Münsterländer	n = 1	1,3 %
Bobtail	n = 1	1,3 %	Kleinspitz	n = 2	2,5 %
Berner Sennenhund	n = 1	1,3 %	Mix	n = 23	29,1 %
Border Terrier	n = 1	1,3 %	Alaskan Malamute	n = 1	1,3 %
Deutsche Dogge	n = 1	1,3 %	Maremmar Schäferhund	n = 1	1,3 %
Dalmatiner	n = 1	1,3 %	Magyar Vizsla	n = 1	1,3 %
Dobermann	n = 1	1,3 %	Neufundländer	n = 1	1,3 %
Deutscher Schäferhund	n = 9	11,4 %	Rauhaardackel	n = 2	2,5 %
Deutsche Wachtel	n = 1	1,3 %	Rottweiler	n = 4	5,1 %
Englischer Setter	n = 1	1,3 %	Schappendoe	n = 2	2,5 %
Flat Coated Retriever	n = 1	1,3 %	Sheltie	n = 3	3,8 %
Golden Retriever	n = 7	8,9 %	Weimaraner	n = 1	1,3 %
Husky	n = 4	5,1 %	Zwergpinscher	n = 1	1,3 %

Tabelle 3: Anzahl und Prozent der Probanden in den einzelnen Hunderassen, n = 79

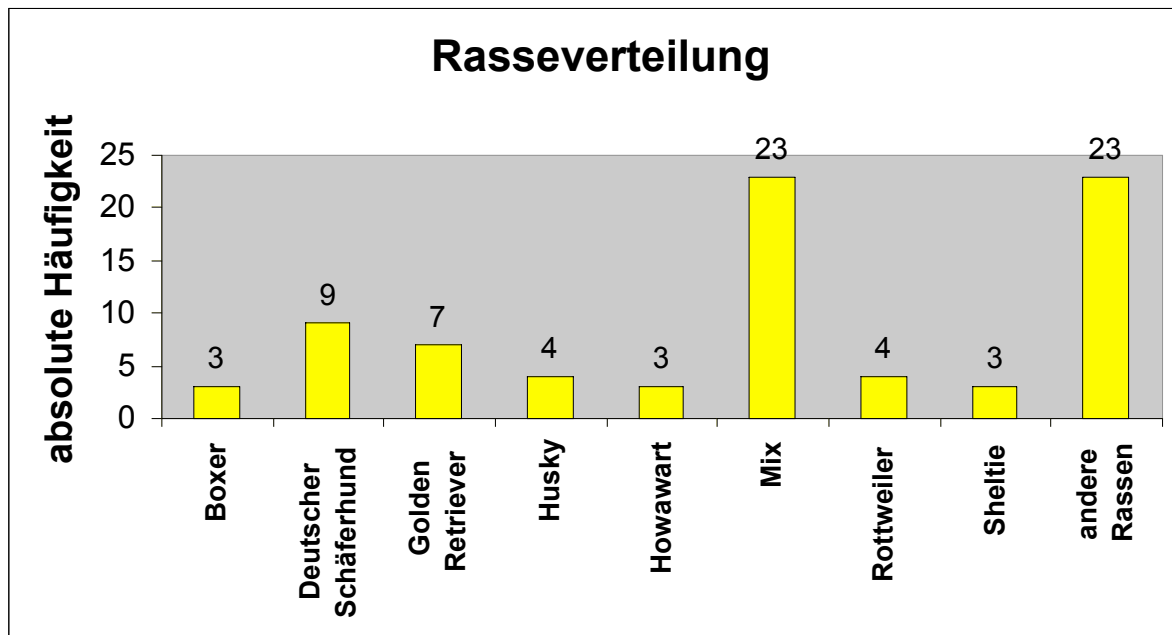


Abbildung 4: Absolute Häufigkeiten der verschiedenen Hunderassen

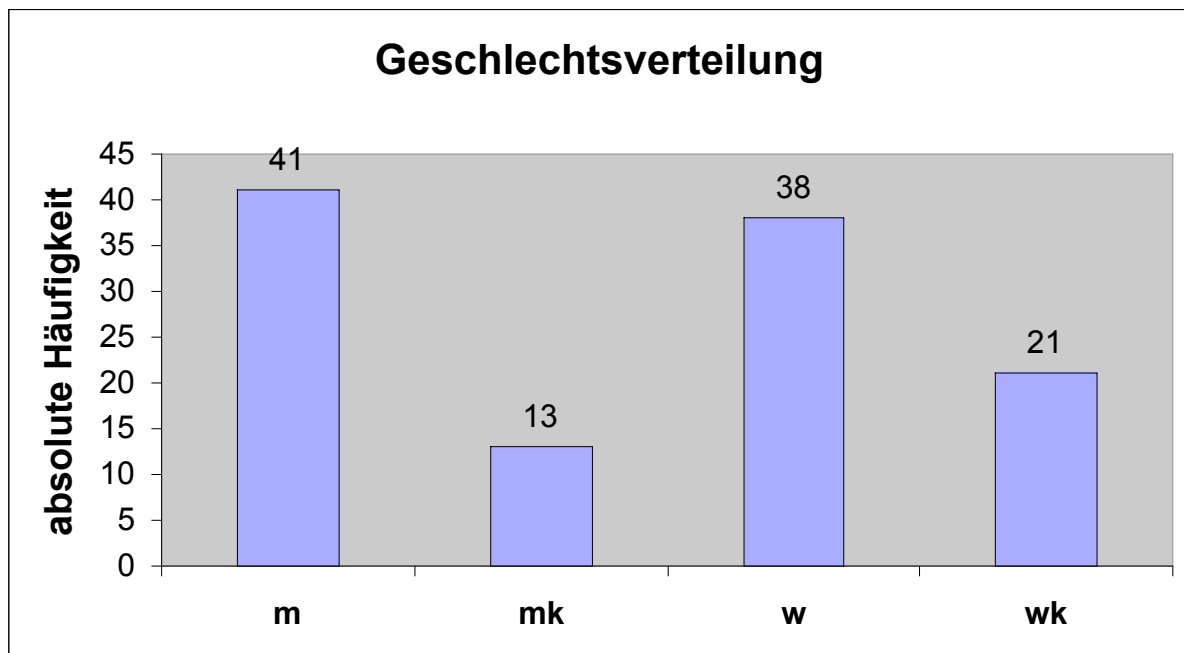


Abbildung 5: Geschlechtsverteilung

m: männlich, **mk:** männlich kastriert, **w:** weiblich, **wk:** weiblich kastriert

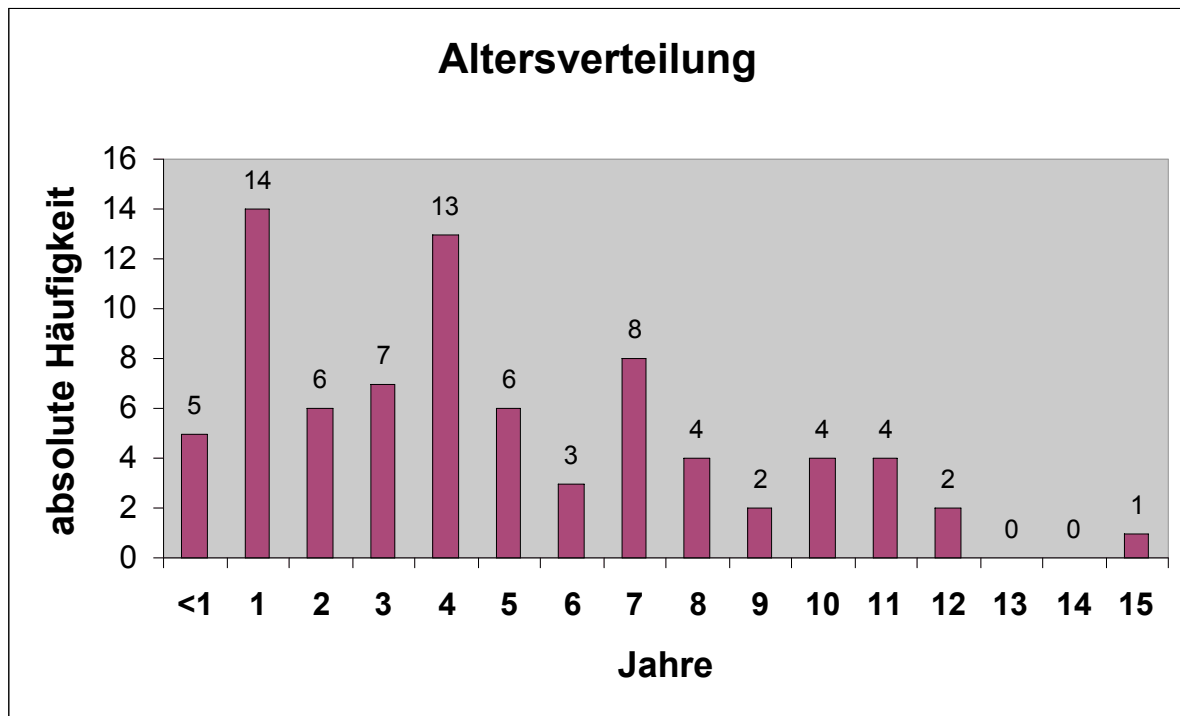


Abbildung 6: Altersverteilung

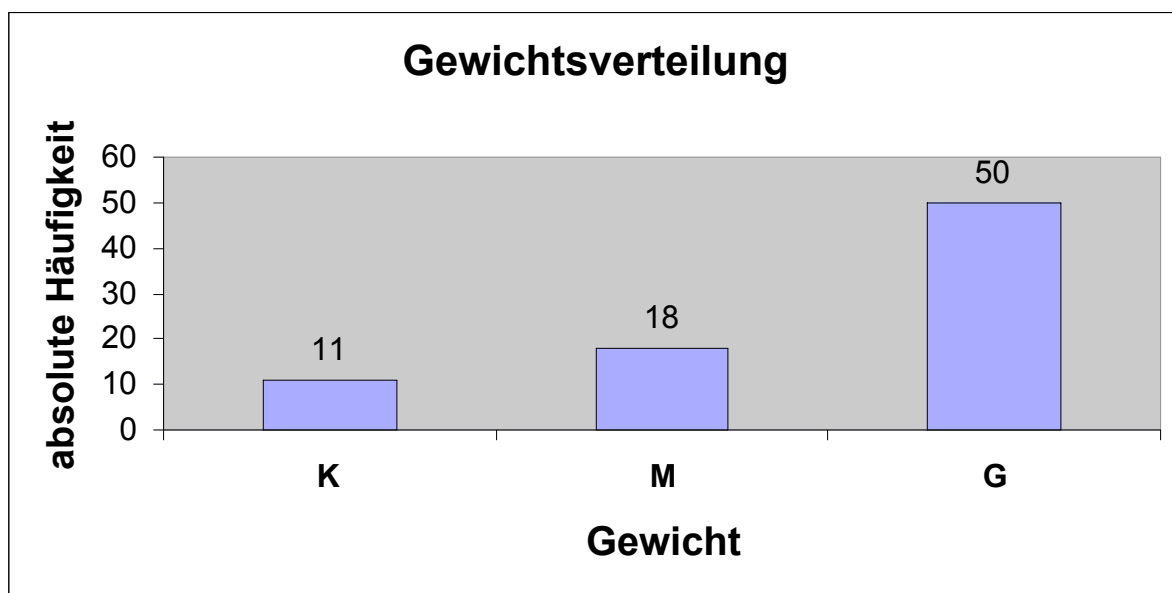


Abbildung 7: Gewichtsverteilung

K: <10 kg, M: 10-25 kg, G: >25 kg

2 Untersuchung

2.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Nach der Feststellung von Alter, Rasse, Geschlecht und Gewicht der untersuchten Hunde wurde der Vorbericht aufgenommen. Hierbei wurde erfragt, ob Leistungsinsuffizienz, Husten oder Synkopen vorlagen. Keiner der vorgestellten Hunde zeigte eines dieser Symptome.

Die klinische Allgemeinuntersuchung war bei allen untersuchten Tieren unauffällig. Besonderer Wert wurde auf die Untersuchung des Kreislaufes gelegt. Hierbei erfolgten eine palpatorische Beurteilung des Pulses, eine Beurteilung der Schleimhäute sowie eine Auskultation des Herzens. Keiner der untersuchten Hunde zeigte ein pathologisches Herzgeräusch oder andere auskultatorische Auffälligkeiten.

Um die klinische Gesundheit der Probanden zu verifizieren, wurde bei jedem Tier ein komplettes Blutbild erstellt, sowie die Parameter Harnstoff, Kreatinin, Alkalische Phosphatase, Bilirubin, Gesamteiweiß, Albumin und die Elektrolyte (Kalium, Phosphat, Natrium, Chlorid) bestimmt.

2.2 Echokardiographische Untersuchung

2.2.1 Allgemeines

Bei allen Probanden wurde die Echokardiographie am liegenden Patienten unsediert in rechter und linker Seitenlage durchgeführt. Es wurde ein spezieller Untersuchungstisch genutzt, der eine Aussparung auf der Höhe des Herzens zur leichteren Untersuchung aufwies. Um eine möglichst gute Ankopplung zwischen Haut und Schallkopf zu erzielen, wurde sowohl 70% iger Alkohol (m/m) als auch reichlich Kontaktgel aufgetragen. Ein Scheren der Haare war bei keinem Hund erforderlich. Während der Untersuchung wurde simultan ein einkanaliges EKG aufgezeichnet.

Für alle Hunde wurde ein 6 Megahertz Schallkopf verwendet. Alle Probanden wurden mit dem Gerät der I. Medizinischen Tierklinik (GE Logiq® 400, GE Medical Systems, Cedex, Frankreich) untersucht.

2.2.2 Zweidimensionale Echokardiographie

Von rechts-parasternal wurde in der Längsachse der Vierkammerblick eingestellt. Auf diese Weise wurden der linke Vorhof, die Mitralklappe und das Myokard des Septums und der freien linksventrikulären Wand beurteilt. Soweit einsehbar konnten auch das rechte Atrium, die Trikuspidalklappe und der rechte Ventrikel beurteilt werden. Die Aorta wurde durch leichtes Drehen des Schallkopfes aus dem Vierkammerblick eingestellt und beurteilt. In der Kurzachse von rechts-parasternal wurden vier Standardebenen, die sich in Höhe der Herzspitze, der Papillarmuskeln, der Mitralklappe und der Aortenklappe befinden, eingestellt. Zur umfassenden Beurteilung der Herzkammern gehörte auch die apikale Darstellung im Vierkammerblick von der linken Thoraxseite aus. Von dieser Vierkavitätenansicht sind die Kammern und Vorhöfe gut sowie Teile der sie trennenden Scheidewände bedingt erfassbar. Durch leichtes Drehen des Schallkopfes wurde dann die Aortenklappe und ein Teil der Aorta ascendens sichtbar. Da der Truncus Pulmonalis von der rechten Thoraxseite oft schlecht darzustellen ist, wurde er bei allen Hunden auch von links-apikal eingestellt. Bei keinem der untersuchten Hunde wurde hierbei eine Besonderheit festgestellt.

2.2.3 Echokardiographische Messungen

Um eine Quantifizierung der einzelnen Strukturen zu erreichen, wurde bei der Beurteilung des linken Atriums sowohl eine Messung von rechts-parasternal in der Längsachse als auch in der Kurzachse durchgeführt. Der maximale Durchmesser des linken Vorhofs wurde im rechts-parasternalen Vierkammerblick parallel zum Mitralklappenring in Systole ermittelt.

Die linksventrikulären Dimensionen wurden bei allen Probanden mindestens einmal in der rechts-parasternalen Kurz- und Längsachse in der motion-mode Echokardiographie (M-Mode) ausgemessen. Diese Messung erfolgte in der Längsachse in Höhe der Chordae tendinae parallel zum Mitralklappenring. Dabei wurde der Durchmesser des interventrikulären Septums (IVS), des linken Ventrikels (LVD) und der freien Wand des linken Ventrikels (LVPW) in Systole und Diastole gemessen. Aus den ermittelten

Messwerten wurde die linksventrikuläre segmentale Verkürzungsfraction (LV FS) berechnet $[LV\ FS(\%)=(LVDd-LVDs)/LVDd]$ (200). In der Kurzachse wurde zwischen den Papillarmuskeln auf dieselbe Weise gemessen.

Die Werte der untersuchten Hunde lagen im Referenzbereich, es lag keine Vergrößerung des linken Atriums vor, die Messung der linksventrikulären Dimensionen lag bei den verschiedenen Hunderassen im Referenzbereich.

2.2.4 Dopplerechokardiographie

Die Blutflussprofile von Aorta und Pulmonalis wurden bei allen Hunden mit dem kontinuierlichem Dopplerverfahren (CW-Doppler) aufgezeichnet und dabei die maximalen Geschwindigkeiten ermittelt. Das farbkodierte Dopplerverfahren wurde verwendet um eventuelle Regurgitationen an Aorten-, Pulmonal-, Mitral- und Trikuspidalklappe zu ermitteln.

Es konnten bei den Probanden keine Insuffizienzen oder erhöhte Geschwindigkeiten ermittelt werden, lediglich physiologische Regurgitationen, die als nicht krankhaft eingestuft wurden.

3 Probenverarbeitung

3.1 Probenentnahme

Das Blut wurde bei allen Probanden aus der Vena cephalica antebrachii mit sterilen Einmalkanülen (Sterikan® 0,9*40 mm, Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen) entnommen. Die Punktionsstelle wurde zuvor desinfiziert und die Vene von einem Helfer gestaut. Das Blut konnte an der Wand des Röhrchens frei abfließen.

Die Vollblutsammlung erfolgte in einem (bei -20 °C) eisgekühlten Probengefäß mit Antikoagulanzen (K-EDTA-beschichtetes Röhrchen, 5 ml, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht).

3.2 Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung wurde nicht nach der vom Hersteller des Radioimmunoassays empfohlenen Methode vorgenommen, sondern nach dem Verfahren von Borgeson et al. (1998). Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme bei 4 °C mit 1600 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Je 1 ml Plasma wurde in Polystyren-Röhrchen (PS-Röhrchen 13 x 75mm, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nürnbrecht) pipettiert und bis zur Durchführung des Radioimmunoassays bei -70 °C aufbewahrt (37).

4 Durchführung des Tests

4.1 BNP-Extraktion

Auch die Plasmaextraktion wurde nicht nach der vom Hersteller des Radioimmunoassays empfohlenen Methode durchgeführt, sondern nach dem Verfahren von Borgeson et al. (1998). Zur Plasmaextraktion wurden C-8 Säulen (Bond Elut® C8, Varian Incorporated, Harbor City, USA) verwendet. Diese Säulen wurden mit 4 ml 100 %igem Methanol (Methanol zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt) und anschließend mit 4 ml Aqua ad injectionem (Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen) aktiviert. Der nächste Schritt bestand in einer Ansäuerung des Plasmas mit 1 ml 0,5 %iger (m/v) Trifluoressigsäure (TFA) (Trifluoressigsäure 99 %, Milwaukee, USA) und anschließender Zentrifugation bei 10.000 x g für 20 Minuten bei 4 °C. Der Überstand des Plasmas wurde auf die vorbereiteten Säulen gegeben. Danach wurden die Säulen mit 2 ml 0,9 %iger (m/v) Natriumchloridlösung (isotone Kochsalzlösung, Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen), 6 ml Aqua ad injectionem und 1 ml 100 %igem Methanol gewaschen. Anschließend wurde das zu isolierende BNP mit einer Lösung von 2 ml 90 % igem Methanol in 1 % iger TFA eluiert. Die erhaltenen Proben wurden in 13x75 mm PS-Röhrchen aufgefangen und in einem Speed Vac Concentrator (Integrated Speed Vac® System ISS100-230, Savant Instruments Incorporated, Farmingdale, USA) über

Nacht (8-12h) bei niedriger Trocknungsstufe verdampft und dann bis zur Durchführung des Radioimmunoassays bei -70 °C eingefroren.

4.2 Radioimmunoassay

4.2.1 Testprinzip

Die Durchführung des Radioimmunoassays erfolgte an 3 aufeinander folgenden Tagen. Es wurde ein kommerzieller Radioimmunoassay für kanines BNP verwendet (BNP-32 canine RIA Kit, PhoenixPeptide, Belmont, USA). Das Antiserum, das in diesem Test verwendet wird, wurde gegen eine synthetische Form des kaninen BNP-32 gezogen.

Der vorliegende RIA basiert auf einer kompetitiven Hemmung. Das mit ^{125}J radioaktiv markierte Peptid (^{125}J -Peptid) konkurriert mit zugesetztem BNP-32 (entweder Standard oder unbekanntes Peptid) um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen am Antikörper. Diese Antikörper sind spezifisch für natürlich vorkommendes und synthetisches BNP-32 und ihre Konzentration ist kleiner als die Konzentration des markierten Antigens. Wenn die Menge von Standard oder unbekanntem Peptid in der Reaktion zunimmt, verringert sich der Anteil des gebundenen ^{125}J -Peptids. Das bedeutet, dass die Menge an gebundenem markierten Antigen umgekehrt proportional zu der Menge an unmarkiertem Antigen ist. Durch die Messung der Menge des gebundenen ^{125}J -Peptids ist es möglich eine Standard-Kurve herzustellen, woraus die unbekannte Quantität des BNP-32 ermittelt werden kann.

4.2.2 Herstellung der Reagenzien und Standards

Am ersten Tag wird das RIA-Puffer-Konzentrat mit 150 ml Aqua ad injectionem verdünnt. Dieser Puffer dient zur Rekonstitution aller verwendeten Komponenten. Zuerst wird das Standardpeptid mit 1 ml RIA-Puffer gelöst, auf dem Vortexer (Vortex Genie 2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) gemischt und dann auf Eis gelagert. Das Kaninchen-Anti-Peptid-Serum wird in 13 ml RIA-Puffer gelöst, gut gemischt und dann ebenfalls auf Eis gelagert. Auch die extrahierten und eingetrockneten Blutproben werden mit je 250 µl RIA-Puffer versetzt und gemischt, um eine vollständige Auflösung der Trockensubstanz zu gewährleisten. Auch hier erfolgt eine sofortige Lagerung auf Eis.

Zur Herstellung der Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe hergestellt (Tabelle 4).

Bezeichnung	Probe	RIA Puffer	Menge des Standardpeptids in 100 µl
Basis	Standardpeptid	1 ml	
0	10 µl von Basis	990 µl	
A	10 µl von 0	990 µl	128 pg/ Probe
B	500 µl von A	500 µl	64 pg/Probe
C	500 µl von B	500 µl	32 pg/Probe
D	500 µl von C	500 µl	16 pg/Probe
E	500 µl von D	500 µl	8 pg/Probe
F	500 µl von E	500 µl	4 pg/Probe
G	500 µl von F	500 µl	2 pg/Probe
H	500 µl von G	500 µl	1 pg/Probe

Tabelle 4: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Standardkurve

Für den zweiten Tag des RIA-Protokolls wird das radioaktive ^{125}J -Peptid mit 13 ml RIA Puffer verdünnt. Am dritten Tag wird das lyophilisierte Ziege-Anti-Kaninchen IgG (GAR) in 13 ml RIA Puffer gelöst, gemischt und auf Eis gestellt. Ebenso wird bei der Herstellung des normalen Kaninchenserums (NRS) verfahren.

4.2.3 Durchführung des RIAs

Tag 1

Im Anschluss an die Herstellung der Standardkurve werden alle Röhren für die zu untersuchenden Proben und die Standards beschriftet und die Proben in Polystyren-Röhren (PS-Röhren 13x75mm, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nürnberg) pipettiert. Die Herstellung der Total Counts (TC), nicht spezifische Bindungen (NSB) und gesamten Bindungen (TB) wurde anhand von Tabelle 5 durchgeführt. Für die Standards H bis A wird 100 µl in je 2 Röhren pipettiert. Auch von den Blutproben mit unbekannter Quantität des

Peptids wird je 100 µl in zwei Röhren gegeben, um für jeden Patienten eine Doppelprobe zu erhalten.

Zu allen Proben außer TC und NSB wird 100 µl des gelösten primären Antikörpers (Kaninchen-Anti-Peptid-Serum) gegeben. Alle Proben werden auf dem Vortexer gut gemischt und mit einem feuchten Tuch bedeckt für 16-24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Röhren	Inhalt	RIA-Puffer	Standard oder Blutprobe	Primärer Antikörper	¹²⁵ J
TC 1,2	Total Counts				100 µl
NSB 1,2	Nicht-spezifische Bindung	200 µl			100 µl
TB 1,2	Gesamte Bindung	100 µl		100 µl	100 µl
7,8	H Standard		100 µl	100 µl	100 µl
9,10	G Standard		100 µl	100 µl	100 µl
11,12	F Standard		100 µl	100 µl	100 µl
13,14	E Standard		100 µl	100 µl	100 µl
15,16	D Standard		100 µl	100 µl	100 µl
17,18	C Standard		100 µl	100 µl	100 µl
19,20	B Standard		100 µl	100 µl	100 µl
21,22	A Standard		100 µl	100 µl	100 µl
23,24	Probe 1		100 µl	100 µl	100 µl
25,26	Probe 2		100 µl	100 µl	100 µl
27,27	Probe 3		100 µl	100 µl	100 µl
Etc.	Etc.		100 µl	100 µl	100 µl

Tabelle 5: Inhalte aller Teströhren vor der ersten Inkubation

Tag 2

Am 2. Tag wird zunächst die Konzentration der sog. Tracer Solution, d.h. der Lösung mit dem radioaktiv markierten Peptid, gemessen. Hierbei sollte in 100 µl der Lösung eine ungefähre Konzentration von 8.000-10.000 counts per minute (cpm) vorhanden sein. Es werden 10 µl des Konzentrats entnommen und die Radioaktivität im Gamma Counter (1470 Wizard®, Wallac, Turku, Finnland) gemessen, wobei die Konzentration in 10 µl zwischen 800-1000 cpm liegen sollte. Bis zum Erhalt der gewünschten Konzentration wird die Tracer Solution mit RIA Puffer verdünnt. Anschließend wird jede Probe mit 100 µl dieser Tracer Solution versehen. Nach einer guten Durchmischung aller Proben erfolgt eine erneute Inkubation für 16-24 Stunden bei 4°C.

Tag 3

Zur Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes werden am 3.Tag alle Röhren außer den TC-Röhren mit 100 µl GAR versetzt. Außer zu den beiden TC-Röhren werden 100 µl NRS zu allen Röhren zugefügt. Nach einer sorgfältigen Durchmischung auf dem Vortexer erfolgt eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nachfolgend werden 500 µl RIA Puffer zugegeben, außer in die TC-Röhren. Alle Proben außer TC werden bei 1700 x g für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Danach wird der Überstand bei allen Röhren, außer den TC- und NSB-Röhren, bei denen sich kein Pellet gebildet hat, vorsichtig dekantiert, so dass nur noch das Pellet übrig bleibt. Um besserer Resultate zu erhalten wird der Überstand sofort nach der Zentrifugation abgekippt.

Danach werden die Präzipitate der einzelnen Proben im Gamma Counter gemessen.

4.2.4 Berechnung der Werte

Die Radioaktivität der einzelnen Proben wird zunächst in cpm gemessen und vom Gerät automatisch anhand der Standardkurve in pg/ml umgerechnet.

Die Werte in pg/ml errechnen sich auf folgende Weise:

Dabei wird zunächst die maximale Bindung (B_0) berechnet:

$B_0 = TB - NSB$, wobei bei TB und NSB die Mittelwerte der Doppelproben verwendet werden.

Um dann die jeweilige prozentuale Bindung für unbekannte Proben und Standards zu berechnen, bedient man sich folgender Formel:

Beispiel für Standard H:

$$B/B_0 (\%) = \left[\frac{((\text{gemittelte cpm von H}) - (\text{NSB}))}{B_0} \right] \times 100$$

Für alle Standards und unbekanntes Proben wird dann die prozentuale Bindung berechnet.

Die Standardkurve wird an der X-Achse mit dem Logarithmus der Standardpeptidkonzentrationen und an der Y-Achse mit der jeweiligen prozentualen Bindung gezeichnet. Anhand der errechneten prozentualen Bindung kann die unbekanntes Konzentration der untersuchten Proben abgelesen werden.

Der tatsächliche Wert der Probe in 1 ml errechnet sich durch Multiplikation mit 2,5. Der Grund hierfür besteht darin, dass die eingetrocknete Probe mit 250 µl RIA-Puffer gelöst wurde und danach die Konzentration in 100 µl gemessen wurde.

5 Validierung des Radioimmunoassays

5.1 Allgemeines

Die Validierung einer analytischen Methode wird durchgeführt, um

- die Quellen potentieller Fehler zu identifizieren
- die potentiellen Fehler einer Methode zu quantifizieren

Eine Validierung eines Assays beschreibt in mathematischen und quantifizierbaren Aussagen die charakteristischen Merkmale der Durchführung eines Assays.

„Validation of Analytical Procedures is the process of determining the suitability of a given methodology for providing useful analytical data. A method that is valid in one situation could well be invalid in another” (201).

Schon lange wurde versucht in der Entwicklung von Testkits, der Messung von Metaboliten mit Testsystemen, aber auch der Messung von biologischen Stoffen in einer Matrix Standardrichtlinien für die Validierung zu erstellen. So wurde 1987 von der amerikanischen

Food and Drug Administration eine erste Richtlinie zur Validierung erbracht. Shah et al. veröffentlichten 1990 einen Bericht über die Konferenz „Analytical Methods Validation“ in Washington. Hier wurden erstmals Empfehlungen für die Validierung gemacht (202). Auch in einer späteren Konferenz (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) wurden weitere Richtlinien publiziert, die allerdings eher auf pharmazeutische Produkte als auf Bioanalyse abzielten (201). Im amtlichen Arzneibuch der United States of America (USA) werden die für die USA geltenden Richtlinien zur Validierung veröffentlicht.

Bei der Validierung eines Radioimmunoassays sollte die Präzision, Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und Stabilität untersucht werden.

5.2 Präzision

Aufgrund unvermeidbarer, zufälliger Fehler bei jeder Testdurchführung ergeben sich bei Mehrfachbestimmungen der gleichen Probe mehr oder weniger große Abweichungen vom richtigen Wert. Die Präzision einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung zwischen einer Serie von Einzelbestimmungen derselben Probe unter bestimmten Konditionen und wird in 3 verschiedenen Ebenen betrachtet: Intraassay (Repeatability), Interassay (intermediate precision) und Reproduzierbarkeit (reproducibility) (203).

Die Präzision sollte mindestens 5 aufeinander folgende Messungen beinhalten. Die Präzision einer Konzentrationsstufe sollte 15% des Variationskoeffizienten nicht überschreiten (204).

5.2.1. Intraassay-Präzision

Die Repeatability oder die sog. Intraassay-Präzision drückt die Wiederholbarkeit eines Wertes unter denselben Bedingungen innerhalb einer Serie aus. Hierfür werden jeweils 6 Plasmaproben mit niedriger und hoher BNP-Konzentration verwendet.

5.2.2. Interassay-Präzision

Die Interassay-Präzision beschreibt die Messungen derselben Probe in verschiedenen Serien, hier wurde dieselbe Probe in 6 verschiedenen Testdurchläufen gemessen.

5.2.3. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit betrifft die Präzision innerhalb verschiedener Labors und muss nur getestet werden, wenn eine Methode in verschiedenen Einrichtungen bestimmt werden soll. Dies ist hier nicht nötig, da BNP immer in demselben Labor bestimmt wurde.

Als Maß der Präzision wird der Variationskoeffizient (VK) als Ausdruck der Streuung der Einzelwerte um deren Mittelwert herangezogen. Dieser drückt nach der Formel

$$\text{VK (\%)} = (s \cdot 100) / x$$

die Standardabweichung (s) bezogen auf den Mittelwert (x) aus.

5.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit einer analytischen Methode gibt an, inwieweit der Istwert, d.h. der in diesem Test ermittelte Messwert, mit dem Sollwert, d.h. mit dem wirklichen Peptidgehalt der Probe, übereinstimmt. Beim Radioimmunoassay wird die Richtigkeit sowohl von systematischen Fehlern als auch von unvermeidbaren zufälligen Fehlern während der Testdurchführung beeinflusst. Insbesondere kann durch die Nichtlinearität der Standardkurve bei gleicher Präzision die Bestimmung der Richtigkeit der Messwerte in den verschiedenen Kurvenabschnitten unterschiedlich stark beeinflusst werden.

Zur Überprüfung der Richtigkeit wird häufig die Wiederfindungsrate einer Substanz bestimmt. Hierbei werden bekannte Mengen des Hormons (Standardseren des Herstellers) zu 1 ml Hundeplasma vor der Extraktion zugesetzt. Der Extraktionsverlust errechnet sich nach Abziehen des endogen vorhandenen BNP in Prozent des zugesetzten synthetischen Peptids

(205). BNP wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen (128 pg, 64 pg, 32 pg) zu einer Probe mit hohem BNP Wert und einer Probe mit niedrigem BNP Wert zugesetzt.

5.4 Sensitivität

Eine Methode wird als sensitiv erachtet, wenn kleine Konzentrationsänderungen große Veränderungen in der analytischen Antwort bewirken. In diesem Zusammenhang entstand der Begriff des "Limit of Quantification" (LOQ), der definiert ist als die niedrigste Konzentration, ab der eine Quantifizierung mit einer ausreichenden Richtigkeit und Präzision möglich ist. In der Praxis der Validierung definiert LOQ die Konzentration des niedrigsten Standards (206).

5.5 Spezifität

Die Spezifität gibt die Fähigkeit einer analytischen Methode an, eine bestimmte Substanz unabhängig von Interferenzen durch andere Stoffe zu messen. Da die Spezifität eines Tests ein sehr wichtiges und aufwendiges Kriterium der Validierung ist, werden vom Hersteller bereits Informationen über Kreuzreaktionen mitgeliefert.

Als weiteres Maß für die Spezifität gilt die Linearität von Verdünnungen. Dies ist die Fähigkeit einer Methode eine proportionale Antwort auf Verdünnungen des zu untersuchenden Peptids zu geben. Hierbei wurde eine Blutprobe in 3 Verdünnungsstufen gemessen und der Gehalt durch Vergleich mit der Standardkurve ermittelt.

5.6 Stabilität

Um die Langzeit-Stabilität von BNP zu untersuchen, wurde eine Blutprobe portioniert und bei -70°C eingefroren. Je 1ml der Probe wurde im Abstand von 4, 8, 11, 13 und 17 Monaten aufgetaut und gemessen, um eine eventuelle Degradation des Peptids festzustellen.

5.7 Plausibilität

Zur Evaluierung der Plausibilität wurde die Annahme untersucht, dass bei herzgesunden Hunden niedrige BNP-Werte vorliegen, die BNP-Konzentration bei Hunden mit bestimmten Herzerkrankungen dagegen höher sind.

Hierfür wurde der BNP-Mittelwert der herzgesunden Population mit BNP-Werten von 3 herzkranken Hunden verglichen, die unterschiedliche Herzerkrankungen vorweisen.

6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des PC-Programmes SPSS ® (Statistical Package for the Social Science) für WINDOWS und SAS ® (Statistical Analysis System). Einige Tabellen und Graphiken sind aufgrund des englischen Programms nicht übersetzt worden.

III Ergebnisse

1 Validierung des Radioimmunoassays

1.1 Prüfung der Präzision

1.1.1 Intraassay-Präzision

Bei der Prüfung der Intraassay-Präzision wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Serie ermittelt. Dabei werden je 6 wiederholte Messungen des Plasmas von 3 Hunden innerhalb eines Experimentes geprüft. Zu diesem Zweck wurde das Plasma von einem gesunden Hund mit niedrigen BNP-Werten (Hund 1), eines kranken Hundes mit niedrigen BNP-Werten (Hund 2) und eines kranken Hundes mit hohen BNP-Werten (Hund 3) verwendet.

Intraassay-Präzision	Hund 1	Hund 2	Hund 3
BNP-Mittelwert in pg/ml	13,38	14,83	167,62
Standardabweichung	1,51	1,33	19,26
Variationskoeffizient in %	11,26	8,96	11,49

Tabelle 6: Intraassay-Präzision bei 3 Hunden: Hund 1 (gesund) mit niedriger BNP-Plasmakonzentration, Hund 2 (Dirofilariose) mit niedriger BNP-Plasmakonzentration und Hund 3 (dilatative Kardiomyopathie) mit hoher BNP-Plasmakonzentration

Bei den 3 Hunden ergibt sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 10,57%. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der einzelnen Plasmaproben gehen aus Tabelle 6 hervor.

1.1.2 Interassay-Präzision

Hier wird die Wiederholungsgenauigkeit eines Ergebnisses an 6 verschiedenen Tagen anhand von 6 wiederholten Messungen desselben Hundeplasmas in 6 verschiedenen Radioimmunoassays gemessen. Hierzu wurde das Plasma eines gesunden Hundes mit niedrigen BNP Werten verwendet.

n	BNP-Mittelwert in pg/ml	Standardabweichung	Variationskoeffizient in %
6	33,07	4,18	12,64

Tabelle 7: Interassay-Präzision bei einem Hund (gesund) in 6 verschiedenen Radioimmunoassays

1.2 Prüfung der Richtigkeit

Zur Prüfung der Richtigkeit wurde das Plasma von 2 Hunden mit bekannten Mengen an synthetischem BNP in Form von definierten Standardkonzentrationen versetzt. Man bestimmt die Ausgangskonzentration der Blutprobe und die Konzentration nach Aufstockung mit einer geeigneten Standardlösung. Die Wiederfindungsrate wird durch Subtraktion der Ausgangskonzentration der Blutprobe von der Konzentration der aufgestockten Probe berechnet. Die prozentuale Wiederfindung für jede Konzentration wird berechnet (207).

Bei Aufstockung des Plasmas von Hund 1 mit 32, 64, 128 pg ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindung von 80,8% (Tabelle 8) mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,998$. Die durchschnittliche Wiederfindung bei Hund 2 lag bei 90,9% (Tabelle 9) mit einem $r = 0,876$.

Hund 1	Ausgangswert in pg/ml	Aufstockung in pg	Istwert in pg/ml	Sollwert in pg/ml	Wieder- findung in %
	10,58	32	34,90	42,58	76,02
		64	60,27	74,58	77,65
		128	128,0	138,58	91,74
Mittelwert					80,8

Tabelle 8: Wiederfindungsrate bei Hund 1

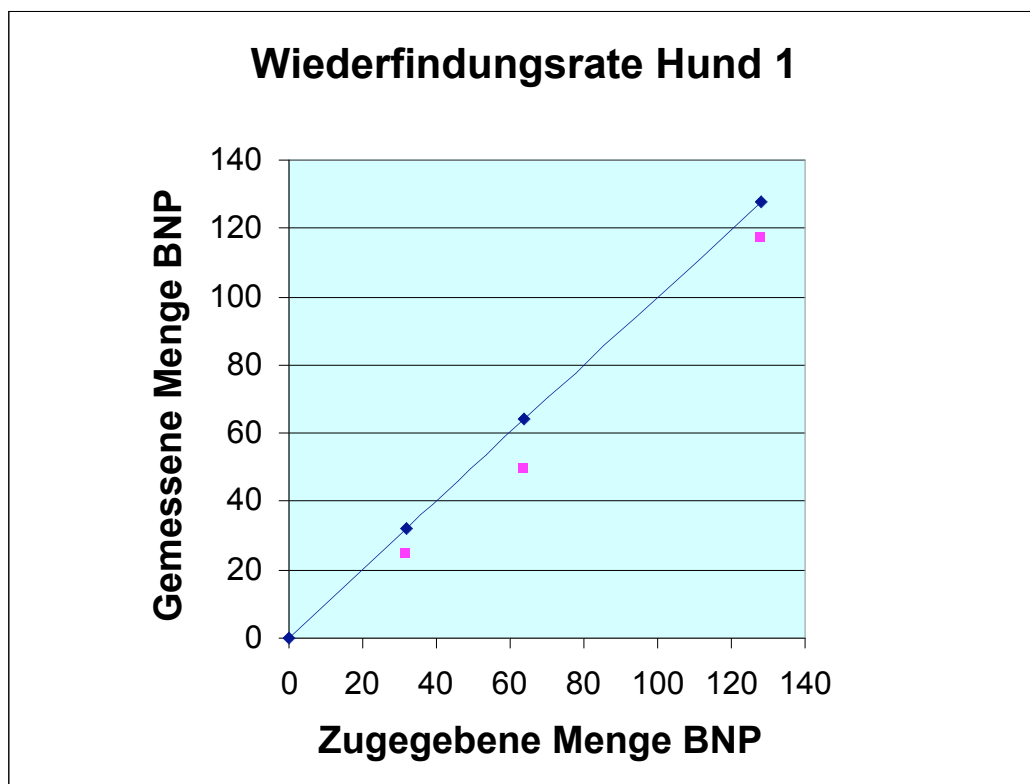


Abbildung 8: Wiederfindungsrate von BNP im Plasma von Hund 1, die blaue Linie markiert eine theoretische Wiederfindungsrate von 100%, in rosa die tatsächliche Wiederfindung

Hund 2	Ausgangswert in pg/ml	Aufstockung	Istwert in pg/ml	Sollwert in pg/ml	Wieder- findung in %
	83,68	32	111,91	115,68	88,22
		64	158,08	147,68	116,25
		128	171,01	211,68	68,22
Mittelwert					90,90

Tabelle 9: Wiederfindungsrate bei Hund 2

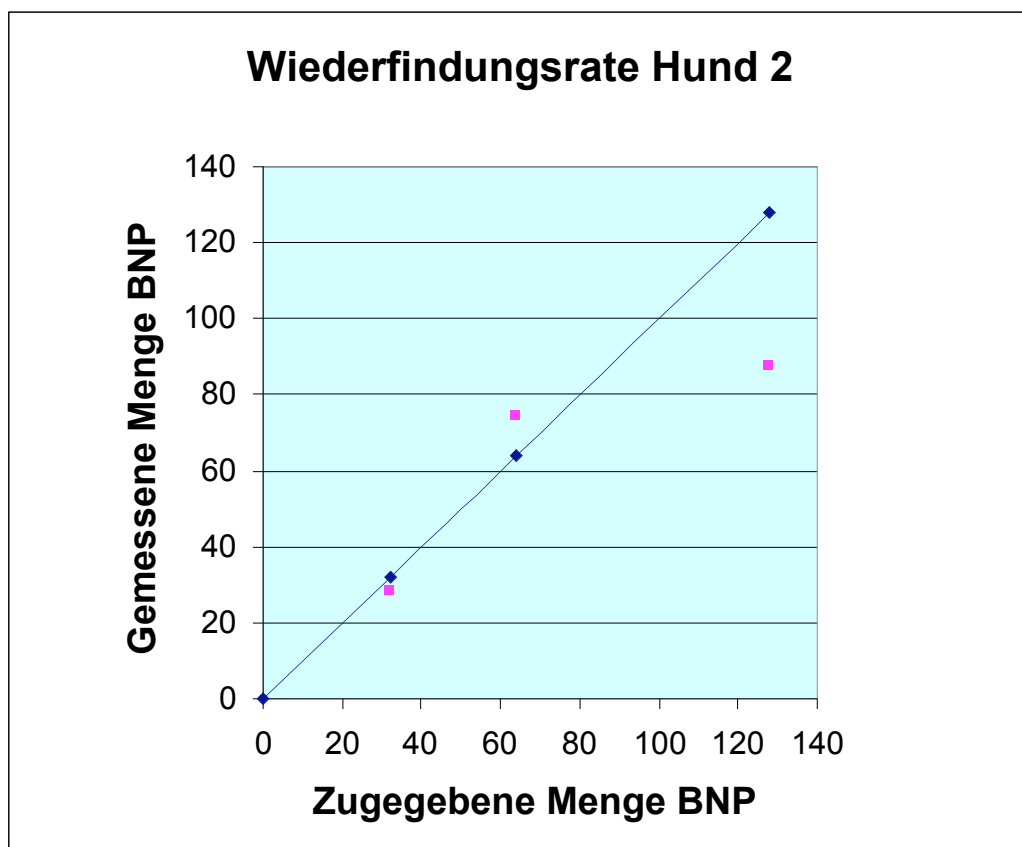


Abbildung 9: Wiederfindungsrate von BNP im Plasma von Hund 2, die blaue Linie markiert eine theoretische Wiederfindungsrate von 100%, in rosa die tatsächliche Wiederfindung

1.3 Prüfung der Sensitivität

Die Sensitivität gibt die kleinste quantifizierbare Konzentration von BNP im RIA an. Der kleinste bestimmbare Standard beträgt 1 pg/Röhrchen, dies repräsentiert die kleinste quantifizierbare Konzentration von BNP. Die 20 %ige inhibitorische Konzentration beträgt laut Hersteller 55,75 pg/Röhrchen, die 80 %ige inhibitorische Konzentration liegt bei 1,88 pg/Röhrchen.

1.4 Prüfung der Spezifität

1.4.1 Kreuzreaktion

Laut Hersteller besteht eine 100 %ige Kreuzreaktion mit porzinem BNP-32 und BNP-26. Dagegen konnte vom Hersteller keinerlei Kreuzreaktion zu humanem BNP-32 sowie zu BNP-32 und BNP-45 der Ratte ermittelt werden. Auch strukturell verwandte Peptide wie z.B. humanes und kanines alpha-ANP, humanes und porzines CNP und Endothelin-1 (Human, Rinder, Hund, Maus, Schwein und Ratte) zeigten keinerlei Kreuzreaktivität.

1.4.2 Verdünnungsreihe

Für die Verdünnungsreihe wurde ein portioniertes Plasma eines kranken Hundes in 3 verschiedenen Verdünnungsstufen (Tabelle 10) gemessen. Die Verdünnungsstufen wurden graphisch dargestellt und mit der Standardkurve verglichen (Abbildung 10).

Verdünnung	Probe	RIA-Puffer
1/1	1 ml	
1/2	500 μ l	500 μ l
1/4	250 μ l	750 μ l
1/8	125 μ l	875 μ l

Tabelle 10: Darstellung der Verdünnungsreihe

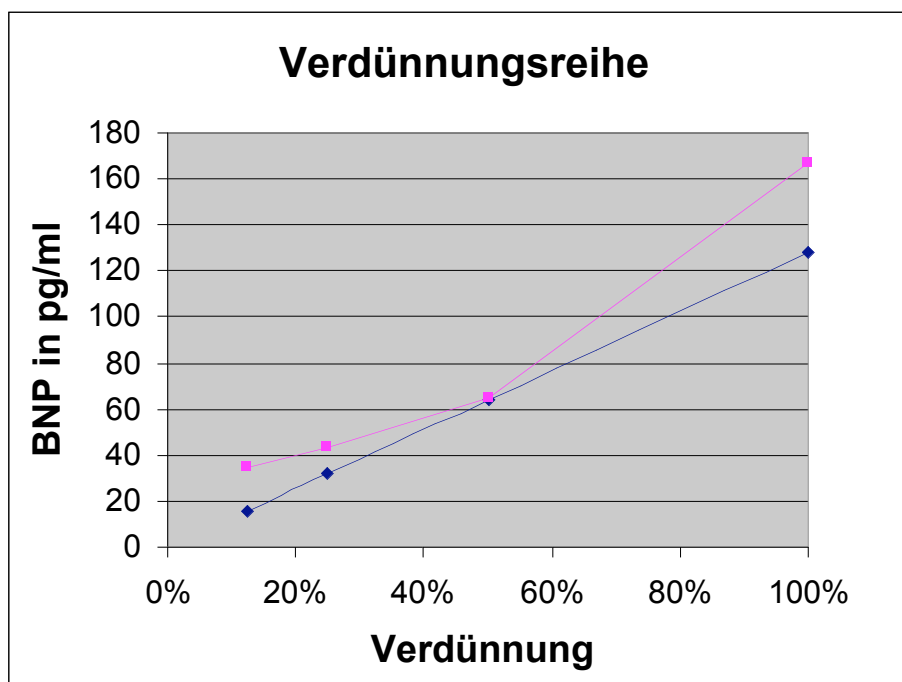


Abbildung 10: Darstellung der Linearität bei Verdünnung einer Plasmaprobe (in rosa) im Vergleich zur Verdünnung des Standards (in blau)

1.5 Prüfung der Stabilität

Es zeigte sich kein Abfall der BNP-Konzentration derselben Blutprobe bei Lagerung bei -70°C nach 4, 8, 11, 13 und 17 Monaten. Abbildung 11 zeigt die absolute BNP-Konzentration zu 6 verschiedenen Zeitpunkten.

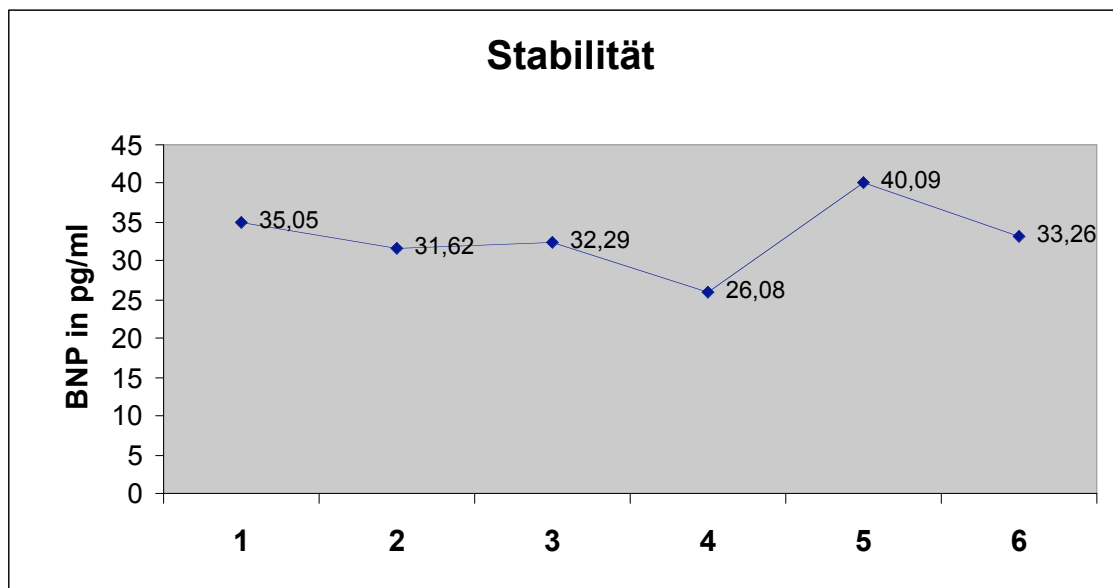


Abbildung 11: BNP-Konzentration derselben Blutprobe zu 6 verschiedenen Zeitpunkten (1: Zeitpunkt 0, 2: 4 Monate, 3: 8 Monate, 4: 11 Monate, 5: 13 Monate, 6: 17 Monate)

1.6 Prüfung der Plausibilität

Im Vergleich zum bei 79 herzgesunden Hunden ermittelten BNP-Mittelwert von 23,83 pg/ml zeigten sich bei 3 herzkranken Hunden höhere Plasmakonzentrationen von BNP. Abbildung 12 stellt die einzelnen BNP-Plasmakonzentrationen dar.

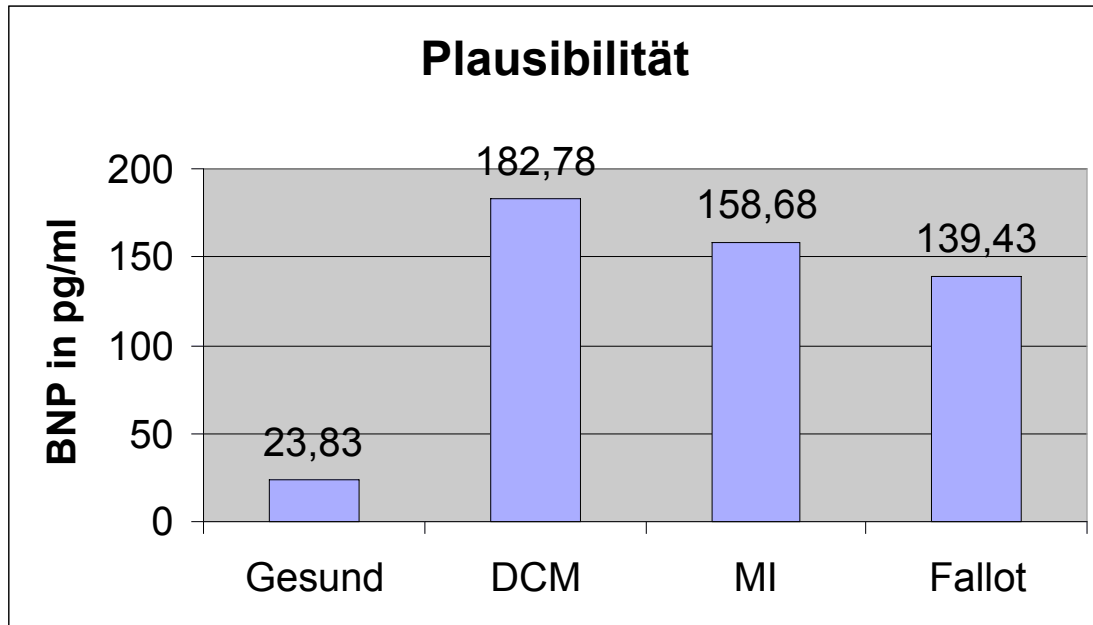


Abbildung 12: BNP-Mittelwert einer gesunden Population, BNP-Konzentration eines Hundes mit hochgradiger dilatativer Kardiomyopathie, eines Hundes mit hochgradiger Mitralklappeninsuffizienz und eines Hundes mit Fallot-Tetralogie

DCM: dilatative Kardiomyopathie, **MI:** Mitralklappeninsuffizienz, **Fallot:** Fallot-Tetralogie

2 Analyse der Messwerte

2.1 Deskriptive Statistik

Bei 79 Hunden lag der niedrigste gemessene BNP-Wert bei 3,39 pg/ml, der höchste gemessene BNP-Wert bei 79,31 pg/ml bei einem Mittelwert von 23,83 pg/ml (Tabelle 11).

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Variance
ALTER	79	,25	15,00	4,7968	3,50489	12,284
BNP	79	3,39	79,31	23,8333	14,90492	222,156

Tabelle 11: Darstellung des Alters und der BNP-Konzentration, sowie des jeweiligen Minimums, Maximums, Mittelwertes, Standardabweichung und Varianz

Mean: Mittelwert, **N:** absolute Patientenzahl, **Std. Deviation:** Standardabweichung, **Variance:** Varianz

2.1.1 Alter

Bei 79 Probanden im Alter von 3 Monaten bis 15 Jahren wurden die Mittelwerte, die Standardabweichung und die Varianz für das jeweilige Alter ermittelt (Tabelle 12). Für die metrische Variable Alter verdeutlicht ein Streudiagramm (Abbildung 13) den Zusammenhang zwischen BNP-Konzentration und Alter. Auf der x-Achse wird das Alter in Jahren aufgezeigt, auf der y-Achse wird der BNP-Wert in pg/ml dargestellt.

Mittelwert-Vergleich Alter

WERT

ALTER	BNP-Mittelwert	N	Std. Abweichung	Varianz
,25	21,2950	1	.	.
,50	23,8500	1	.	.
,70	14,8850	2	10,54296	111,154
,80	28,4600	1	.	.
1,00	25,6724	14	14,54706	211,617
2,00	22,5905	6	12,99789	168,945
3,00	21,5536	7	10,58845	112,115
4,00	24,8524	13	11,89564	141,506
5,00	26,7017	6	24,09469	580,554
6,00	24,6000	3	18,75486	351,745
7,00	24,3006	8	22,49155	505,870
8,00	27,8375	4	17,63155	310,871
9,00	18,9250	2	21,60211	466,651
10,00	13,9383	4	3,52643	12,436
11,00	25,5916	4	20,03178	401,272
12,00	34,4225	2	7,44230	55,388
15,00	5,9600	1	.	.
Gesamt	23,8333	79	14,90492	222,156

Tabelle 12: Darstellung der Mittelwerte, der Standardabweichung und der Varianz der BNP-Werte nach Altersgruppen

N: absolute Patientenzahl, **Std. Abweichung:** Standardabweichung

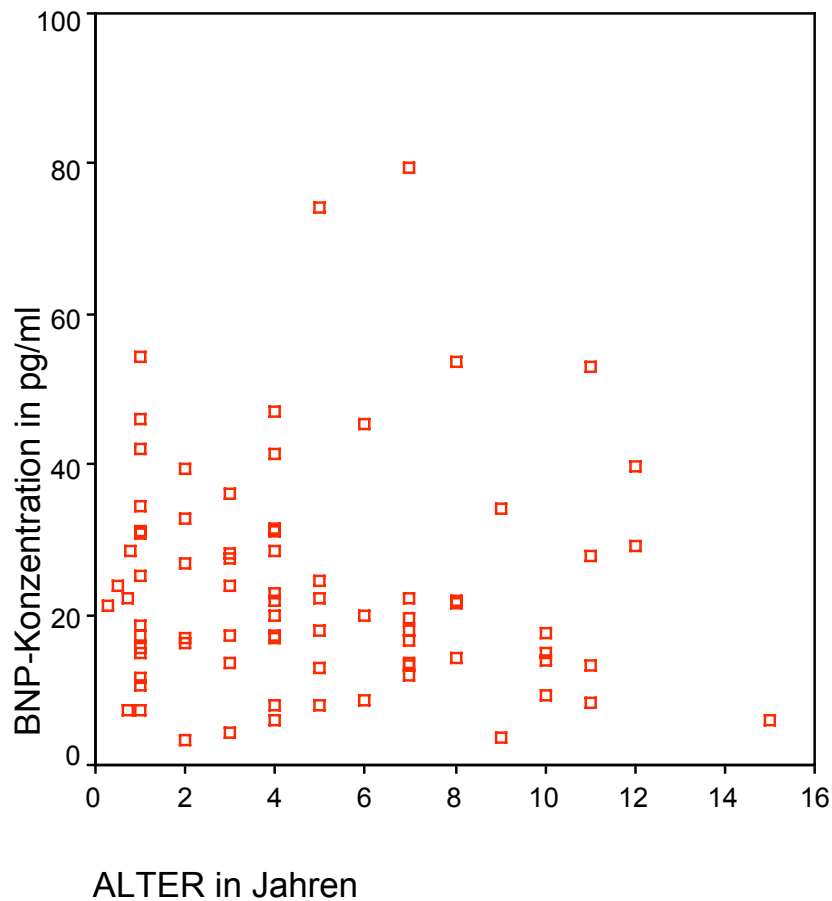


Abbildung 13: Streudiagramm mit Darstellung der BNP-Werte in pg/ml (y-Achse) gegen das jeweilige Alter in Jahren (x-Achse)

Anhand des Streudiagramms ist keine Korrelation zwischen Alter und BNP-Konzentration abzulesen.

2.1.2 Größe

Die Hunde wurden je nach Gewicht eingeteilt in die Gruppen K (0-10 kg), M (10-25 kg) und G (>25 kg). Für die Gruppe K ergab sich ein BNP-Mittelwert von 18,01 pg/ml, für die Gruppe M von 26,27 pg/ml und für die Gruppe G von 24,24 pg/ml (Tabelle 13).

In Abbildung 14 wird der Zusammenhang zwischen BNP-Wert und Größe graphisch mit Hilfe eines Boxplots aufgezeigt. Auf der x-Achse sind die drei Gruppen K, M und G mit der jeweiligen Anzahl der Probanden aufgezeigt, auf der y-Achse befindet sich der jeweilige BNP-Wert in pg/ml. Die Graphik zeigt für jede kategorielle Größe das 50 %-Perzentil (Medianwert), das 25 %-Perzentil und das 75 %-Perzentil. In der Gruppe G sind 2 Ausreißer (Outlier, o) zu sehen, die in ihren Werten mit einer über 1,5-fachen Boxlänge außerhalb der Box liegen.

Mittelwert-Vergleich für die Größe

WERT

GRÖSSE	BNP-Mittelwert	N	Std. Abweichung	Varianz
Klein	18,0145	11	8,71684	75,983
Mittel	26,2702	18	16,56339	274,346
Groß	24,2361	50	15,26437	233,001
Gesamt	23,8333	79	14,90492	222,156

Tabelle 13: Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichung und Varianz der BNP-Werte für die verschiedenen Größen

N: absolute Patientenzahl, **Std. Abweichung:** Standardabweichung

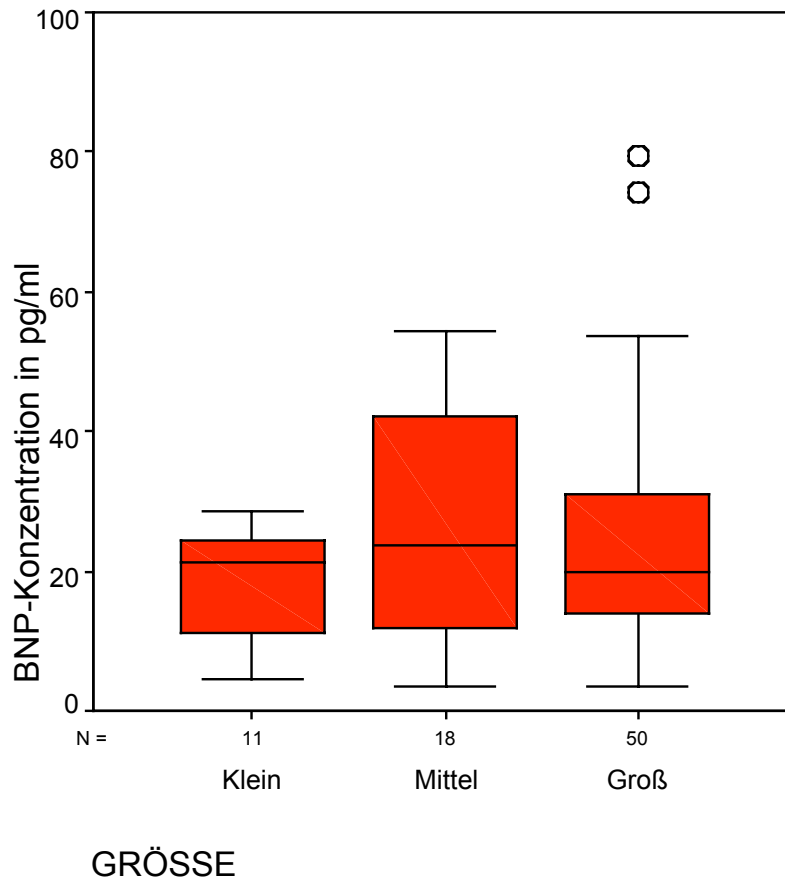


Abbildung 14: Boxplot-Darstellung der BNP-Werte in pg/ml (y-Achse) für die Gruppen Klein, Mittel und Groß (x-Achse) mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentilen

In der Gruppe “Groß“ befinden sich 2 Ausreißer (Outlier, o).

Anhand der Boxplot-Darstellung kann keine Korrelation zwischen der Größe und der BNP-Konzentration gesehen werden.

2.1.3 Geschlecht

Bei männlichen Tieren lag der Mittelwert von BNP bei 26,12 pg/ml, bei weiblichen Tieren bei 21,37 pg/ml (Tabelle 14).

In Abbildung 15 wird der Zusammenhang zwischen BNP-Wert und Geschlecht graphisch mit Hilfe eines Boxplots aufgezeigt. Auf der x-Achse sind männliche und weibliche Tiere mit der jeweiligen Anzahl der Probanden aufgezeigt, auf der y-Achse befindet sich der jeweilige BNP-Wert in pg/ml. Die Graphik zeigt für jede kategorielle Größe das 50 %-Perzentil (Medianwert), das 25 %-Perzentil und das 75 %-Perzentil. Bei den männlichen Tieren liegen 2 Probanden als Ausreißer (Outlier, o) außerhalb der 1,5-fachen Boxlänge, bei den weiblichen Tieren liegt ein Proband als Ausreißer außerhalb.

Mittelwert-Vergleich Geschlecht

WERT				
Geschlecht	BNP-Mittelwert	N	Std. Abweichung	Varianz
männlich	26,1157	41	17,34391	300,811
weiblich	21,3707	38	11,45110	131,128
Gesamt	23,8333	79	14,90492	222,156

Tabelle 14: Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichung und Varianz der BNP-Werte für männliche und weibliche Tiere

Std. Abweichung: Standardabweichung, **N:** absolute Patientenzahl

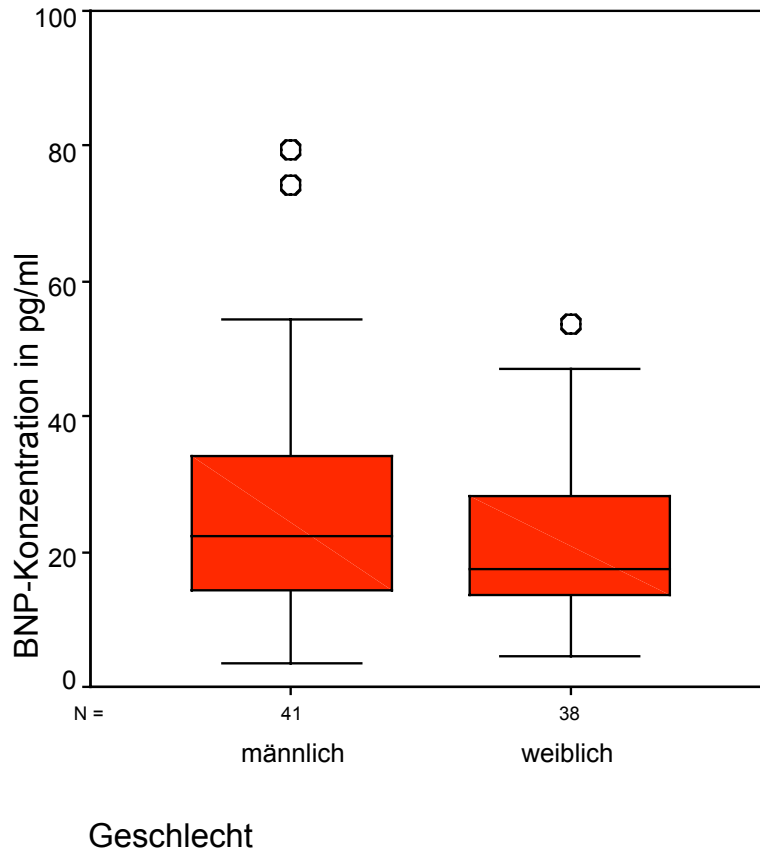


Abbildung 15: Boxplot-Darstellung der BNP-Werte in pg/ml (y-Achse) für die Gruppen männlich und weiblich (x-Achse) mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentilen

Bei den männlichen Tieren sind 2 Ausreißer (Outlier, o), bei den weiblichen Tieren ein Ausreißer zu sehen.

Anhand der Boxplot-Darstellung kann zwischen Geschlecht und BNP-Konzentration keine Korrelation gesehen werden.

2.1.4 Kastration/Ovariohysterektomie

Bei kastrierten/ovariohysterektomierten Tieren lag der Mittelwert bei 25,89 pg/ml, bei intakten Tieren bei 22,28 pg/ml (Tabelle 15).

In Abbildung 16 wird der Zusammenhang zwischen BNP-Wert und Kastration graphisch mit Hilfe eines Boxplots aufgezeigt. Auf der x-Achse sind kastrierte und nicht-kastrierte Tiere mit der jeweiligen Anzahl der Probanden aufgezeigt, auf der y-Achse befindet sich der jeweilige BNP-Wert in pg/ml. Die Graphik zeigt für jede kategorielle Größe das 50 %-Perzentil (Medianwert), das 25 %-Perzentil und das 75 %-Perzentil. Bei den nicht kastrierten Tieren liegen 2 Probanden als Ausreißer (Outlier, o) außerhalb der 1,5-fachen Boxlänge und 1 Proband als Extremwert (Extreme, *) außerhalb der 3-fachen Boxlänge. Bei den kastrierten Tieren liegt ein Proband als Ausreißer außerhalb.

Mittelwert-Vergleich Kastration/Ovariohysterektomie

WERT

Kastr/Ovariohyst	BNP-Mittelwert	N	Std. Abweichung	Varianz
nein	22,2789	45	13,62528	185,648
ja	25,8905	34	16,42897	269,911
Gesamt	23,8333	79	14,90492	222,156

Tabelle 15: Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichung und Varianz der BNP-Werte für kastrierte und nicht-kastrierte Tiere

Kastr/Ovariohys: Kastration/Ovariohysterektomie, **N:** absolute Patientenzahl, **Std. Abweichung:** Standardabweichung

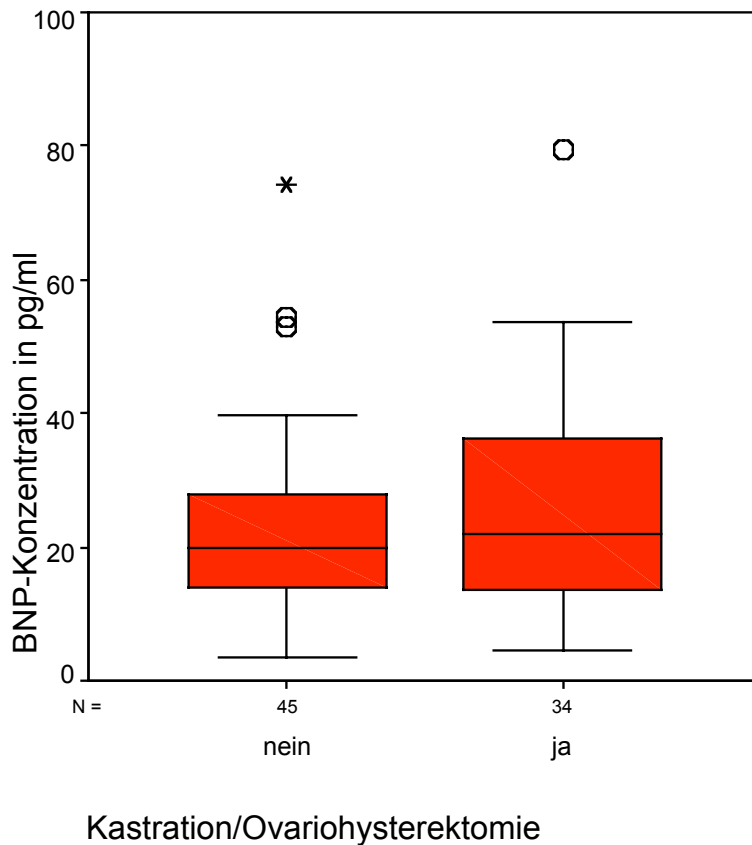


Abbildung 16: Boxplot-Darstellung der BNP-Werte in pg/ml (y-Achse) für die Gruppen kastriert/ovariohysterektomiert und intakt mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentilen. Bei den intakten Tieren sind 2 Ausreißer (Outlier, o) und ein Extremwert (Extreme, *) zu sehen, bei den kastrierten/ovariohysterektomierten Tieren ein Ausreißer.

Anhand der Boxplot-Darstellung kann zwischen Kastration/Ovariohysterektomie und BNP-Wert keine Korrelation gesehen werden.

2.1.5 Rasse

Die BNP-Mittelwerte, die Standardabweichung und Varianz der verschiedenen Rassen wurden getrennt für Boxer, Deutscher Schäferhund, Golden Retriever, Husky, Howawart, Mischlingshund, Rottweiler, Sheltie und alle anderen Rassen berechnet. Für jede Rasse wurden außerdem das 95 %-Konfidenzintervall für den Mittelwert mit unterer und oberer

Grenze, der Medianwert, der niedrigste gemessene Wert (Minimum), der höchste gemessene Wert (Maximum) und die Spannweite ausgewertet (Tabelle 16).

In Abbildung 17 wird der Zusammenhang zwischen BNP-Wert und Hunderasse graphisch mit Hilfe eines Boxplots aufgezeigt. Auf der x-Achse ist die jeweilige Hunderasse mit der Anzahl der Probanden aufgezeigt, auf der y-Achse befindet sich der jeweilige BNP-Wert in pg/ml. Die Graphik zeigt für jede kategorielle Größe das 50 %-Perzentil (Medianwert), das 25 %-Perzentil und das 75 %-Perzentil. Bei Deutschen Schäferhunden und der Gruppe "alle anderen Rassen" liegt ein Proband als Ausreißer (Outlier, o) außerhalb der 1,5-fachen Boxlänge überhalb des 75 %-Perzentils. In der Gruppe der Golden Retriever liegt ein Proband als Ausreißer unterhalb des 25 %-Perzentils.

Descriptives

RASSE				Statistic	Std. Error
BNP-Wert	Sheltie	BNP-Mean		17,8867	5,83495
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-7,2191	
			Upper Bound	42,9924	
		Median		17,6900	
		Variance		102,140	
		Std. Deviation		10,10644	
		Minimum		7,88	
		Maximum		28,09	
		Range		20,21	

Tabelle 16: BNP-Mittelwert, 95 %-Konfidenzintervall mit unterer und oberer Grenze, Medianwert, Varianz, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Spannweite für Shelties, alle anderen Rassen, Boxer, Deutsche Schäferhunde, Golden Retriever, Huskies, Howawarte, Mischlingshunde und Rottweiler

BNP-Mean: BNP-Mittelwert, **95 % Confidence Intervall for Mean:** 95 %-Konfidenzintervall, **Variance:** Varianz, **Std. Deviation:** Standardabweichung, **Range:** Spannweite

Descriptives

RASSE				Statistic	Std. Error
BNP-Wert	Alle anderen Rassen	BNP-Mean		21,9313	2,41643
		95% Confidence Intervall for Mean	Lower Bound	16,9199	
			Upper Bound	26,9427	
		Median		21,8600	
		Variance		134,300	
		Std. Deviation		11,58879	
		Minimum		4,43	
		Maximum		54,47	
		Range		50,03	
		Boxer		BNP-Mean	
95% Confidence Intervall for Mean	Lower Bound			-21,2031	
	Upper Bound			109,3797	
Median				31,2850	
Variance				690,813	
Std. Deviation				26,28332	
Minimum				26,66	
Maximum				74,32	
Range				47,66	
Deutscher Schäferhund				BNP-Mean	
		95% Confidence Intervall for Mean	Lower Bound	8,6266	
			Upper Bound	19,0760	
		Median		12,9600	
		Variance		46,200	
		Std. Deviation		6,79705	
		Minimum		7,43	
		Maximum		29,16	
		Range		21,73	
		Golden Retriever		BNP-Mean	
95% Confidence Intervall for Mean	Lower Bound			13,3736	
	Upper Bound			27,1350	
Median				19,6300	
Variance				55,352	
Std. Deviation				7,43987	
Minimum				8,10	
Maximum				30,85	
Range				22,75	

Fortsetzung Tabelle 16

Descriptives

RASSE				Statistic	Std. Error
BNP-Wert	Husky	BNP-Mean		21,1350	3,78742
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9,0817	
			Upper Bound	33,1883	
		Median		20,1250	
		Variance		57,378	
		Std. Deviation		7,57485	
		Minimum		13,25	
		Maximum		31,04	
		Range		17,79	
			Howawart	BNP-Mean	
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			-17,3117	
	Upper Bound			51,7339	
Median				17,0600	
Variance				193,134	
Std. Deviation				13,89728	
Minimum				3,39	
Maximum				31,18	
Range				27,79	
	Mix			BNP-Mean	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	23,1563	
			Upper Bound	39,0870	
		Median		31,3600	
		Variance		339,294	
		Std. Deviation		18,41993	
		Minimum		3,65	
		Maximum		79,31	
		Range		75,66	
			Rottweiler	BNP-Mean	
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			6,8562	
	Upper Bound			30,1788	
Median				17,5350	
Variance				53,707	
Std. Deviation				7,32854	
Minimum				11,50	
Maximum				27,50	
Range				16,00	

Fortsetzung Tabelle 16

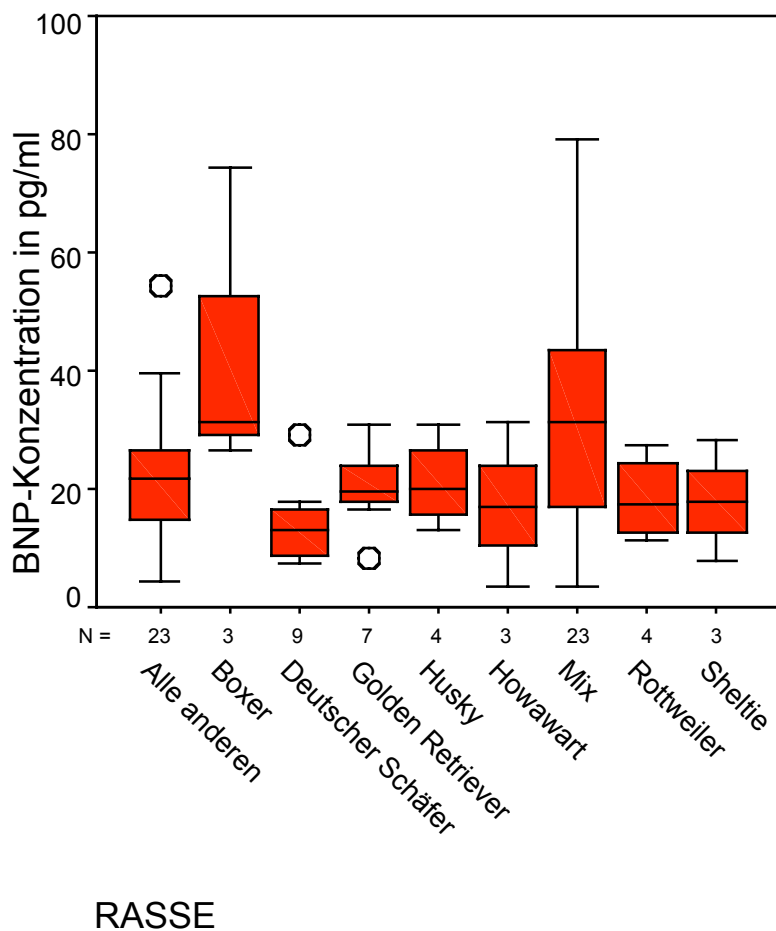


Abbildung 17: Boxplot-Darstellung der BNP-Werte in pg/ml (y-Achse) für die einzelnen Hunderassen mit 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentilen

In der Gruppe “alle anderen Rassen“ und bei den Deutschen Schäferhunden ist je ein Ausreißer (Outlier, o) überhalb des 75 %-Perzentils und bei den Golden Retrievern ein Ausreißer unterhalb des 25 %-Perzentils

Deutscher Schäfer: Deutscher Schäferhund

Anhand der Boxplot-Darstellung kann eine Korrelation zwischen Rasse und BNP-Konzentration ersehen werden.

Erstellung des Regressionsmodells mit Parameterschätzung

2.2.1 Varianzanalyse (ANOVA)

Zunächst wurde die Nullhypothese definiert. Die unabhängigen Variablen Alter, Größe, Geschlecht, Kastration und Rasse wurden auf einen Zusammenhang mit der abhängigen Variablen, dem BNP-Wert, getestet. Nur die Variable Alter wurde, da sie eine metrische Größe ist, mit einer Regressionsanalyse auf einen Zusammenhang mit der BNP-Konzentration getestet. Die Nullhypothese gibt hier an, dass kein Zusammenhang zwischen BNP-Werten und den einzelnen Variablen besteht. Der p-Wert für die einzelnen Variablen wurde errechnet (Tabelle 17-21). Als Grenzwert für das Signifikanzniveau wurde 5% (0,05) festgelegt. Ein Wert unter 0,05 bedeutet demzufolge, dass die Nullhypothese abgelehnt wird.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: WERT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26,740 ^a	1	26,740	,119	,731
Intercept	16548,276	1	16548,276	73,648	,000
ALTER	26,740	1	26,740	,119	,731
Error	17301,466	77	224,694		
Total	62202,139	79			
Corrected Total	17328,207	78			

^a. R Squared = ,002 (Adjusted R Squared = -,011)

Tabelle 17: Regressionsanalyse für die Variablen Alter und BNP-Wert

Sum of Squares: Quadratsumme, **df:** Freiheitsgrad, **Mean Square:** mittlere Quadratsumme, **F:** F-Test, **Sig.:** Signifikanz

Die Variable Alter ist auf dem Signifikanzniveau von 5% mit einem Wert von 0,731 nicht signifikant.

ANOVA Table

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WERT * GRÖÙE	Between Groups	(Combined)	487,440	2	243,720	1,100	,338
	Within Groups		16840,767	76	221,589		
	Total		17328,207	78			

Table 18: Varianzanalyse für die Variablen Größe und BNP-Wert

Sum of Squares: Quadratsumme, **df:** Freiheitsgrad, **Mean Square:** mittlere Quadratsumme, **F:** F-Test, **Sig.:** Signifikanz

Die Variable Größe ist auf dem Signifikanzniveau von 5% mit einem Wert von 0,338 nicht signifikant.

ANOVA Table

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WERT * SEX	Between Groups	(Combined)	444,031	1	444,031	2,025	,159
	Within Groups		16884,176	77	219,275		
	Total		17328,207	78			

Table 19: Varianzanalyse für die Variablen Geschlecht und BNP-Wert

Sum of Squares: Quadratsumme, **df:** Freiheitsgrad, **Mean Square:** mittlere Quadratsumme, **F:** F-Test, **Sig.:** Signifikanz

Die Variable Geschlecht ist auf dem Signifikanzniveau von 5% mit einem Wert von 0,159 nicht signifikant.

ANOVA Table

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WERT * KASTR	Between Groups	(Combined)	252,617	1	252,617	1,139	,289
	Within Groups		17075,590	77	221,761		
	Total		17328,207	78			

Table 20: Varianzanalyse für die Variablen Kastration und BNP-Wert

Sum of Squares: Quadratsumme, **df:** Freiheitsgrad, **Mean Square:** mittlere Quadratsumme, **F:** F-Test, **Sig.:** Signifikanz

Die Variable Kastration ist auf dem Signifikanzniveau von 5% mit einem Wert von 0,289 nicht signifikant.

ANOVA Table

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
WERT * RASSCODN	Between Groups (Combined)	3901,999	8	487,750	2,543	,017
	Within Groups	13426,208	70	191,803		
	Total	17328,207	78			

Tabelle 21: Varianzanalyse für die Variablen Rasse und BNP-Wert

Sum of Squares: Quadratsumme, **df:** Freiheitsgrad, **Mean Square:** mittlere Quadratsumme, **F:** F-Test, **Sig.:** Signifikanz

Nur die Variable Rasse war auf dem Signifikanzniveau von 5% signifikant. Die Rasse korreliert signifikant mit der BNP-Konzentration.

2.2.2 Regressionsmodell mit der Variablen Rasse mit Parameterschätzungen

Bei Parameterschätzungen kann bei einem einzelnen Hund anhand seiner Rassezugehörigkeit die unabhängige Variable (BNP-Wert) abgeschätzt werden. Hierzu wurde eine Tabelle zur Parameterschätzung erstellt.

Parameter Estimates

Dependent Variable: WERT

Parameter	B	Std. Fehler	t	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					untere Grenze	obere Grenze
Intercept	17,887	7,996	2,237	,028	1,939	33,834
Alle anderen Rassen	4,045	8,501	,476	,636	-12,911	21,000
Boxer	26,202	11,308	2,317	,023	3,649	48,755
Deutscher Schäferhund	-4,035	9,233	-,437	,663	-22,450	14,379
Golden Retriever	2,368	9,557	,248	,805	-16,693	21,428
Husky	3,248	10,578	,307	,760	-17,848	24,345
Howawart	-,676	11,308	-,060	,953	-23,228	21,877
Mix	13,235	8,501	1,557	,124	-3,720	30,190
Rottweiler	,631	10,578	,060	,953	-20,465	21,727
Sheltie	0 ^a

^a. This parameter is set to zero because it is redundant.

Tabelle 22: Parameterschätzung anhand der jeweiligen Hunderasse

Std. Fehler: Standardfehler, **Sig.:** Signifikanz

2.2.3 Überprüfung der Normalverteilungsannahme der Messwerte

Die Werte wurden untergliedert in die verschiedenen Rassen auf Normalverteilung geprüft. Zur Auswertung kamen hierbei die Gruppen, die mehr als 7 Mitglieder hatten („andere Rassen“, „Deutscher Schäferhund“, „Golden Retriever“, „Mix“).

Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Dieser Test prüft die Normalverteilung in einer Grundgesamtheit. Die vorliegenden Daten sind normalverteilt. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 (5%) festgelegt, die statistisch errechneten p-Werte liegen über diesem Wert, demzufolge kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden (Tabelle 23).

Zur graphischen Darstellung wurden Normal Q-Q Plots für die oben genannten Gruppen erstellt. Bei einer Normalverteilung müssen die Werte wie hier annähernd auf der Geraden liegen.

Tests of Normality

RASSCODN		Kolmogorov-Smirnov		
		Statistic	df	Sig.
WERT	Alle anderen Rassen	,147	23	,200
	Boxer	,354	3	.
	Deutscher Schäferh.	,196	9	,200
	Golden Retriever	,228	7	,200
	Husky	,187	4	.
	Howawart	,176	3	.
	Mix	,106	23	,200
	Rottweiler	,244	4	.
	Sheltie	,177	3	.

Tabelle 23: Ergebnisse der Überprüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test

Deutscher Schäferh.: Deutscher Schäferhund, **df:** Freiheitsgrad, **Sig.:** Signifikanz

Normal Q-Q Plot of WERT

For RASSCODN= 1,00

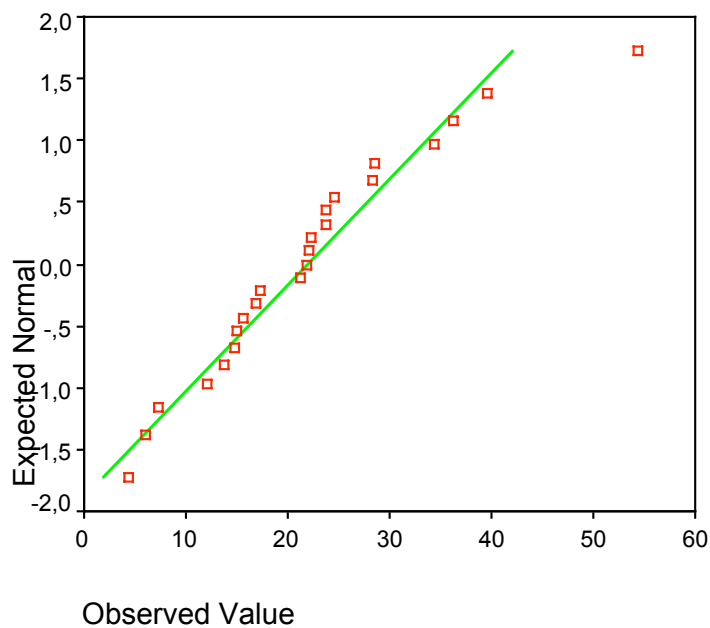


Abbildung 18: Normal Q-Q Plot für die Gruppe „alle anderen Rassen“

Normal Q-Q Plot of WERT

For RASSCODN= 9,00

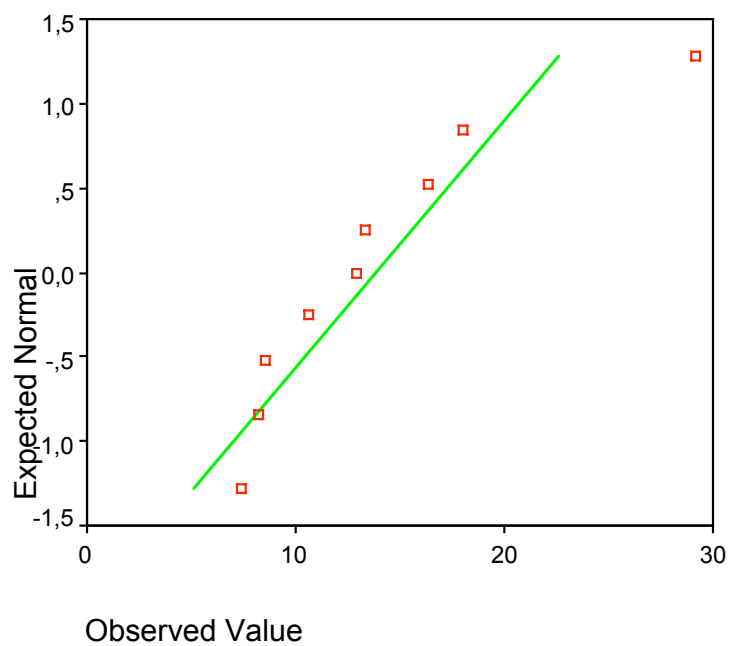


Abbildung 19: Normal Q-Q Plot für die Gruppe „Deutscher Schäferhund“

Normal Q-Q Plot of WERT

For RASSCODN= 13,00

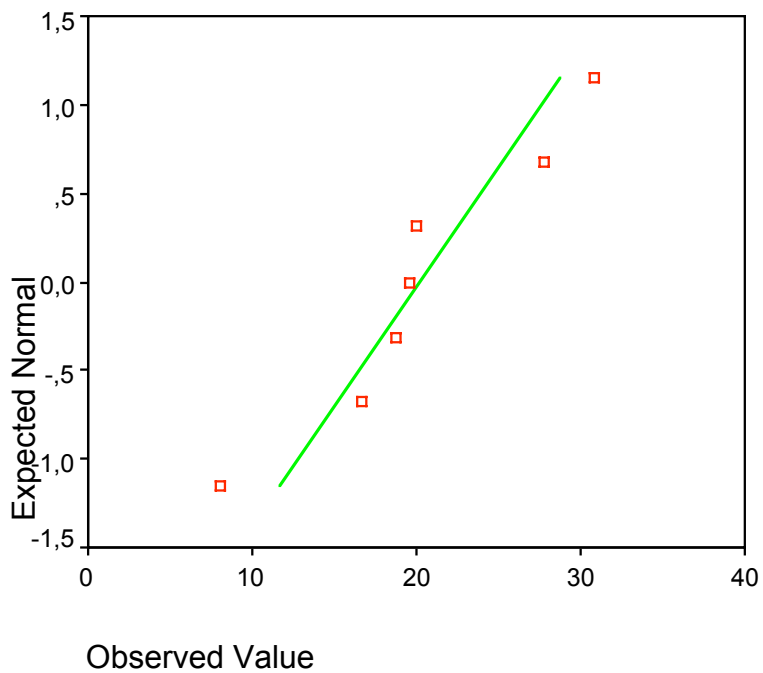


Abbildung 20: Normal Q-Q Plot für die Gruppe „Golden Retriever“

Normal Q-Q Plot of WERT

For RASSCODN= 18,00

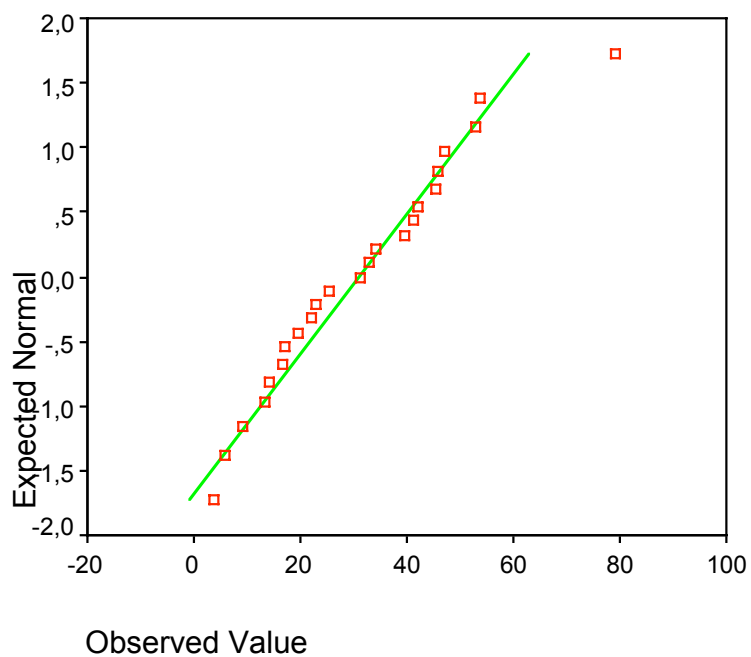


Abbildung 21: Normal Q-Q Plot für die Gruppe „Mix“

2.2 Erstellung der Referenzwerte

Zur Erstellung des Referenzwertes wurde auf die Aufteilung der gesamten Population in Rassen verzichtet, da in verschiedenen Gruppen zu wenige Probanden sind. Da die vorliegenden Daten normalverteilt sind, wird für die Berechnung der Referenzwerte das 95 %-Perzentil herangezogen. Das bedeutet, dass die oberen und unteren Referenzwerte durch die Gleichung

$$\text{Mittelwert} \pm t_{0,975(n-1)} \times \text{Standardabweichung (Prognose)}$$

definiert werden.

Dabei berechnet diese Formel das Prognoseintervall. Das Prognoseintervall ist größer als das Konfidenzintervall, da die Unsicherheit der Prognose mit in die Berechnung miteinfließt. Statt der Standardabweichung bei Konfidenzintervallberechnungen wird die Standardabweichung des geschätzten Prognosefehlers benutzt.

Hieraus wurde für die 79 gesunden Hunde ein Referenzwert erstellt, für die Gruppen Golden Retriever, Deutscher Schäferhund und Mix wurde darüber hinaus ein eigener Referenzwert berechnet (Tabelle 24)

Gruppe	n	Unterer Referenzbereich	Oberer Referenzbereich
Alle Gesunden	79	-6,03 pg/ml	53,69 pg/ml
DSH	9	-15,26 pg/ml	42,97 pg/ml
Golden Retriever	7	-9,27 pg/ml	49,78 pg/ml
Mix	23	2,91 pg/ml	59,34 pg/ml

Tabelle 24: Darstellung des 95%-Prognose-Intervalls mit oberer und unterer Grenze für alle Probanden, Deutsche Schäferhunde, Golden Retriever und Mischlinge

DSH: Deutscher Schäferhund

IV Diskussion

1 Analytische Zuverlässigkeit des Radioimmunoassays (BNP-32 canine RIA Kit, PhoenixPeptide, Belmont, USA)

Der vorliegende Radioimmunoassay zeigte sich aufgrund seiner Präzision in der Serie und von Tag zu Tag sowie aufgrund seiner Richtigkeit, Spezifität und Sensitivität geeignet zur Bestimmung von kaninem BNP.

1.1 Präzision

Die Intraassay-Präzision schwankte bei 6 aufeinander folgenden Messungen bei Hunden mit niedrigen BNP-Werten zwischen 8,96 % und 11,26 %. Die aufeinander folgende Messung von hohen BNP-Werten eines kranken Hundes erbrachte einen Variationskoeffizienten von 11,49 %. Die Präzisionsanalyse ergab somit eine durchschnittliche Intraassay-Präzision von 10,57 %. Die Interassay-Präzision wies einen Variationskoeffizienten von 12,64 % vor. Borgeson et al. (1998) verwendeten denselben Radioimmunoassay zur Bestimmung von kaninem BNP. Sie erzielten in der Präzisionsanalyse eine Intraassay-Präzision von 10 % und eine Interassay-Präzision von 12 % (37).

Andere Autoren nutzten zur Messung von kaninem BNP einen Radioimmunoassay für porcines BNP. Es besteht eine ausreichende strukturelle Homologie zwischen BNP von Hunden und Schweinen (183). So verwendeten Eriksson et al. (2001) zur Messung von BNP ein Antiserum gegen synthetisches BNP von Schweinen. Sie erreichten eine Intraassay-Präzision von 6 % und eine Interassay-Präzision von 11 %.

Asano et al. und MacDonald et al. bestimmten kanines BNP mithilfe eines weiteren spezifischen Testkits für kanines BNP der Firma Peninsula Laboratories Inc., Belmont, CA, USA.

Eine Inter- und Intraassay-Präzision von <15 % wird als ausreichend angesehen (202).

1.2 Richtigkeit

Zur Prüfung der Richtigkeit wurde das Plasma von 2 Hunden, davon einer mit einem niedrigen Ausgangswert von BNP und einer mit einem hohen Ausgangswert von BNP, mit 3 verschiedenen Konzentrationen von synthetischem kaninem BNP versetzt. Als durchschnittliche Wiederfindungsraten konnten 80,8 % und 90,9 % ermittelt werden. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei $r = 0,998$ und $r = 0,876$. Je näher der Korrelationskoeffizient bei +1 liegt, desto stärker kann eine positive Korrelation angenommen werden. Bei Zugabe von 64 pg zu dem Plasma des Hundes mit hohen BNP-Werten ergab sich eine Wiederfindungsrate von 116 %. Als Ursache hierfür kommen Matrixeffekte oder nicht sehr hohe Spezifität des primären Antikörpers in Frage.

Borgeson et al. (1998) ermittelten mit demselben Testsystem eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von 73±11 % (37). Bei Anwendung des Testsystems für porcines BNP variierte die Wiederfindungsrate für kanines BNP zwischen 60 % und 81 % (123). Asano et al. konnten mit dem anderen erhältlichen Radioimmunoassay eine Wiederfindungsrate von 64±2,9 % erzielen.

Ein weiterer Aspekt der Prüfung der Richtigkeit wäre die Messung einer Plasmaprobe mit einer sog. etablierten Referenzmethode. Zur Messung von kaninem BNP steht bisher nur eine kommerzielle Methode (Radioimmunoassay) zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde demnach auf den Vergleich mit einer anderen Messmethode verzichtet.

Die biologische Richtigkeit wird durch Stimulation der Produktion des jeweiligen zu untersuchenden Antigens bestimmt. Im vorliegenden Test wurde keine Stimulation durchgeführt, da ein starker Anstieg von BNP nur durch invasive Methoden provoziert werden könnte (z.B. Schrittmacher-induzierte Herzinsuffizienz o.ä.).

Da zur Messung von kaninem BNP im Gegensatz zur Messung von humanem BNP noch keine Messmethode ohne vorhergehende Plasmaextraktion existiert, wird neben der zeitaufwendigen Extraktion unweigerlich eine geringere gemessene finale BNP-Konzentration in Kauf genommen. Auf eine Plasmaextraktion kann bislang nicht verzichtet werden, da diese zu einer Anreicherung des ohnehin in pg-Bereichen vorkommenden BNPs führt und Matrixeffekte durch andere Bestandteile des Plasmas vermindert werden können. Da die Wiederfindungsrate mit der Präzisionsanalyse in engem Zusammenhang steht, werden

Wiederfindungsraten von $> 50\%$ als akzeptabel eingestuft, wenn eine gute Präzision vorhanden ist. Die Wiederfindungsrate sollte allerdings wie im hier durchgeführten Test immer in mindestens 3 verschiedenen Konzentrationen bestimmt werden (208). Es konnte hier kein BNP-freies Plasma verwendet werden, demzufolge ist eine homologe Durchmischung des Plasmas vor der Zugabe von synthetischem BNP für auswertbare Ergebnisse notwendig.

1.3 Sensitivität

Für die Sensitivität wurde die im Testkit angegebene niedrigste Konzentration des Standards als kleinste quantifizierbare Konzentration von BNP angenommen. In anderen Studien wurde dieselbe Methode angewandt (37, 180). Bei Vorhandensein von Proben ohne einen Gehalt an BNP kann zum einen das Lower Limit of Detection (LOD), zum anderen das LOQ durch eine mathematische Formel berechnet werden. Die Berechnung des LOD ist für quantitative Messmethoden nicht notwendig, da das Interesse auf der niedrigsten Konzentration liegt, mit der eine Quantifizierung mit ausreichender Präzision und Richtigkeit möglich ist (209). Im vorliegenden Fall war es nicht möglich, Proben ohne BNP zu verwenden.

1.4 Spezifität

Die Spezifität des Testsystems wird vom primären Antikörper bestimmt.

Um die Spezifität des Testsystems zu testen, wurde eine Verdünnungsreihe einer Plasmaprobe mit der Standardkurve verglichen. Dabei konnte eine gute Linearität beobachtet werden.

Die Informationen über eventuelle Kreuzreaktionen zu verwandten und ähnlichen Peptiden wurden den Herstellerhinweisen entnommen.

In der Literatur finden sich keine Hinweise auf Untersuchungen der Spezifität bei Messungen von kaninem BNP. Sagnella (2001) berichtet, dass bei Radioimmunoassays für humanes BNP auch eine 50-fache Konzentration von ANP oder CNP keine Kreuzreaktionen hervorruft. Bekannt ist, dass humanes Plasma BNP in 2 Formen enthält (BNP-32 und Pro-BNP). Die humanen Testsysteme messen wahrscheinlich beide Formen. Sie sind nicht spezifisch für

BNP-32. Obwohl der Anteil von Pro-BNP bei gesunden Menschen im Plasma klein ist, kann Pro-BNP bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkten auf über 50% des immunoreaktiven BNP ansteigen. Diese mangelnde Spezifität für das biologisch aktive BNP-32 muss bei Messung mit einem RIA bedacht werden (210). Inwieweit dieser Sachverhalt auch für kanines BNP-32 gilt, ist bisher nicht bekannt.

Um mögliche Matrixeffekte zu quantifizieren, kann zusätzlich ein Vergleich von Standardkonzentrationen in Puffer mit Standardkonzentrationen in einer BNP-freien Blutprobe gezogen werden (202).

1.5 Stabilität

Da die Plasmaproben der Probanden bei -70 °C gelagert werden, muss die Langzeit-Stabilität von BNP im Plasma abgesichert werden. Die Degradation von BNP erfolgt in Körper auf zwei Wegen, zum einen durch Degradation durch die neutrale Endopeptidase, zum anderen durch einen lysosomalen Abbau durch den natriuretischen Peptidrezeptor C. Die Stabilität von BNP im Plasma wurde durch wiederholte Messungen derselben Probe zu verschiedenen Zeitpunkten getestet. Es konnte kein Konzentrationsabfall nach 17 Monaten nachgewiesen werden. Die Langzeit-Stabilität sollte immer über mindestens die maximale Studiendauer untersucht werden. Bekannterweise zeigt sich keine oder nur eine geringe Degradation von Proteinen bei Temperaturen unter -20 °C (209). Es können hierbei keine Vergleiche zu anderen Studien über kanines BNP gezogen werden, da die Stabilität von BNP bei -70 °C noch nicht untersucht wurde.

Davidson et al. (1995) zeigten, dass die Gabe von Aprotinin, einem Proteaseinhibitor, nicht nötig ist um akkurate Messungen von humanem BNP zu erhalten (113). In einer Studie von Gobinet-Georges et al. (2000) wurde die Stabilität von humanem BNP untersucht. Dabei konnte kein Konzentrationsverlust bei 30 °C für 12 Stunden gesehen werden. Bei -20 °C war BNP für über einen Monat ohne Degradation haltbar (114). Plasma BNP-Werte sinken auch nach 3 Tagen bei Raumtemperatur nicht ab (115).

Zusätzlich wird die analytische Zuverlässigkeit des vorliegenden Testsystems durch die allgemeinen Vor- und Nachteile eines Radioimmunoassays beeinflusst. Ein Vorteil eines Radioimmunoassays besteht in seiner großen Sensitivität. So können auch Konzentrationen

im pg-Bereich mit ausreichender Präzision und Richtigkeit erfasst werden. Die Sensitivität des Testsystems hängt von der Spezifität des primären Antikörpers ab.

Ein Nachteil dieses Radioimmunoassays liegt sicherlich in der komplizierten und zeitintensiven Durchführung (vier Tage), die das Entstehen von systematischen Fehlern erhöht. Außerdem ist das Testsystem durch die Radioaktivität nur begrenzt haltbar, da ein Aktivitätsverlust der radioaktiv markierten Bestandteile besteht. Eine alternative Möglichkeit wäre die Verwendung von langlebigen Radionukliden wie z.B. Tritium (^3H). Für die Messung von BNP besteht allerdings eine zu geringe spezifische Aktivität von Tritium, um im pg-Bereich zu messen.

Vor allem die Plasmaextraktion führt zu einer weiteren Fehlerquelle. Die schlechteren Ergebnisse der Präzisionsmessungen im Vergleich zu anderen Radioimmunoassays sind wahrscheinlich eine Folge der Plasmaextraktion. Auch die bereits erwähnten Matrixeffekte beeinflussen die Messung von BNP und führen in unbekanntem Umfang zu einer schlechteren Präzision und Richtigkeit.

1.6 Plausibilität

Zur Evaluierung der Plausibilität wurde die BNP-Plasmakonzentration in 3 Blutproben von herzkranken Tieren gemessen. Hierbei wurde der BNP-Mittelwert von 23,83 pg/ml einer gesunden Population (n = 79) mit BNP-Plasmakonzentrationen von herzkranken Tieren verglichen. Tiere mit einer Mitralklappeninsuffizienz, dilatativen Kardiomyopathie und Fallot-Tetralogie zeigten um ein Vielfaches höhere BNP-Werte.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse der Validierung eine ausreichende analytische Zuverlässigkeit des Testsystems für kanines BNP feststellen.

2 Zusammenhang zwischen BNP und verschiedenen Variablen

Um eine mögliche Korrelation zwischen BNP und Variablen wie Größe, Geschlecht, Kastration, Rasse und Alter zu eruieren, wurden zunächst die Mittelwerte, die Standardabweichung und die Varianz für die individuellen Gruppen der einzelnen Variablen errechnet. Der nächste Schritt bestand in einer Varianzanalyse. Hierbei wurde das jeweilige Signifikanzniveau für eine Korrelation von BNP mit den einzelnen unabhängigen Variablen errechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5\%$ festgelegt.

Die unabhängigen Variablen Größe, Geschlecht, Kastration und Alter wiesen eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $> \alpha$ auf. Folglich besteht keine signifikante Korrelation dieser Variablen mit dem BNP-Wert.

Die Untergliederung der Probanden in einzelne Hunderassen zeigte dagegen einen signifikanten Zusammenhang mit den jeweiligen BNP-Werten. Die Wahrscheinlichkeit p lag in diesem Fall bei 1,7% und somit unter den vorgegebenen 5%.

Die Boxplotdarstellung verdeutlicht in einer graphischen Darstellung die Unterschiede in den BNP-Werten der einzelnen Rassen.

Trotz der signifikanten Ergebnisse müssen einzelne Gruppen vorsichtig interpretiert werden, da manche Hunderassen zu wenige Probanden enthielten. So kamen nur drei Boxer zur Auswertung, drei Howawarte und drei Shelties. Die Gruppe „alle anderen Rassen“ wurde aus einer Ansammlung von verschiedenen Rassen gebildet und kann somit nicht als homogene Gruppe gewertet werden, auch wenn hier eine signifikante Korrelation zum BNP-Wert festgestellt werden kann.

Das Regressionsmodell wurde aufgrund der nur hier vorliegenden Signifikanz für die Variable Rasse festgelegt. Weiterhin wurde eine Parameterschätzung erstellt, damit kann für einen Probanden, der einer bestimmten Hunderasse zugehörig ist, eine Schätzung des BNP-Wertes durchgeführt werden.

In der Literatur finden sich nur sehr wenige Angaben über BNP-Werte bei gesunden Hunden. Eriksson et al. (2001) untersuchten den Einfluss von Alter und Körpergewicht auf verschiedene neurohumorale Variablen. So wurde Plasma Nitrat und Nitrit, ANP, Endothelin, cGMP und BNP gemessen. Hierbei konnte eine Erhöhung von ANP und Plasma Nitrat und Nitrit mit zunehmendem Alter beobachtet werden. Plasma-BNP zeigte keine signifikante Korrelation mit den Variablen Alter oder Gewicht (123). Die aus humanmedizinischen Studien bekannte Erhöhung des Plasma-BNPs bei älteren Menschen wird auf eine

verminderte Nierenfunktion und auf eine steigende kardiale Hypertrophie ohne offensichtliche Herzinsuffizienz zurückgeführt (122). Eriksson et al. (2001) vermuten, dass die mangelnde Korrelation von BNP mit dem Alter aus der normalen kardialen und renalen Funktion der Studienteilnehmer resultiert (123).

In der Humanmedizin dagegen zeigten Studien Korrelationen dieser Variablen mit der Höhe der BNP-Werte. So haben gesunde Kinder signifikant höhere Werte als Erwachsene (119). Redfield et al. (2002) untersuchten BNP-Werte bei 767 Probanden. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung der BNP-Werte mit zunehmendem Alter beobachtet werden. Auch Frauen hatten signifikant höhere BNP-Werte als männliche Probanden (122). Yoshibayashi et al. (1995) untersuchten bei 58 Neugeborenen über die ersten Monate BNP-Werte und stellten fest, dass im Alter von 3 Monaten die BNP-Werte auf das Niveau von adulten BNP-Werten sinken (120). Aufgrund dieser Untersuchungen wird bei Messung und Interpretation von BNP-Werten eine rechnerische Anpassung der BNP-Werte an das jeweilige Alter gefordert (211). Keine signifikanten Veränderungen zeigten sich während eines Menstruationszyklus bei gesunden Frauen (212).

3 Erstellung des Referenzbereiches

In dieser Studie wurde anhand der Daten von 79 gesunden Hunden verschiedener Rassen nach Bestimmung der BNP-Konzentration mit einem Radioimmunoassay ein Referenzbereich definiert. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Er ist vor allem bei kleineren Stichprobenumfängen sehr aussagekräftig (213). Die Daten wurden untergliedert in die verschiedenen Rassen auf Normalverteilung untersucht und erwiesen sich als normalverteilt. Die Referenzwerte wurden anhand des Prognoseintervalls ermittelt. So konnte ein oberer Referenzwert von 53,69 pg/ml für die Gesamtheit der Probanden, von 42,97 pg/ml für Deutsche Schäferhunde, von 49,78 pg/ml für Golden Retriever und von 59,34 pg/ml für Mischlingshunde etabliert werden. Der niedrigste gemessene BNP-Wert lag bei 3,39 pg/ml, der höchste gemessene Wert bei 79,31 pg/ml. Als Mittelwert für alle gemessenen BNP-Werte wurde 23,83 pg/ml mit einer Standardabweichung von 14,9 berechnet.

Ein Vergleich mit andernorts durchgeführten BNP-Messungen bei gesunden Hunden erweist sich als schwierig, da bisher nur bei wenigen gesunden Hunden BNP-Werte gemessen wurden, zum anderen wird die Interpretation durch Verwendung von unterschiedlichen Messmethoden erschwert.

Tessier et al. (2002) untersuchten BNP-Werte bei 17 gesunden Hunden mit demselben Radioimmunoassay und konnten bei diesen Probanden einen Mittelwert von 31 ± 3 pg/ml ermitteln (181).

Auch Borgeson et al. (1998) untersuchten bei 5 gesunden, männlichen Tieren im Rahmen einer Studie BNP-Werte. Sie erhielten bei diesen Probanden einen BNP-Mittelwert von 20 ± 5 pg/ml.

In der Studie von Woods et al. (1999) wurde zwar ein Radioimmunoassay desselben Herstellers, aber eine andere Einheit von BNP verwendet. So ergab sich bei 6 männlichen Greyhounds ein BNP-Mittelwert von $1,5 \pm 1,1$ fmol/ml, dies entspricht $31,05 \pm 22,77$ pg/ml.

MacDonald et al. (2003) ermittelten bei 9 gesunden Hunden im Alter von 4-10 Jahren und einem Gewicht von 7-55 kg BNP-Werte. Sie legten zur Unterscheidung gesunder Hunde mit Hunden, die an einer moderaten Mitralklappeninsuffizienz ohne Herzinsuffizienz litten, einen Wert von 23 pg/ml fest (182). Die Messung der BNP-Werte in dieser Studie erfolgte allerdings mit einem anderen Radioimmunoassay. Auch die noch geringere Anzahl von Probanden lässt keinen aussagekräftigen Vergleich zu.

Auch Asano et al. (1999) verwendeten einen Radioimmunoassay eines anderen Herstellers. Sie untersuchten neben Konzentrationen bei kranken Hunden BNP-Werte bei 19 gesunden Hunden. Hier lag der BNP-Mittelwert bei $36,8 \pm 4$ pg/ml mit einem niedrigsten gemessenen Wert von 20,5 pg/ml und einem höchsten gemessenen Wert von 66,3 pg/ml (180).

Bei Verwendung von Antiseren gegen porcines synthetisches BNP stellten Nishida et al. (1990) einen Mittelwert von 10,94 pg/ml heraus. Diese Studie untersuchte BNP-Werte bei 19 Hunden (214).

Aufgrund der guten Ergebnisse der Testvalidierung und der weitgehenden Übereinstimmung mit den BNP-Werten, die von Anderen mit demselben Testsystem gemessen wurden, können die hier ermittelten BNP-Werte als orientierende Referenzwerte empfohlen werden. Keine andere Studie hat vergleichbar zuverlässige Referenzwerte ermittelt.

Vergleiche mit BNP-Werten, die mit anderen Messmethoden ermittelt werden, sollten vorsichtig interpretiert werden. Folglich sollten Labor- und Messmethoden-spezifische Referenzwerte erstellt werden.

Da in der vorliegenden Studie eine signifikante Korrelation zwischen BNP-Werten und der Hunderasse festgestellt wurde, müssen eigene Referenzwerte für die einzelnen Hunderassen erstellt werden. Hierzu werden möglichst viele Probanden der einzelnen Hunderassen benötigt. In der vorliegenden Studie war es aufgrund der Anzahl der Studienteilnehmer ausschließlich möglich, Referenzwerte für Deutsche Schäferhunde und Golden Retriever zu erstellen. Die Gruppe Mischlingshunde sollte aufgrund Ihrer Heterogenität möglicherweise nach anderen Gesichtspunkten weiter untergliedert werden.

Um einen möglichen Einfluss des Alters auf die BNP-Werte auszuschließen, ist eine weitumfassende Messung von Plasma-BNP in allen Altersgruppen anzuraten. Besonders sollten hierbei sehr junge und sehr alte Tiere berücksichtigt werden, da diese in Anlehnung an humanmedizinische Studien besonders hohe bzw. niedrige Werte haben könnten.

Bei gesunden Menschen wird eine pulsatile Sekretion für gesunde Individuen postuliert (31). Für zukünftige Studien sollte der mögliche Einfluss auf die BNP-Werte durch pulsatile Sekretion durch mehrfache Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten ausgeschlossen werden. Auch eine mögliche zirkadiane Ausschüttung wie bei anderen Hormonen sollte untersucht werden.

4 Ausblick

Um die Messung von BNP in die klinische Routinediagnostik zu integrieren, sind im Moment noch aufwendige Testverfahren nötig. Da für die Durchführung des Radioimmunoassays eine Plasmaextraktion des Peptides unumgänglich ist, führt diese neben der zeitlich und technisch aufwendigen Methode zu einer schlechteren Präzision und Richtigkeit im gesamten Messverfahren. Der Radioimmunoassay nimmt aufgrund der einzelnen Inkubationsschritte auch drei Tage in Anspruch.

In der Humanmedizin wurde ein immunofluorometrisches Verfahren zur Messung von BNP entwickelt. Dieses Testsystem, der sog. TRIAGE-Test (TRIAGE® BNP, Biosite GmbH, Willich, Deutschland), ermöglicht es, innerhalb von 15 Minuten ohne vorherige Plasmaextraktion zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Dabei ist dieses Testsystem den älteren Messmethoden (RIA und IRMA) in Präzision und Richtigkeit überlegen (126).

Zukunftsweisend wäre sicherlich die Entwicklung eines ähnlich schnell und zuverlässig arbeitenden Testsystems für die Messung von kaninem BNP. Vermutlich können aufgrund der Peptidstruktur humane Testsysteme nicht für die Messung von kaninem BNP verwendet werden (183). Dennoch könnte in folgenden Studien eine Validierung des TRIAGE-Tests für kanines BNP durchgeführt werden.

Die Messung von BNP-Werten bei Hunden wäre - in Anlehnung an humanmedizinische Studien - insbesondere zur Unterscheidung von respiratorischen von kardialen Erkrankungen sinnvoll. Denn ein großer Teil der Hunde, die sich in einer Notfallambulanz einfinden, werden in Folge von Dyspnoe vorgestellt. Ein Ausschluss von kardialen Erkrankungen aufgrund von niedrigen BNP-Werten könnte in Notfallsituationen sehr hilfreich sein; dies speziell bei unkooperativen oder hochgradig dyspnoeischen Tieren, bei denen eine echokardiographische Untersuchung unmöglich ist.

Um diese Unterscheidung durchführen zu können, müssten vorab Grenzwerte von BNP-Werten zur Abgrenzung von gesunden von kranken Hunden festgesetzt werden. MacDonald et al. (2003) legten als erste eine BNP-Konzentration (35 pg/ml) fest, bei deren Überschreitung mit guter Sensitivität und Spezifität eine kardiale Erkrankung vermutet werden kann (182).

Viel verspricht für die Zukunft auch die Messung von BNP im Plasma von Katzen. Da Katzen anders als Hunde erst sehr spät im Verlauf einer Herzerkrankung eine klinische – für die Besitzer erkennbare - Symptomatik entwickeln, könnte eine im Rahmen eines Gesundheitsscreenings durchgeführte Blutentnahme früher zur Diagnose von Herzerkrankungen beitragen. Liu et al. (2002) untersuchten die Struktur des felines BNP und fanden eine ungefähr 90 %ige Homologie mit vielen anderen Spezies. Diese hohe Homologie erlaubt den Gebrauch von Testsystemen von anderen Spezies. Dennoch wird gerade ein felines Testsystem entwickelt (178).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Gebiet der natriuretischen Peptide mannigfaltige Forschungsmöglichkeiten bietet, die mit großer Wahrscheinlichkeit in den nächsten Jahren sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin interessante und wertvolle Erkenntnisse bringen werden.

VI Zusammenfassung

Zur Familie der natriuretischen Peptide gehören drei Peptide: Atrial Natriuretic Peptide (ANP), Brain Natriuretic Peptide (BNP) und C-type natriuretic peptide (CNP). BNP wurde ursprünglich im Gehirn von Schweinen isoliert, bald stellte sich heraus, dass eine wesentlich höhere Konzentration im Herz vorliegt. Plasma-BNP ist bei verschiedenen Herzerkrankungen vieler Spezies hoch.

Das Ziel der Studie war es, Referenzwerte für BNP im kaninen Plasma zu erstellen. Zur Messung von Plasma BNP wurde ein kommerzieller Radioimmunoassay (BNP-32 canine RIA Kit, PhoenixPeptide, Belmont, USA) verwendet. Eine Validierung des Testkits mit der Untersuchung von Präzision, Richtigkeit, Sensitivität, Spezifität und Stabilität wurde zuvor durchgeführt.

Als Studienteilnehmer dienten 79 gesunde Hunde (41 Rüden, 38 Hündinnen) im Alter von 3 Monaten bis 15 Jahren. Dabei waren 23 Hunde Mischlingshunde und 56 Rassehunde. Anhand ihres Gewichtes wurden sie in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt (K: <10 kg, M: 10-25 kg, G: >25 kg).

Der untersuchte Radioimmunoassay wies eine gute Präzision mit einer Intraassay-Präzision von 10,57 % und einer Interassay-Präzision von 12,64 % auf. Bei Zugabe von synthetischem kaninem BNP zu einem Plasma mit niedrigem BNP-Wert ergab sich eine Wiederfindungsrate von 80,8 %. Die Wiederfindungsrate bei Zugabe zu einem Plasma mit hoher BNP-Konzentration lag bei 90,9 %. Der niedrigste Standard war 1 pg/Röhrchen. Zur Bestimmung der Spezifität wurde eine serienweise Verdünnung von Hundeplasma mit der Standardkurve verglichen und zeigte einen parallelen Verlauf. Bei Lagerung bei -70 °C zeigte sich eine gute Langzeit-Stabilität, auch nach 17 Monaten konnte keine Degradation von BNP beobachtet werden.

Mittelwert, Median, Standardabweichung und Varianz der BNP-Werte wurden getrennt für Alter, Geschlecht, Kastration/Ovariohysterektomie, Größe und Rasse berechnet. Um einen möglichen Zusammenhang des BNP-Wertes mit Geschlecht, Kastration/Ovariohysterektomie, Größe und Rasse festzustellen, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Mit einer einfachen Regressionsanalyse wurde auf einen Zusammenhang von Alter und BNP-Wert getestet. Es bestand kein Zusammenhang der BNP-Werte mit Alter, Geschlecht, Kastration/Ovariohysterektomie und Größe ($p > 0,05$). Die BNP-Konzentration

war jedoch in signifikantem Maße ($p = 0,017$) von der Rasse abhängig. Parameterschätzungen wurden für jede Rasse erstellt. Ein Kolmogorov-Smirnov Test zeigte, dass die vorliegenden Daten normalverteilt waren.

Referenzwerte wurden für die gesamte Studienpopulation (oberer Referenzbereich: 53,69 pg/ml), Deutsche Schäferhunde (oberer Referenzbereich: 42,97 pg/ml), Golden Retriever (oberer Referenzbereich: 49,78 pg/ml) und Mischlinge (oberer Referenzbereich: 59,34 pg/ml) etabliert.

Mit Abschluss dieser Studie liegen erstmals zuverlässige Referenzwerte für veterinärmedizinische kardiologische Studien vor.

VII Summary

Katrin Tietgen

Measurement of "Brain Natriuretic Peptide" in healthy dogs

The natriuretic peptide family consists of three peptides: atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP). BNP was originally identified in extracts of porcine brain, but there is considerably more in the cardiac tissue. Plasma BNP is high in many different cardiac diseases in several species.

The purpose of our study was to define a reference range for BNP in canine plasma. The BNP concentration was analysed with a commercial radioimmunoassay-testkit (BNP-32 canine RIA Kit, PhoenixPeptide, Belmont, USA). Before being used, the testkit was validated. Precision, accuracy, sensitivity, specificity, and stability tests were carried out.

The study population consisted of 79 healthy dogs (41 males, 38 females) ranging in age from 3 months to 15 years. Of these 23 were mongrel dogs and 56 belonged to various breeds. According to their weight they were placed in 3 different groups (K: <10 kg, M: 10-25 kg, G: >25 kg).

The radioimmunoassay showed a good precision. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 10,57 % and 12,64 %, respectively. Recovery of synthetic canine BNP added to a plasma with a low BNP content and an high BNP content was 80,8 % and 90,9 %, respectively. The lowest standard was 1 pg/tube. The dilution of a plasma containing BNP, carried out as a marker of specificity, inhibited binding of radioiodinated hormone to the antibody in a manner parallel to inhibition by the standards. The long-term stability showed no degradation of BNP over 17 month at a temperature of -70 C.

Mean, median, standard deviation and variance of BNP levels were evaluated for age, sex, castration, weight, and breed. Analysis of variance was used to assess the association between sex, castration, weight, breed and BNP levels. Age-related correlations were tested by use of a single regression analysis. There was no association ($p > 0,05$) between age, castration, sex, and weight and BNP levels. Only Plasma BNP and breed showed a significant correlation ($p = 0,017$). Parameter estimates were calculated for each breed. The assumption of normality was verified by a Kolmogorov-Smirnov test.

Reference values were established for the whole study population (upper reference value: 53,69 pg/ml), German Shepherd (upper reference value: 42,97 pg/ml), Golden Retriever

(upper reference value: 49,78 pg/ml) and mongrel dog (upper reference value: 59,34 pg/ml). To our knowledge, this is the first study describing reliable reference values for veterinary cardiology. The basis for future clinical studies is hereby established.

VIII Literaturverzeichnis

1. Flynn TG, de Bold ML, de Bold AJ. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117(3):859-65.
2. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332(6159):78-81.
3. Aburaya M, Hino J, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Isolation and identification of rat brain natriuretic peptides in cardiac atrium. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163(1):226-32.
4. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168(2):863-70.
5. Lisy O, Lainchbury JG, Leskinen H, Burnett JC, Jr. Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, dendroaspis natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure. *Hypertension* 2001;37(4):1089-94.
6. Seilhamer JJ, Arfsten A, Miller JA, Lundquist P, Scarborough RM, Lewicki JA, et al. Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165(2):650-8.
7. Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Itoh H, Saito Y, Nakao K. Two cardiac natriuretic peptide genes (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) are organized in tandem in the mouse and human genomes. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28(8):1811-5.
8. Kojima M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for rat brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159(3):1420-6.

9. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens* 1992;10(9):907-12.
10. Pemberton CJ, Yandle TG, Charles CJ, Rademaker MT, Aitken GD, Espiner EA. Ovine brain natriuretic peptide in cardiac tissues and plasma: effects of cardiac hypertrophy and heart failure on tissue concentration and molecular forms. *J Endocrinol* 1997;155(3):541-50.
11. Liang F, Lu S, Gardner DG. Endothelin-dependent and -independent components of strain-activated brain natriuretic peptide gene transcription require extracellular signal regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 2000;35(1 Pt 2):188-92.
12. Doi K, Ikeda T, Itoh H, Ueyama K, Hosoda K, Ogawa Y, et al. C-type natriuretic peptide induces redifferentiation of vascular smooth muscle cells with accelerated reendothelialization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(6):930-6.
13. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, et al. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993;87(2):464-9.
14. Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Suga S, Ogawa Y, Saito Y, et al. Biosynthesis, secretion, and receptor selectivity of human brain natriuretic peptide. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69(10):1500-6.
15. Doyama K, Fukumoto M, Takemura G, Tanaka M, Oda T, Hasegawa K, et al. Expression and distribution of brain natriuretic peptide in human right atria. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(7):1832-8.
16. Inoue S, Murakami Y, Sano K, Katoh H, Shimada T. Atrium as a source of brain natriuretic polypeptide in patients with atrial fibrillation. *J Card Fail* 2000;6(2):92-6.
17. Hasegawa K, Fujiwara H, Doyama K, Mukoyama M, Nakao K, Fujiwara T, et al. Ventricular expression of atrial and brain natriuretic peptides in dilated cardiomyopathy. An immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens using specific monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1993;142(1):107-16.

18.Kohno M, Horio T, Yoshiyama M, Takeda T. Accelerated secretion of brain natriuretic peptide from the hypertrophied ventricles in experimental malignant hypertension. *Hypertension* 1992;19(2):206-11.

19.Hama N, Itoh H, Shirakami G, Nakagawa O, Suga S, Ogawa Y, et al. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;92(6):1558-64.

20.Takemura G, Takatsu Y, Doyama K, Itoh H, Saito Y, Koshiji M, et al. Expression of atrial and brain natriuretic peptides and their genes in hearts of patients with cardiac amyloidosis. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(4):754-65.

21.Asano K, Murakami M, Endo D, Kimura T, Fujinaga T. Complementary DNA cloning, tissue distribution, and synthesis of canine brain natriuretic peptide. *Am J Vet Res* 1999;60(7):860-4.

22.Moe GW, Grima EA, Wong NL, Howard RJ, Armstrong PW. Plasma and cardiac tissue atrial and brain natriuretic peptides in experimental heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27(3):720-7.

23.Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield M, Wei CM, Porter JG, et al. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol* 1998;274(5 Pt 2):H1684-9.

24.Lee YJ, Lin SR, Shin SJ, Lai YH, Lin YT, Tsai JH. Brain natriuretic peptide is synthesized in the human adrenal medulla and its messenger ribonucleic acid expression along with that of atrial natriuretic peptide are enhanced in patients with primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(5):1476-82.

25.Ohsaki Y, Gross AJ, Le PT, Oie H, Johnson BE. Human small cell lung cancer cells produce brain natriuretic peptide. *Oncology* 1999;56(2):155-9.

26.Kim SW, Li Y, Kim S, Oh YW, Lee JU. Local renal and vascular natriuretic peptide system in obstructive uropathic rats. *Urol Res* 2002;30(2):97-101.

27. Mistry S, Lussert B, Stewart K, Hawksworth GM, Struthers A, McLay JS. The expression and secretion of atrial natriuretic factor and brain natriuretic peptide by rat proximal tubular cells. *Biochem Pharmacol* 2000;59(7):783-90.
28. Thibault G, Charbonneau C, Bilodeau J, Schiffrin EL, Garcia R. Rat brain natriuretic peptide is localized in atrial granules and released into the circulation. *Am J Physiol* 1992;263(2 Pt 2):R301-9.
29. Ogawa T, Vatta M, Bruneau BG, de Bold AJ. Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 2):H1977-86.
30. de Bold AJ, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res* 1996;31(1):7-18.
31. Pedersen EB, Pedersen HB, Jensen KT. Pulsatile secretion of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in healthy humans. *Clin Sci (Lond)* 1999;97(2):201-6.
32. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991;87(4):1402-12.
33. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994;90(1):195-203.
34. Lang RE, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T. Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 1985;314(6008):264-6.
35. Thibault G, Amiri F, Garcia R. Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart. *Annu Rev Physiol* 1999;61:193-217.

36. Thibault G, Doubell AF, Garcia R, Lariviere R, Schiffrin EL. Endothelin-stimulated secretion of natriuretic peptides by rat atrial myocytes is mediated by endothelin A receptors. *Circ Res* 1994;74(3):460-70.
37. Borgeson DD, Stevens TL, Heublein DM, Matsuda Y, Burnett JC. Activation of myocardial and renal natriuretic peptides during acute intravascular volume overload in dogs: functional cardiorenal responses to receptor antagonism. *Clin Sci (Lond)* 1998;95(2):195-202.
38. Ogawa T, Linz W, Stevenson M, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML, Chen JH, et al. Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production. *Circulation* 1996;93(11):2059-67.
39. Takahashi T, Allen PD, Izumo S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res* 1992;71(1):9-17.
40. Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA, Frampton CM, Nicholls MG, Richards AM. Natriuretic peptide responses to acute and chronic ventricular pacing in sheep. *Am J Physiol* 1996;270(2 Pt 2):H594-602.
41. Bruneau BG, de Bold AJ. Selective changes in natriuretic peptide and early response gene expression in isolated rat atria following stimulation by stretch or endothelin-1. *Cardiovasc Res* 1994;28(10):1519-25.
42. Bruneau BG, Piazza LA, de Bold AJ. BNP gene expression is specifically modulated by stretch and ET-1 in a new model of isolated rat atria. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 2):H2678-86.
43. Horio T, Kohno M, Takeda T. Cosecretion of atrial and brain natriuretic peptides stimulated by endothelin-1 from cultured rat atrial and ventricular cardiocytes. *Metabolism* 1993;42(1):94-6.
44. Horio T, Kohno M, Takeda T. Effects of arginine vasopressin, angiotensin II and endothelin-1 on the release of brain natriuretic peptide in vivo and in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992;19(8):575-82.

45. Ry SD, Andreassi MG, Clerico A, Biagini A, Giannessi D. Endothelin-1, endothelin-1 receptors and cardiac natriuretic peptides in failing human heart. *Life Sci* 2001;68(24):2715-30.
46. Hanford DS, Thuerauf DJ, Murray SF, Glembotski CC. Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1994;269(42):26227-33.
47. Bruneau BG, Piazza LA, de Bold AJ. Alpha 1-adrenergic stimulation of isolated rat atria results in discoordinate increases in natriuretic peptide secretion and gene expression and enhances Egr-1 and c-Myc expression. *Endocrinology* 1996;137(1):137-43.
48. Wiese S, Breyer T, Dragu A, Wakili R, Burkard T, Schmidt-Schweda S, et al. Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation* 2000;102(25):3074-9.
49. Kohno M, Horio T, Yasunari K, Yokokawa K, Ikeda M, Kurihara N, et al. Stimulation of brain natriuretic peptide release from the heart by thyroid hormone. *Metabolism* 1993;42(8):1059-64.
50. Ohta Y, Watanabe K, Nakazawa M, Yamamoto T, Ma M, Fuse K, et al. Carvedilol enhances atrial and brain natriuretic peptide mRNA expression and release in rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36 Suppl 2:S19-23.
51. Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 2001;51(3):429-41.
52. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens* 1992;10(10):1111-4.
53. Schulz S, Waldman SA. The guanylyl cyclase family of natriuretic peptide receptors. *Vitam Horm* 1999;57:123-51.
54. Potter LR, Hunter T. Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B. *Methods* 1999;19(4):506-20.

55. Haloui M, Arnal JF, Pham I, Gonzalez W, Lyoussi B, Michel JB. [Functional compartmentation of the endocrine action of cardiac natriuretic peptides]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2000;61(1):32-40.
56. Kourie JI, Rive MJ. Role of natriuretic peptides in ion transport mechanisms. *Med Res Rev* 1999;19(1):75-94.
57. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(26):14730-5.
58. Pandey KN, Oliver PM, Maeda N, Smithies O. Hypertension associated with decreased testosterone levels in natriuretic peptide receptor-A gene-knockout and gene-duplicated mutant mouse models. *Endocrinology* 1999;140(11):5112-9.
59. Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2703-6.
60. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 1992;130(1):229-39.
61. Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992;86(4):1081-8.
62. Goy MF, Oliver PM, Purdy KE, Knowles JW, Fox JE, Mohler PJ, et al. Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. *Biochem J* 2001;358(Pt 2):379-87.
63. Ritter D, Dean AD, Gluck SL, Greenwald JE. Natriuretic peptide receptors A and B have different cellular distributions in rat kidney. *Kidney Int* 1995;48(6):5758-66.
64. Lin X, Hanze J, Heese F, Sodmann R, Lang RE. Gene expression of natriuretic peptide receptors in myocardial cells. *Circ Res* 1995;77(4):750-8.

65. Kim SZ, Cho KW, Kim SH. Modulation of endocardial natriuretic peptide receptors in right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 1999;277(6 Pt 2):H2280-9.
66. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(13):7403-8.
67. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarborough RM, et al. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. *J Biol Chem* 1988;263(19):9395-401.
68. Pidgeon GB, Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Yandle TG, Frampton C. Differing metabolism and bioactivity of atrial and brain natriuretic peptides in essential hypertension. *Hypertension* 1996;27(4):906-13.
69. Hirsch JR, Meyer M, Magert HJ, Forssmann WG, Mollerup S, Herter P, et al. cGMP-dependent and -independent inhibition of a K⁺ conductance by natriuretic peptides: molecular and functional studies in human proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(3):472-80.
70. Espiner EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG. Natriuretic hormones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995;24(3):481-509.
71. Giannessi D, Andreassi MG, Del Ry S, Clerico A, Colombo MG, Dini N. Possibility of age regulation of the natriuretic peptide C-receptor in human platelets. *J Endocrinol Invest* 2001;24(1):8-16.
72. Hirose S, Hagiwara H, Takei Y. Comparative molecular biology of natriuretic peptide receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79(8):665-72.
73. Kashiwagi M, Katafuchi T, Kato A, Inuyama H, Ito T, Hagiwara H, et al. Cloning and properties of a novel natriuretic peptide receptor, NPR-D. *Eur J Biochem* 1995;233(1):102-9.
74. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339(5):321-8.

75. Nawarskas J, Rajan V, Frishman WH. Vasopeptidase inhibitors, neutral endopeptidase inhibitors, and dual inhibitors of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase. *Heart Dis* 2001;3(6):378-85.
76. Gee NS, Bowes MA, Buck P, Kenny AJ. An immunoradiometric assay for endopeptidase-24.11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues. *Biochem J* 1985;228(1):119-26.
77. Ozaki J, Shimizu H, Hashimoto Y, Itoh H, Nakao K, Inui K. Enzymatic inactivation of major circulating forms of atrial and brain natriuretic peptides. *Eur J Pharmacol* 1999;370(3):307-12.
78. Rademaker MT, Charles CJ, Kosoglou T, Protter AA, Espiner EA, Nicholls MG, et al. Clearance receptors and endopeptidase: equal role in natriuretic peptide metabolism in heart failure. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 2):H2372-9.
79. Morais HA. Pathophysiology of heart failure. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000.692-713
80. Lainchbury JG, Burnett JC, Jr., Meyer D, Redfield MM. Effects of natriuretic peptides on load and myocardial function in normal and heart failure dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(1):H33-40.
81. La Villa G, Bisi G, Lazzeri C, Fronzaroli C, Stefani L, Barletta G, et al. Cardiovascular effects of brain natriuretic peptide in essential hypertension. *Hypertension* 1995;25(5):1053-7.
82. Espiner EA. Physiology of natriuretic peptides. *J Intern Med* 1994;235(6):527-41.
83. Schirger JA, Grantham JA, Kullo IJ, Jougasaki M, Wennberg PW, Chen HH, et al. Vascular actions of brain natriuretic peptide: modulation by atherosclerosis and neutral endopeptidase inhibition. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(3):796-801.
84. van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, de Leeuw PW. Effects of brain natriuretic peptide on forearm vasculature: comparison with atrial natriuretic peptide. *Cardiovasc Res* 1999;44(3):595-600.

85. Marcus LS, Hart D, Packer M, Yushak M, Medina N, Danziger RS, et al. Hemodynamic and renal excretory effects of human brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. A double-blind, placebo-controlled, randomized crossover trial. *Circulation* 1996;94(12):3184-9.
86. Woods RL, Jones MJ. Atrial, B-type, and C-type natriuretic peptides cause mesenteric vasoconstriction in conscious dogs. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 2):R1443-52.
87. Woods RL, Smolich JJ. Regional blood flow effects of ANP in conscious dogs: preferential gastrointestinal vasoconstriction. *Am J Physiol* 1991;261(6 Pt 2):H1961-9.
88. Supaporn T, Wennberg PW, Wei CM, Kinoshita M, Matsuda Y, Burnett JC. Role for the endogenous natriuretic peptide system in the control of basal coronary vascular tone in dogs. *Clin Sci (Lond)* 1996;90(5):357-62.
89. Moritoki H, Yoshikawa T, Hisayama T, Takeuchi S. Possible mechanisms of age-associated reduction of vascular relaxation caused by atrial natriuretic peptide. *Eur J Pharmacol* 1992;210(1):61-8.
90. van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, De Mey JG, Smits PA, de Leeuw PW. Nitric oxide and potassium channels are involved in brain natriuretic peptide induced vasodilatation in man. *J Hypertens* 2002;20(3):493-9.
91. Brunner-La Rocca HP, Kaye DM, Woods RL, Hastings J, Esler MD. Effects of intravenous brain natriuretic peptide on regional sympathetic activity in patients with chronic heart failure as compared with healthy control subjects. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(5):1221-7.
92. Yamamoto K, Burnett JC, Jr., Redfield MM. Effect of endogenous natriuretic peptide system on ventricular and coronary function in failing heart. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 2):H2406-14.
93. Suenobu N, Shichiri M, Iwashina M, Marumo F, Hirata Y. Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(1):140-6.

94. Casco VH, Veinot JP, Kuroski de Bold ML, Masters RG, Stevenson MM, de Bold AJ. Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries. *J Histochem Cytochem* 2002;50(6):799-809.
95. Ikeda M, Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, Ueda M, et al. Natriuretic peptide family as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(4):731-6.
96. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(8):4239-44.
97. Jensen KT, Carstens J, Pedersen EB. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 2):F63-72.
98. Jensen KT, Eiskjaer H, Carstens J, Pedersen EB. Renal effects of brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Clin Sci (Lond)* 1999;96(1):5-15.
99. Morita H, Hagiike M, Horiba T, Miyake K, Ohyama H, Yamanouchi H, et al. Effects of brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide infusion on urine flow and jejunal absorption in anesthetized dogs. *Jpn J Physiol* 1992;42(2):349-53.
100. Stevens TL, Rasmussen TE, Wei CM, Kinoshita M, Matsuda Y, Burnett JC, Jr. Renal role of the endogenous natriuretic peptide system in acute congestive heart failure. *J Card Fail* 1996;2(2):119-25.
101. Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 1986;324(6096):473-6.
102. La Villa G, Fronzaroli C, Lazzeri C, Porciani C, Bandinelli R, Vena S, et al. Cardiovascular and renal effects of low dose brain natriuretic peptide infusion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(5):1166-71.

103. van der Zander K, Houben AJ, Kroon AA, Wierema TK, Fuss-Lejeune MJ, Koster D, et al. Does brain natriuretic peptide have a direct renal effect in human hypertensives? *Hypertension* 2003;41(1):119-23.
104. La Villa G, Stefani L, Lazzeri C, Zurli C, Guerra CT, Barletta G, et al. Acute effects of physiological increments of brain natriuretic peptide in humans. *Hypertension* 1995;26(4):628-33.
105. Akabane S, Matsushima Y, Matsuo H, Kawamura M, Imanishi M, Omae T. Effects of brain natriuretic peptide on renin secretion in normal and hypertonic saline-infused kidney. *Eur J Pharmacol* 1991;198(2-3):143-8.
106. Harris PJ, Thomas D, Morgan TO. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 1987;326(6114):697-8.
107. Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jougasaki M, Kurose M, et al. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1991;84(4):1581-8.
108. Nawata H, Ohashi M, Haji M, Takayanagi R, Higuchi K, Fujio N, et al. Atrial and brain natriuretic peptide in adrenal steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40(1-3):367-79.
109. Blackburn RE, Samson WK, Fulton RJ, Stricker EM, Verbalis JG. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am J Physiol* 1995;269(2 Pt 2):R245-51.
110. Levin ER, Frank HJ. Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor. *Am J Physiol* 1991;261(2 Pt 2):R453-7.
111. Langub MC, Jr., Dolgas CM, Watson RE, Jr., Herman JP. The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1995;7(4):305-9.

112. Yamamoto S, Inenaga K, Eto S, Yamashita H. Cardiovascular-related peptides influence hypothalamic neurons involved in control of body water homeostasis. *Obes Res* 1995;3 Suppl 5:789S-794S.
113. Davidson NC, Coutie WJ, Struthers AD. N-terminal proatrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are stable for up to 6 hours in whole blood in vitro. *Circulation* 1995;91(4):1276-7.
114. Gobinet-Georges A, Valli N, Filliatre H, Dubernet MF, Dedeystere O, Bordenave L. Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human whole blood and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(6):519-23.
115. Buckley MG, Marcus NJ, Yacoub MH. Cardiac peptide stability, aprotinin and room temperature: importance for assessing cardiac function in clinical practice. *Clin Sci (Lond)* 1999;97(6):689-95.
116. Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human blood samples. *Clin Chim Acta* 1999;285(1-2):169-72.
117. Shimizu H, Aono K, Masuta K, Asada H, Misaki A, Teraoka H. Degradation of human brain natriuretic peptide (BNP) by contact activation of blood coagulation system. *Clin Chim Acta* 2001;305(1-2):181-6.
118. Jensen KT, Carstens J, Ivarsen P, Pedersen EB. A new, fast and reliable radioimmunoassay of brain natriuretic peptide in human plasma. Reference values in healthy subjects and in patients with different diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57(6):529-40.
119. Ationu A, Carter ND. Brain and atrial natriuretic peptide plasma concentrations in normal healthy children. *Br J Biomed Sci* 1993;50(2):92-5.
120. Yoshibayashi M, Kamiya T, Saito Y, Nakao K, Nishioka K, Temma S, et al. Plasma brain natriuretic peptide concentrations in healthy children from birth to adolescence: marked and rapid increase after birth. *Eur J Endocrinol* 1995;133(2):207-9.

121. Buckley MG, Markandu ND, Miller MA, Sagnella GA, MacGregor GA. Plasma concentrations and comparisons of brain and atrial natriuretic peptide in normal subjects and in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 1993;7(3):245-50.
122. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Bailey KR, Burnett JC, Jr. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(5):976-82.
123. Eriksson AS, Jarvinen AK, Eklund KK, Vuolteenaho OJ, Toivari MH, Nieminen MS. Effect of age and body weight on neurohumoral variables in healthy Cavalier King Charles spaniels. *Am J Vet Res* 2001;62(11):1818-24.
124. Yandle TG, Richards AM, Gilbert A, Fisher S, Holmes S, Espiner EA. Assay of brain natriuretic peptide (BNP) in human plasma: evidence for high molecular weight BNP as a major plasma component in heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76(4):832-8.
125. Ry SD, Clerico A, Giannessi D, Andreassi MG, Caprioli R, Iascone MR, et al. Measurement of brain natriuretic peptide in plasma samples and cardiac tissue extracts by means of an immunoradiometric assay method. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60(2):81-90.
126. Del Ry S, Giannessi D, Clerico A. Plasma brain natriuretic peptide measured by fully-automated immunoassay and by immunoradiometric assay compared. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(5):446-50.
127. Cowie MR, Mendez GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 2002;44(4):293-321.
128. McCullough PA, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, et al. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation* 2002;106(4):416-22.
129. Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(2):379-85.

130. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, et al. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347(3):161-7.
131. Maisel A. Primary results of the BNP Multinational Study. B-type Natriuretic Peptide in the Emergency Diagnosis of Heart Failure. In: 2002 Scientific Sessions of the American College of Cardiology; 2002 March 19, 2002; Atlanta, GA; 2002.
132. Ettinger S, Suter PF. The recognition of cardiac disease and congestive heart failure. In: Saunders W, editor. *Canine Cardiology*. Philadelphia; 1970. p. 215.
133. Lee SC, Stevens TL, Sandberg SM, Heublein DM, Nelson SM, Jougasaki M, et al. The potential of brain natriuretic peptide as a biomarker for New York Heart Association class during the outpatient treatment of heart failure. *J Card Fail* 2002;8(3):149-54.
134. Colucci WS, Packer M, Bristow MR. Carvedilol inhibits clinical progression in patients with mild symptoms of heart failure. *Circulation* 1996(94):2800-2806.
135. Friedl W, Mair J, Thomas S, Pichler M, Puschendorf B. Natriuretic peptides and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in asymptomatic and symptomatic left ventricular dysfunction. *Heart* 1996;76(2):129-36.
136. Daggubati S, Parks JR, Overton RM, Cintron G, Schocken DD, Vesely DL. Adrenomedullin, endothelin, neuropeptide Y, atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators. *Cardiovasc Res* 1997;36(2):246-55.
137. Luchner A, Burnett JC, Jr., Jougasaki M, Hense HW, Heid IM, Muders F, et al. Evaluation of brain natriuretic peptide as marker of left ventricular dysfunction and hypertrophy in the population. *J Hypertens* 2000;18(8):1121-8.
138. McClure SJ, Caruana L, Davie AP, Goldthorp S, McMurray JJ. Cohort study of plasma natriuretic peptides for identifying left ventricular systolic dysfunction in primary care. *Bmj* 1998;317(7157):516-9.

139. Nielsen OW, McDonagh TA, Robb SD, Dargie HJ. Retrospective analysis of the cost-effectiveness of using plasma brain natriuretic peptide in screening for left ventricular systolic dysfunction in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(1):113-20.
140. Valli N, Georges A, Corcuff JB, Barat JL, Bordenave L. Assessment of brain natriuretic peptide in patients with suspected heart failure: comparison with radionuclide ventriculography data. *Clin Chim Acta* 2001;306(1-2):19-26.
141. Yamamoto K, Burnett JC, Jr., Bermudez EA, Jougasaki M, Bailey KR, Redfield MM. Clinical criteria and biochemical markers for the detection of systolic dysfunction. *J Card Fail* 2000;6(3):194-200.
142. Yamamoto K, Burnett JC, Jr., Jougasaki M, Nishimura RA, Bailey KR, Saito Y, et al. Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* 1996;28(6):988-94.
143. Yamada Y, Goto J, Yokota M. Brain natriuretic peptide is a sensitive indicator of impaired left-ventricular function in elderly patients with cardiovascular disease. *Cardiology* 1997;88(5):401-7.
144. Maisel AS, Koon J, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Gardetto N, et al. Utility of B-natriuretic peptide as a rapid, point-of-care test for screening patients undergoing echocardiography to determine left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 2001;141(3):367-74.
145. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Hisanaga T, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J* 1998;135(5 Pt 1):825-32.
146. Krishnaswamy P, Lubien E, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Wanner E, et al. Utility of B-natriuretic peptide levels in identifying patients with left ventricular systolic or diastolic dysfunction. *Am J Med* 2001;111(4):274-9.
147. McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, et al. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet* 1998;351(9095):9-13.

148. Mizuno Y, Yoshimura M, Harada E, Nakayama M, Sakamoto T, Shimasaki Y, et al. Plasma levels of A- and B-type natriuretic peptides in patients with hypertrophic cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2000;86(9):1036-40, A11.
149. Choy AM, Darbar D, Lang CC, Pringle TH, McNeill GP, Kennedy NS, et al. Detection of left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction: comparison of clinical, echocardiographic, and neurohormonal methods. *Br Heart J* 1994;72(1):16-22.
150. Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Ikram H, Espiner EA, Turner JG, et al. Neuroendocrine prediction of left ventricular function and heart failure after acute myocardial infarction. The Christchurch Cardioendocrine Research Group. *Heart* 1999;81(2):114-20.
151. Inoue T, Sakuma M, Yaguchi I, Mizoguchi K, Uchida T, Takayanagi K, et al. Early recanalization and plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2002;143(5):790-6.
152. Bettencourt P, Ferreira A, Pardal-Oliveira N, Pereira M, Queiros C, Araujo V, et al. Clinical significance of brain natriuretic peptide in patients with postmyocardial infarction. *Clin Cardiol* 2000;23(12):921-7.
153. Suzuki T, Hayashi D, Yamazaki T, Mizuno T, Kanda Y, Komuro I, et al. Elevated B-type natriuretic peptide levels after anthracycline administration. *Am Heart J* 1998;136(2):362-3.
154. Nousiainen T, Vanninen E, Jantunen E, Puustinen J, Remes J, Rantala A, et al. Natriuretic peptides during the development of doxorubicin-induced left ventricular diastolic dysfunction. *J Intern Med* 2002;251(3):228-34.
155. Okumura H, Iuchi K, Yoshida T, Nakamura S, Takeshima M, Takamatsu H, et al. Brain natriuretic peptide is a predictor of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Haematol* 2000;104(4):158-63.
156. Mori K, Manabe T, Nii M, Hayabuchi Y, Kuroda Y, Tatara K. Plasma levels of natriuretic peptide and echocardiographic parameters in patients with Duchenne's progressive muscular dystrophy. *Pediatr Cardiol* 2002;23(2):160-6.

157. Ribeiro AL, dos Reis AM, Barros MV, de Sousa MR, Rocha AL, Perez AA, et al. Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagas' disease. *Lancet* 2002;360(9331):461-2.
158. Kawamura T, Wago M. Brain natriuretic peptide can be a useful biochemical marker for myocarditis in patients with Kawasaki disease. *Cardiol Young* 2002;12(2):153-8.
159. Brookes CI, Kemp MW, Hooper J, Oldershaw PJ, Moat NE. Plasma brain natriuretic peptide concentrations in patients with chronic mitral regurgitation. *J Heart Valve Dis* 1997;6(6):608-12.
160. Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, et al. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. *Circulation* 2002;105(5):595-601.
161. Yu CM, Sanderson JE, Shum IO, Chan S, Yeung LY, Hung YT, et al. Diastolic dysfunction and natriuretic peptides in systolic heart failure. Higher ANP and BNP levels are associated with the restrictive filling pattern. *Eur Heart J* 1996;17(11):1694-702.
162. Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Murakawa K, Yasunari K, Akioka K, et al. Brain natriuretic peptide as a cardiac hormone in essential hypertension. *Am J Med* 1992;92(1):29-34.
163. Suzuki M, Yamamoto K, Watanabe S, Iwata T, Hamada M, Hiwada K. Association between elevated brain natriuretic peptide levels and the development of left ventricular hypertrophy in patients with hypertension. *Am J Med* 2000;108(8):627-33.
164. Cheung BM. Plasma concentration of brain natriuretic peptide is related to diastolic function in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997;24(12):966-8.
165. Bettencourt P, Ferreira A, Sousa T, Ribeiro L, Brandao F, Polonia J, et al. Brain natriuretic peptide as a marker of cardiac involvement in hypertension. *Int J Cardiol* 1999;69(2):169-77.

166. Bando M, Ishii Y, Sugiyama Y, Kitamura S. Elevated plasma brain natriuretic peptide levels in chronic respiratory failure with cor pulmonale. *Respir Med* 1999;93(7):507-14.
167. Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, et al. Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998;31(1):202-8.
168. Sumida H, Yasue H, Yoshimura M, Okumura K, Ogawa H, Kugiyama K, et al. Comparison of secretion pattern between A-type and B-type natriuretic peptides in patients with old myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1995;25(5):1105-10.
169. Morita E, Yasue H, Yoshimura M, Ogawa H, Jougasaki M, Matsumura T, et al. Increased plasma levels of brain natriuretic peptide in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1993;88(1):82-91.
170. Nagaya N, Goto Y, Nishikimi T, Uematsu M, Miyao Y, Kobayashi Y, et al. Sustained elevation of plasma brain natriuretic peptide levels associated with progressive ventricular remodelling after acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 1999;96(2):129-36.
171. Hirayama A, Yamamoto H, Sakata Y, Asakura M, Fuji H, Ishikura F, et al. Usefulness of plasma brain natriuretic peptide after acute myocardial infarction in predicting left ventricular dilatation six months later. *Am J Cardiol* 2001;88(8):890-3, A8.
172. Kikuta K, Yasue H, Yoshimura M, Morita E, Sumida H, Kato H, et al. Increased plasma levels of B-type natriuretic peptide in patients with unstable angina. *Am Heart J* 1996;132(1 Pt 1):101-7.
173. Omland T, Persson A, Ng L, O'Brien R, Karlsson T, Herlitz J, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;106(23):2913-8.
174. Bettencourt P, Ferreira A, Dias P, Pimenta J, Frioies F, Martins L, et al. Predictors of prognosis in patients with stable mild to moderate heart failure. *J Card Fail* 2000;6(4):306-13.

175. Cheng V, Kazanagra R, Garcia A, Lenert L, Krishnaswamy P, Gardetto N, et al. A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(2):386-91.
176. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, et al. High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(5):1587-93.
177. Ishii J, Nomura M, Ito M, Naruse H, Mori Y, Wang JH, et al. Plasma concentration of brain natriuretic peptide as a biochemical marker for the evaluation of right ventricular overload and mortality in chronic respiratory disease. *Clin Chim Acta* 2000;301(1-2):19-30.
178. Liu ZL, Wiedmeyer CE, Sisson DD, Solter PF. Cloning and characterization of feline brain natriuretic peptide. *Gene* 2002;292(1-2):183-90.
179. Moe GW, Grima EA, Wong NL, Howard RJ, Armstrong PW. Dual natriuretic peptide system in experimental heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(3):891-8.
180. Asano K, Masuda K, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J Vet Med Sci* 1999;61(5):523-9.
181. Tessier D, Derumeaux G, Escriou C, Carlos C, Carayon A, Pouchelon J-L, et al. Detection of asymptomatic myocardial alterations by natriuretic peptides in a dog model of dilated cardiomyopathy. In: 27th World Small Animal Veterinary Association Congress; 2002 3-6 october 2002; Granada 2002; 2002.
182. MacDonald KA, Kittleson MD, Munro C, Kass P. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2003;17(2):172-7.
183. Sisson DD. The Diagnostic Potential of Natriuretic Peptides in Heart Failure. *Journal of Veterinary Cardiology* 2000;2(1):5-7.

184. Struthers A. Natriuretic Peptides in congestive heart failure - more than just markers. Coats: Churchill Livingstone; 1997.133-146
185. Hobbs RE, Miller LW, Bott-Silverman C, James KB, Rincon G, Grossbard EB. Hemodynamic effects of a single intravenous injection of synthetic human brain natriuretic peptide in patients with heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1996;78(8):896-901.
186. Chen HH, Grantham JA, Schirger JA, Jougasaki M, Redfield MM, Burnett JC, Jr. Subcutaneous administration of brain natriuretic peptide in experimental heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(5):1706-12.
187. Richards AM, Crozier IG, Holmes SJ, Espiner EA, Yandle TG, Frampton C. Brain natriuretic peptide: natriuretic and endocrine effects in essential hypertension. *J Hypertens* 1993;11(2):163-70.
188. Cargill RI, Lipworth BJ. Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cor pulmonale. Hemodynamic and endocrine effects. *Chest* 1996;110(5):1220-5.
189. Lang CC, Motwani J, Coutie WJ, Struthers AD. Influence of candoxatril on plasma brain natriuretic peptide in heart failure. *Lancet* 1991;338(8761):255.
190. Bevan EG, Connell JM, Doyle J, Carmichael HA, Davies DL, Lorimer AR, et al. Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension. *J Hypertens* 1992;10(7):607-13.
191. Favrat B, Burnier M, Nussberger J, Lecomte JM, Brouard R, Waeber B, et al. Neutral endopeptidase versus angiotensin converting enzyme inhibition in essential hypertension. *J Hypertens* 1995;13(7):797-804.
192. Weber MA. Vasopeptidase inhibitors. *Lancet* 2001;358(9292):1525-32.

193. Cataliotti A, Boerrigter G, Chen HH, Jougasaki M, Costello LC, Tsuruda T, et al. Differential actions of vasopeptidase inhibition versus angiotensin-converting enzyme inhibition on diuretic therapy in experimental congestive heart failure. *Circulation* 2002;105(5):639-44.
194. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM. Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 2000;355(9210):1126-30.
195. Murdoch DR, McDonagh TA, Byrne J, Blue L, Farmer R, Morton JJ, et al. Titration of vasodilator therapy in chronic heart failure according to plasma brain natriuretic peptide concentration: randomized comparison of the hemodynamic and neuroendocrine effects of tailored versus empirical therapy. *Am Heart J* 1999;138(6 Pt 1):1126-32.
196. Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Yasunari K, Ikeda M, Minami M, et al. Brain natriuretic peptide as a marker for hypertensive left ventricular hypertrophy: changes during 1-year antihypertensive therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am J Med* 1995;98(3):257-65.
197. Mizuno Y, Yasue H, Oshima S, Yoshimura M, Ogawa H, Morita E, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor on plasma B-type natriuretic peptide levels in patients with acute myocardial infarction. *J Card Fail* 1997;3(4):287-93.
198. Luchner A, Burnett JC, Jr., Jougasaki M, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H. Augmentation of the cardiac natriuretic peptides by beta-receptor antagonism: evidence from a population-based study. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(7):1839-44.
199. Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, Macmahon S, Ikram H, Sharpe N, et al. Neurohumoral prediction of benefit from carvedilol in ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *Circulation* 1999;99(6):786-92.
200. Lombard CW. Normal values of the canine M-mode echocardiogram. *Am J Vet Res* 1984;45(10):2015-8.

201. Validation of analytical methods: Methodology. In: International Conference on Harmonisation (ICH); 1996; Washington; 1996.
202. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991;16(4):249-55.
203. Peters FT, Mauerer HH. Bioanalytical method validation - how, how much and why? *Toxicchem + Krimtech* 2001;68(3):116-126.
204. Sha V. Guidance for Industry, Bioanalytical methods validation for human studies. Rockville, USA: Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services; 1998 14.12.1998.
205. Vollmar AM, Preußner U, Gülberg V, Reusch C. Endothelin-1 und Endothelin-3 im Plasma des Hundes. *Tierärztliche Praxis* 1993;21:63-6.
206. Karnes HT, Shiu G, Shah VP. Validation of bioanalytical methods. *Pharm Res* 1991;8(4):421-6.
207. Vollmar AM.
208. Shah VP. Draft Guidance, Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. Rockville, USA: Center for Drug Evaluation and Research; 1998 December 1998.
209. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 1998;17(2):193-218.
210. Sagnella GA. Measurement and importance of plasma brain natriuretic peptide and related peptides. *Ann Clin Biochem* 2001;38(Pt 2):83-93.
211. Nageh T, Chin D, Cooke JC, Meehan N, Monaghan MJ, Sherwood RA. Interpretation of plasma brain natriuretic peptide concentrations may require adjustment for patient's age. *Ann Clin Biochem* 2002;39(Pt 2):151-3.

212. Maffei S, Clerico A, Iervasi G, Nannipieri M, Del Ry S, Giannessi D, et al. Circulating levels of cardiac natriuretic hormones measured in women during menstrual cycle. *J Endocrinol Invest* 1999;22(1):1-5.

213. Boffin U. *Erweiterte Möglichkeiten der Referenzbereichsschätzungen*. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 1993.

214. Nishida Y, Morita H, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hosomi H. Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs. *Jpn J Physiol* 1990;40(4):531-40.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. J. Hirschberger möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Thema sowie der stets gewährten Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Herrn Universitätsprof. Dr. H. Ammer des Institutes für Pharmakologie möchte ich ganz besonders für die durchgehende fachliche Beratung, Unterstützung und Überlassung eines Laborplatzes danken.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der I. Medizinischen Tierklinik für die Mithilfe bei der Gewinnung der Proben.

Ferner bedanke ich mich bei den Mitarbeitern Tobias Krieger und Susanne Stampf des statistischen Beratungslabors der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Hilfe bei der statistischen Auswertung, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. habil. K. Osterkorn aus der Abteilung für Biometrie des Institutes für Tierzucht und Tierhygiene.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Tom Schafhauser für die Betreuung und Durchsicht der Arbeit danken.

Meinen Freundinnen Regi und Tina und meinem Vater möchte ich für die kritische Durchsicht der Arbeit und die moralische Unterstützung ganz herzlich danken.

Zuletzt danke ich Natalie für unseren Zusammenhalt und die Erstellung von vielen Listen.

LEBENS LAUF

Name: Katrin Tietgen
Geburtsdatum: 07.04.1974
Geburtsort: Wolfratshausen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Inge Tietgen, geb. Fröhlich, Sekretärin
Dr. Uwe Tietgen, Notar

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule Eschenbach
1984-1989 Gymnasium Eschenbach
1989-1993 Käthe Kollwitz Gymnasium, München
Juni 1993 Abitur

Universitätsausbildung:

Oktober 1994-August 2000 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
7. Fachsemester (WS 1997/1998) Studium an der Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Frankreich

Approbation:

21. August 2000

Tierärztliche Tätigkeit:

Januar 2000 bis Juni 2001 Doktorandin an der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
Juni 2001 bis Oktober 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität

Sprachen:

Englisch	sehr gute Kenntnisse
Französisch	sehr gute Kenntnisse
Italienisch	gute Kenntnisse, Sprachdiplom Firenze

Hobbies:

Lesen, Skifahren, Klettern