

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**NT-proBNP zur Unterscheidung kardialer  
und respiratorischer Ursachen für Husten  
oder Dyspnoe beim Hund**

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

von Nicole Astrid Gabriele Timper

geb. Schneider

aus München

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 8. Februar 2014

**Meiner Großmutter Genoveva †**

## INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG .....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT .....	2
1.	Natriuretische Peptide .....	2
1.1.	Die Peptide .....	2
1.1.1.	Atriales Natriuretisches Peptid.....	3
1.1.2.	Urodilatin.....	3
1.1.3.	B-Typ Natriuretisches Peptid.....	4
1.1.4.	C-Typ Natriuretisches Peptid.....	5
1.1.5.	D-Typ Natriuretisches Peptid.....	6
1.1.6.	Ventrikuläres Natriuretisches Peptid.....	6
1.1.7.	Guanylin, Uroguanylin.....	7
1.2.	Bildung und Sekretion der von BNP und NT-proBNP .....	7
1.3.	Natriuretische Peptid Rezeptoren und Neutrale Endopeptidase.....	9
1.3.1.	Natriuretischer Peptid-Rezeptor-A.....	9
1.3.2.	Natriuretischer Peptid-Rezeptor-B.....	9
1.3.3.	Natriuretischer Peptid-Rezeptor-C.....	10
1.3.4.	Natriuretischer Peptid-Rezeptor-D.....	10
1.3.5.	Neutrale Endopeptidase (NEP 24.11) .....	11
1.4.	Abbau von BNP und NT-proBNP.....	11
1.5.	Physiologie .....	12
2.	Natriuretische Peptide in der Humanmedizin.....	14
2.1.	BNP und NT-proBNP in der Diagnostik .....	15
2.2.	BNP und NT-proBNP in der Prognostik.....	18
2.3.	BNP und NT-proBNP in der Therapie.....	19
2.3.1.	Einstellen der Therapie anhand von BNP- und NT-proBNP-Werten.....	19
2.3.2.	Verabreichung von BNP als Therapie.....	20
3.	Natriuretische Peptide in der Veterinärmedizin .....	21
3.1.	Messung von BNP und NT-proBNP beim Hund .....	21
3.1.1.	BNP .....	22
3.1.2.	NT-proBNP .....	24
3.2.	Messung von BNP und NT-proBNP bei der Katze .....	31

<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
1.	<b>Patientengut.....</b>	<b>33</b>
2.	<b>Einschlusskriterien.....</b>	<b>33</b>
3.	<b>Ausschlusskriterien .....</b>	<b>33</b>
4.	<b>Untersuchungen.....</b>	<b>33</b>
4.1.	Anamnese .....	34
4.2.	Klinische Untersuchung .....	34
4.3.	Laborparameter .....	34
4.4.	Röntgen des Thorax in zwei Ebenen.....	34
4.5.	Echokardiographie .....	34
4.5.1.	Allgemeines.....	34
4.5.2.	2D-Ultraschall .....	35
4.5.3.	M-Mode-Echokardiographie .....	36
4.5.4.	Dopplerechokardiographie .....	36
5.	<b>Messung von NT-proBNP.....</b>	<b>36</b>
5.1.	Blutprobenentnahme .....	36
5.2.	Blutprobenverarbeitung.....	37
5.3.	Testprinzip.....	37
5.4.	Testdurchführung .....	38
5.5.	Berechnung der NT-proBNP-Konzentration .....	39
6.	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>39</b>
6.1.	Einflussfaktoren .....	40
6.2.	Vergleich der verschiedenen Gruppen .....	40
6.3.	Berechnung von Cut-off-Werten.....	40
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>41</b>
1.	<b>Patientencharakterisierung .....</b>	<b>41</b>
2.	<b>NT-proBNP .....</b>	<b>43</b>
2.1.	Einflussfaktoren .....	43
2.2.	Vergleich kardiale <i>versus</i> respiratorische Dyspnoe .....	44
2.3.	Cut-off .....	46
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>48</b>

<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>57</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>59</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>61</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>82</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
Ao	Durchmesser der Aortenwurzel
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AS	Aminosäure(n)
AUC	Area Under the Curve
BNP	B-Typ Natriuretisches Peptid
°C	Grad Celsius
CD-NP	Chimeric designed Natriuretisches Peptid
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CHF	Congestive Heart Failure = kongestives Herzversagen
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CNP	C-Typ Natriuretisches Peptid
cTn	kardiales Troponin
CW	Continuous-Wave
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNP	D-Typ Natriuretisches Peptid
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase-IV

ECVIM	European College of Veterinary Internal Medicine
EDTA	Ethylenediamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
fmol/l	Femtomol pro Liter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
kg	Kilogramm
LA	Linkes Atrium
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LV	Linker Ventrikel
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEDDN	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser genormt nach Körpergewicht
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVh	Linker Vorhof
µl	Mikroliter
µmol/l	Mirkomol pro Liter
Max.	Maximum
MHz	Megahertz
Min.	Minimum
ml	Milliliter
M-Mode	Motion-Mode
mmol/l	Millimol pro Liter

mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEP	Neutrale Endopeptidase
nm	Nanometer
NPPA	Natriuretic Peptid Precursor A
NPPB	Natriuretic Peptid Precursor B
NPR	Natriuretischer Peptid Rezeptor
NPRs	Natriuretische Peptid Rezeptoren
NPV	Negativer Prädiktiver Wert
NT-proANP	N-terminales Atriales Natriuretisches Peptid
NT-proBNP	N-terminales B-Typ Natriuretische Peptid
NYHA	New York Heart Association
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus Botalli
pg/ml	Picogramm pro Milliliter
pmol/l	Picomol pro Liter
PPV	Positiver Prädiktiver Wert
PW	Pulse-Wave
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RIA	Radioimmunoassay
ROC	Receiver Operating Characteristic
SA	Standardabweichung
SPSS®	Statistical Package for the Social Science
TMB	Tetramethylbenzidin
VES	Ventrikuläre Extrasystole

---

VHS	Vertebral Heart Score
VNP	Ventrikuläres Natriuretisches Peptid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## I. EINLEITUNG

Der Hund mit Dyspnoe oder Husten stellt in der täglichen Praxis oft eine große Herausforderung dar. Häufig ist nicht klar, ob die Symptomatik kardial oder respiratorisch bedingt ist. Bislang sind bei unklaren Fällen die Echokardiographie und das Röntgen des Thorax der diagnostische Standard zur Abklärung. Jedoch sind die Patienten mit Atemnot oft sehr instabil und die Lagerung zur Untersuchung kann schon lebensbedrohend sein. Außerdem ist es wichtig bei solchen Patienten eine schnelle Diagnose zu bekommen, um frühzeitig Entscheidungen bezüglich der weiteren Diagnostik und Therapie treffen zu können. N-terminales B-Typ Natriuretisches Peptid (NT-proBNP) ist bei Patienten mit Herzkrankheiten erhöht. Es entsteht bei der Bildung von BNP, ist biologisch inaktiv, deshalb stabiler als BNP und somit leichter zu messen. In der Humanmedizin wird die Messung dieses Peptides schon seit längerer Zeit standardmäßig zur Abklärung von Patienten mit Atemnot verwendet (MAISEL et al., 2002; McCULLOUGH et al., 2002; JANUZZI et al., 2006a).

Ziel dieser prospektiven Studie war es herauszufinden, wie hoch die NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit respiratorischen Ursachen für Dyspnoe oder Husten ist und ob NT-proBNP zur Unterscheidung von kardialen und respiratorischen Ursachen von Dyspnoe oder Husten verwendet werden kann. Mittels eines ELISA (VETSIGN Canine CardioSCREEN NT-proBNP, Guildhay Ltd, UK) wurde die NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit Dyspnoe oder Husten gemessen. Es wurde außerdem ein Cut-off-Wert zur Unterscheidung respiratorischer und kardialer Ursachen für Atemnot beim Hund ermittelt.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Natriuretische Peptide

Bei den Natriuretischen Peptiden handelt es sich um eine Gruppe phylogenetisch, funktionell und strukturell ähnlicher Peptide, deren wichtigste Funktion die Regulierung des Flüssigkeitshaushaltes des Körpers bei Säugetieren ist. Alle Peptide dieser Gruppe besitzen einen Ring aus 17 Aminosäuren mit einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten (NAKAO et al., 1992a). Die Ringstruktur weist zwischen den verschiedenen Natriuretischen Peptiden eine hohe Homologie auf und ist essentiell für deren Bindung an Rezeptoren und für die biologische Wirkung (HIRATA et al., 1988; FURUYA et al., 1992). Alle Natriuretischen Peptide haben ein unterschiedlich langes aminoterminales Ende. Ausser den Isoformen von C-Typ Natriuretischem Peptid (CNP) besitzen sie außerdem einen carboxyterminalen Rest, welcher ebenfalls in der Länge variiert (TAKEI et al., 2007). Alle Peptide kommen auch als Prohormone mit einem höheren Molekulargewicht vor. Die Gene für diese Vorläufer-Peptide von Atrialem Natriuretischem Peptid (ANP) und B-Typ Natriuretischem Peptid (BNP) liegen beim Menschen in Tandemformation auf dem distalen kurzen Arm des Chromosom 1, für CNP auf Chromosom 2 (TAMURA et al., 1996). Die Transkription dieser Gene wird durch herzspezifische Genregulatoren gesteuert. (CHARRON et al., 1999).

#### 1.1. Die Peptide

Inzwischen ist es allgemein anerkannt, dass das Herz nicht nur als mechanische Pumpe arbeitet, sondern auch eine Funktion als endokrines Organ hat. Vor etwa 50 Jahren wurde dies bereits vermutet, nachdem festgestellt wurde, dass bei einer experimentellen Dilatation des Atriums des Herzens von Hunden eine vermehrte Urinausscheidung auftrat (HENRY & PEARCE, 1956a, HENRY et al., 1956b). Bereits in der Anfangszeit der Elektronenmikroskopie wurden „spezifische atriale Granula“ in den Myozyten der Atrien entdeckt, welche Merkmale von endokrinen Zellen aufweisen (KISCH, 1956a, 1956b; JAMIESON & PALADE, 1964).

### **1.1.1. Atriales Natriuretisches Peptid**

1981 stellten DE BOLD und Mitarbeiter fest, dass die Injektion von Extrakten aus den Myozyten des Atriums bei Ratten zu einer signifikanten Diurese und Natriurese führt. Diese Beobachtung war eine Demonstration der endokrinen Aktivität der Atrien und bewies die Existenz eines hormonellen „atrial natriuretic factor“ (ANF) (DE BOLD et al., 1981). Es folgte die Isolierung und Sequenzierung dieses Polypeptidhormons, welches heute als Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) bekannt ist (FLYNN et al., 1983; CURRIE et al., 1984; KANGAWA et al., 1984; MISONO et al., 1984).

ANP wird bei gesunden Säugetieren hauptsächlich von den Myozyten der Atrien produziert und freigesetzt. Die Ventrikel des gesunden Herzens produzieren nur geringe Mengen ANP. Bei Volumenüberlastung, Hypertrophie der Ventrikel und im ventrikulären Gewebe von Feten und Neugeborenen ist die Produktion stark erhöht (DE BOLD et al., 1981; SAITO et al., 1989; LEVIN et al., 1998). Physiologischerweise ist die Plasmakonzentration von zirkulierendem ANP relativ niedrig (10 fmol/ml). Bei Menschen mit kongestivem Herzversagen ist die Konzentration jedoch um das zehn- bis dreißigfache erhöht (BURNETT et al., 1986; CODY et al., 1986). Stimuliert wird die vermehrte Freisetzung durch eine Volumenüberlastung und die daraus resultierende erhöhte Wandspannung (LANG et al., 1985; BILDER et al., 1986, EDWARDS et al., 1988; RUSKOAHIO, 1992). Das Gen für ANP wird als Natriuretic Peptid Precursor A (NPPA) bezeichnet. Es besteht aus drei Exons sowie zwei Introns, und die Sequenz ist unter den Spezies hoch konserviert. ANP unterscheidet sich bei Mensch und Ratte nur durch eine Aminosäure an Position zwölf. Die zirkulierende Form von ANP ist bei Mensch, Schimpanse, Hund, Schwein, Pferd und Schaf identisch (NCBI Homologene Database).

Die Plasmahalbwertszeit von ANP beim Menschen wird mit ungefähr zwei Minuten (NAKAO et al., 1986; YANDLE et al., 1986), bzw. ein bis drei Minuten angegeben (RUSKOAHIO, 1992; ESPINER et al., 1995).

### **1.1.2. Urodilatin**

1988 wurde aus humanem Urin ein dem ANP strukturell sehr ähnliches Peptid extrahiert und als Urodilatin bezeichnet (SCHULZ-KNAPPE et al., 1988).

Urodilatin entsteht durch alternative Spaltung von proANP in den Zellen der distalen Tubuli der Nieren und besitzt ein um vier Aminosäuren längeres

aminoterminales Ende als ANP (SCHULZ-KNAPPE et al., 1988, RITTER et al., 1992). Urodilatin wirkt lokal in der Niere auf die Regulation der Natrium- und Wasserreabsorption (FORSSMANN, 1986; FORSSMANN et al., 1998; ZEIDEL, 1995).

### **1.1.3. B-Typ Natriuretisches Peptid**

Ebenfalls im Jahr 1988 isolierten SUDOH und Mitarbeiter ein dem ANP in der Struktur homologes Polypeptid aus dem Gehirn von Schweinen, welches entsprechend dem Fundort als „Brain Natriuretic Peptide“ (BNP) bezeichnet wurde (SUDOH et al., 1988). Auch dieses Peptid wies natriuretische und diuretische Eigenschaften auf. Es konnte bald nachgewiesen werden, dass auch in den Atrien der Herzen von Schweinen BNP exprimiert wird (MINAMINO et al., 1988a, 1988b). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die kardialen Ventrikel bei Säugetieren den Hauptursprungsort von zirkulierendem BNP darstellen (SUDOH et al., 1988; MUKOYAMA et al., 1990, 1991).

Das Gen, welches humanes BNP kodiert, wird als Natriuretic Peptid Precursor B (NPPB) bezeichnet und ist wie NPPA auf Chromosom 1 lokalisiert. Es besteht wie das NPPA aus drei Exons und zwei Introns (OGAWA et al., 1994). BNP entsteht aus dem Vorläufer präproBNP, welches beim Menschen aus 134 Aminosäuren (AS) besteht. Im Gegensatz zu präproANP, welches eine starke Homologie innerhalb der Spezies aufweist, zeigt die Sequenz von präproBNP bei Säugetieren nur am amino- und carboxyterminalen Ende eine starke Homologie. So beträgt zum Beispiel die Homologie von kaninem und humanem präproBNP nur 53 %, im Gegensatz zu 85 % bei präproANP. Durch diese geringe Homologie kommt es zu unterschiedlichen Längen des aktiven BNP bei den verschiedenen Spezies (Mensch und Schwein: 32 AS, Ratten und Mäuse: 45 AS) (POTTER et al., 2009).

Im Kreislauf zirkulieren das biologisch aktive BNP (Mensch 32 AS) und der N-terminale inaktive Anteil, das N-terminale-proBNP (NT-proBNP) (Mensch 76 AS) (HUNT et al., 1995). Die Konzentrationen von NT-proBNP und BNP können durch Immunoassays gemessen werden. Die Messung der Konzentration von NT-proBNP wurde erstmals 1995 von HUNT und Mitarbeitern durchgeführt. Auch andere Arbeitsgruppen entwickelten verschiedene Messmethoden (SCHULZ et al., 2001; GOETZE et al., 2002; HUGHES et al., 1999).

Nur geringe Mengen von intaktem proBNP und dessen Spaltungsprodukte sind

mit ANP in den sekretorischen Granula der Atrien gespeichert. Die Myozyten der Ventrikel bilden unter physiologischen Bedingungen keine Granula und enthalten somit auch kein BNP (HASEGAWA et al., 1993; CHRISTOFFERSEN et al., 2002). Bei Herzkrankheiten können jedoch auch in den Ventrikeln sekretorische Granula und BNP nachgewiesen werden (HASEGAWA et al., 1993; NICOLAU et al., 1997; TAKEMURA et al., 1998). Dies bedeutet, dass BNP unter pathologischen Bedingungen vor allem in den Ventrikeln gebildet wird. Die Regulierung von Synthese und Freisetzung von BNP erfolgt auf Ebene der Genexpression. Die Konzentration von BNP reagiert somit nicht auf akute Stimuli (YOSHIMURA et al., 1993; LEVIN et al., 1998). Erst in Reaktion auf dauerhafte Belastungen des Herzens, wie zum Beispiel eine chronische Volumenüberlastung kommt es zu einer vermehrten Transkription. Auch kardiale Fibroblasten können BNP produzieren und freisetzen (TSURUDA et al., 2002). Die Endothelzellen der koronaren Gefäße exprimieren ebenfalls das BNP-Gen, vor allem bei koronarer Atherosklerose (CASCO et al., 2002). Bei gesunden Menschen ist die Konzentration von BNP im Plasma sehr niedrig (1 fmol/l), bei kongestivem Herzversagen kommt es jedoch zu einer starken Erhöhung der Konzentration (MUKOYAMA et al., 1990, 1991). Auch die Konzentration von NT-proBNP steigt bei Herzversagen signifikant an, sogar in stärkerem Ausmaß als BNP (HUNT et al., 1995).

Im Vergleich zu ANP hat BNP beim Menschen eine längere Halbwertszeit von 20 Minuten (MUKOYAMA et al., 1990, 1991). NT-proBNP hat eine Halbwertszeit von 60 – 120 Minuten (HUNT et al., 1997; DOWNIE et al., 1999).

#### **1.1.4. C-Typ Natriuretisches Peptid**

CNP wurde wie BNP zunächst im Gehirn von Schweinen entdeckt und daraufhin sequenziert (SUDOH et al., 1990). Es zeigte sich, dass CNP nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern unter anderem auch in den Zellen des Gefäßendotheliums synthetisiert wird (KOMATSU et al., 1991; SUGA et al., 1992; BARR et al., 1996). Die Plasmakonzentration bei gesunden Individuen ist niedrig, steigt aber bei kongestivem Herzversagen an, jedoch zu einem geringeren Grad als ANP und BNP (KALRA et al., 2003; DEL RY et al., 2005; CHARLES et al., 2006).

Das humane Gen für präproCNP liegt auf Chromosom 2 und besteht aus zwei Exons und einem Intron (OGAWA et al., 1994). PräproCNP zeigt eine

bemerkenswerte Homologie innerhalb der Spezies, sogar stärker als die von präproANP.

CNP spielt vor allem eine Rolle in der Regulierung der Gefäßspannung, es wirkt stark vasorelaxierend und hemmt die Proliferation der Gefäßmuskulatur sowie die Migration der Endothelzellen. Es wird außerdem eine Funktion als parakriner Neurotransmitter im ZNS vermutet. CNP hemmt die Aktivierung von Fibroblasten in einem größeren Ausmaß als ANP und BNP, aber ihm fehlen spezielle natriuretische oder diuretische Eigenschaften. Es spielt außerdem eine Rolle bei der endochondralen Ossifikation, der endokrinen Funktion der Hoden, der Spermatogenese und bei plazentalen Funktionen während der Schwangerschaft (CARVAJAL et al., 2001; EL-GEHANI et al., 2001; WALTHER & STEPAN, 2004).

Die Plasmahalbwertszeit von CNP beträgt 2,6 Minuten (HUNT et al., 1994).

### **1.1.5. D-Typ Natriureisches Peptid**

SCHWEITZ und Mitarbeiter isolierten 1992 D-Typ Natriureisches Peptid (DNP) aus dem Gift der Grünen Mamba (*Dendroaspis agusticeps*) und sequenzierten das Peptid. DNP besteht aus 38 Aminosäuren, ähnelt den humanen natriuretischen Peptiden ANP und BNP, unterscheidet sich aber von diesen in der Struktur der carboxy- und aminoterminalen Regionen (SCHWEITZ et al., 1992). Obwohl seine Funktion bisher nicht bekannt ist, scheint sein vasorelaxierender Effekt zu einer schnelleren Aufnahme des neurotoxischen Gifts der Grünen Mamba zu führen. Manche Autoren vermuten, dass DNP ein primitives, ursprüngliches Natriureisches Peptid ist und es somit eine evolutionäre Vorstufe von ANP und BNP darstellt (RICHARDS et al., 2002). Es wurde ein „DNP-ähnliches“ Peptid aus humanem Plasma und den Atrien isoliert. Spezifische Antiseren gegen DNP lösen eine messbare Immunoreaktivität im menschlichen Herzen aus, wobei gezeigt wurde, dass die zirkulierenden Mengen des DNP-ähnlichen Peptides mit der Schwere eines Herzversagens beim Menschen korrelieren. Ein Einsatz in der Therapie wird derzeit untersucht (SCHIRGER et al., 1999; LISY et al., 2001; SINGH et al., 2006).

### **1.1.6. Ventrikuläres Natriureisches Peptid**

Ventrikuläres Natriureisches Peptid (VNP) wurde aus den kardialen Ventrikeln von Aalen isoliert entspricht am ehesten dem BNP bei Vertebraten (TAKEI et al.,

1991, TAKEI, 2000). Es spielt eine wichtige Rolle im Flüssigkeitshaushalt von primitiven Knochenfischen wie Aalen oder Lachsen und wird in deren Herzen in großen Mengen produziert. Es wird bei diesen Spezies in großen Mengen benötigt, da die Aufrechterhaltung des Salz- und Flüssigkeitshaushaltes bei Fischen schwieriger ist als bei den meisten landlebenden Lebewesen. VNP existiert gemeinsam mit BNP, ANP und/oder CNP und hat ein carboxyterminales Ende aus 14 Aminosäuren und eine hohe Affinität für den Natriuretischen Peptidrezeptor A (NPR-A) und NPR-C (TAKEI et al., 2007).

### **1.1.7. Guanylin, Uroguanylin**

In der Mukosa des Gastrointestinaltrakts von Säugetieren werden außerdem die beiden intestinalen Natriuretischen Peptide Guanylin und Uroguanylin gebildet. Dabei handelt es sich um Peptide aus 15 bzw. 16 Aminosäuren, die den Salz- und Wassertransport über die intestinale Mukosa regulieren und die intestinale Absorption sowie die anschließende renale Exkretion von Natrium koordinieren können (GREENBERG et al., 1997). Die Plasmakonzentrationen der Präkursorproteine Proguanylin und Prouroguanylin sind bei Menschen mit Herzversagen erhöht (NARAYAN et al., 2010).

## **1.2. Bildung und Sekretion von BNP und NT-proBNP**

Alle Natriuretischen Peptide werden als hochmolekulare Präkursor-Proteine synthetisiert, die anschließend intrazellulär modifiziert werden.

Es gibt klare Unterschiede zwischen ANP und BNP in Bezug auf deren intrazelluläre Speicherung und Sekretionsmechanismen. ANP wird in atrialen Granula gespeichert. Bei einer erhöhten atrialen Wandspannung kommt es zu einer sofortigen Freisetzung von ANP-verwandten Peptiden. Das ANP-Gen kann nur sehr langsam aktiviert werden, es dauert also einige Zeit, bis es zu einer de novo Synthese des Peptides kommt. Im Gegensatz hierzu wird (NT-pro)BNP nur in kleinen Mengen in Granula gespeichert und eine vermehrte Sekretion hängt von einer Stimulation des BNP-Gens ab, welche jedoch im Vergleich zum ANP-Gen sehr schnell geschieht (MÄNTYMAA et al., 1993).

Unter physiologischen Bedingungen sind die Atrien der Hauptbildungsort von ANP und BNP (HASEGAWA et al., 1993). Bei chronischer Dehnung der Myozyten, wie z. B. bei chronischem Herzversagen, wird jedoch die ventrikuläre

Produktion hochreguliert, insbesondere für BNP (MUKOYAMA et al., 1991; LUCHNER et al., 1998; HYSTAD et al., 2001).

Die Translation des BNP-Gens wird durch mehrere Stimuli ausgelöst. Am wichtigsten hierbei ist eine mechanische Dehnung der Kardiomyozyten durch eine Volumen- oder Drucküberladung (MAGGA et al., 1994; LAPOINTE, 2005). Des Weiteren bewirken auch ischämische Schäden, eine Hypoxie, Endothelin-I, Angiotensin-II, Interleukine und adrenerge Agonisten eine vermehrte Transkription des BNP-Gens (LAPOINTE, 2005).

Nach Translation des BNP-Gens kommt es zur Produktion von PräproBNP<sub>1-134</sub> (beim Menschen bestehend aus 134 AS, bei der Katze aus 132 AS) (MARTINEZ-RUMAYOR et al., 2008), welches am aminoterminalen (N-terminalen) Ende ein 26 Aminosäuren langes Signalpeptid trägt. Durch schnelle Abspaltung dieses Signalpeptides im sarkoplasmatischen Retikulum entsteht der Prækursor proBNP<sub>1-108</sub> (beim Menschen 108 AS, bei der Katze 106 AS) (SUDOH et al., 1988). Durch das proteolytische Enzym Corin, welches im Myokardium exprimiert (HOOPER et al., 2000; YAN et al., 2000), oder durch Furin (HUNT et al., 1997; SAWADA et al., 1997), welches ubiquitär in verschiedenen Geweben und im Serum ausgeschüttet wird, wird proBNP<sub>1-108</sub> anschließend in zwei Teile gespalten, den biologisch inaktiven 76 Aminosäuren langen aminoterminalen Teil NT-proBNP<sub>1-76</sub> und das biologisch aktive 32 Aminosäuren lange Molekül BNP<sub>1-32</sub>. Befindet sich das BNP<sub>1-32</sub>-Molekül im Blutkreislauf wird es höchstwahrscheinlich schnell in Fragmente degradiert, die in Relation zu BNP<sub>1-32</sub> in höherer Anzahl vorhanden sind, aber auch durch die kommerziellen BNP-Tests gemessen werden. Unter den zirkulierenden Fragmenten von BNP findet sich BNP<sub>3-32</sub>, welches aus der Spaltung von BNP<sub>1-32</sub> durch Dipeptidyl-Peptidase-IV (DPP-IV) entsteht. Zusätzlich zeigte eine Studie, dass die Peptidase Meprin A, welche in hoher Konzentration in der Niere exprimiert wird, BNP<sub>1-32</sub> in BNP<sub>7-32</sub> spaltet. Dies stellt einen notwendigen Schritt für die Degradation durch die Neutrale Endopeptidase (NEP) dar. Es ist jedoch nicht bekannt, ob dieser Schritt auch an der Degradation von BNP<sub>3-32</sub> beteiligt ist. Teilweise gelangt auch schon proBNP<sub>1-108</sub> in den Kreislauf. Es wird dann möglicherweise von Furin gespalten oder zu einem gewissen Grad glykosyliert (SCHELLENBERGER et al., 2006).

### **1.3. Natriuretische Peptid-Rezeptoren und Neutrale Endopeptidase**

Die Natriuretischen Peptide wirken über eine Interaktion mit hochaffinen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Es wurden bisher vier Natriuretische Peptid-Rezeptoren beschrieben. Alle besitzen eine einzelne transmembranale Domäne und eine extrazelluläre Bindungsdomäne.

NPR-A und NPR-B sind strukturell ähnlich, mit einer Homologie von 44 % in der ligandenbindenden extrazellulären Domäne (KOLLER & GOEDDEL, 1992). Beide Rezeptoren sind an eine zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) abhängige Signalkaskade gebunden, über die die biologische Wirkung ausgelöst wird (KONE, 2001).

#### **1.3.1. Natriuretischer Peptid-Rezeptor-A**

NPR-A wird in Lunge, Herz, Gehirn, Nebennieren, Nieren und im terminalen Ileum exprimiert (POTTER et al., 2006). Durch Stimulation der Ligandenbindenden Domäne kommt es zur Produktion des intrazellulären second-messengers cGMP. Dieses ist notwendig für eine weitere Signalweiterleitung. Die Stimulation des NPR-A führt zu Natriurese, Inhibition von Renin und Aldosteron sowie zu vasorelaxierenden, antifibrotischen, antihypertrophen und lusitropen Effekten (LEE & BURNETT, 2007). NPR-A knock-out-Mäuse entwickeln eine Hypertension, eine linksventrikuläre Hypertrophie sowie Fibrosen (LOPEZ et al., 1995; POTTER et al., 2006). Am besten binden DNP, ANP und BNP an diesen Rezeptor (INOUE et al., 2006; SINGH et al., 2006).

#### **1.3.2. Natriuretischer Peptid-Rezeptor-B**

NPR-B wird in Lunge, Gehirn, Haut, Nebennieren, Nieren, Uterus und den Ovarien exprimiert. Die Struktur des Rezeptors ist ähnlich dem NPR-A, und eine Stimulation löst ebenfalls die Produktion von cGMP aus (POTTER et al., 2006). NPR-B kommt allerdings in großen Mengen in Venen vor, im Gegensatz zu NPR-A, welcher in Venen und Arterien in etwa gleicher Menge vorkommt (WEI et al., 1993). Deshalb führt eine Aktivierung von NPR-B (vorwiegend durch CNP) zu einer Erhöhung von cGMP in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und dadurch zu einer Vasorelaxation. Dieser hypotensive Effekt ist stärker als der durch eine NPR-A-Aktivierung, da bei letzterem auch eine Vasokonstriktion der Arterien erfolgt (WENNBERG et al., 1999). NPR-B knock-out Mäuse entwickeln

Zwergwuchs und Unfruchtbarkeit der Weibchen (TAMURA et al., 2004). Obwohl die Stimulation des NPR-B keine Natriurese und Diurese auslöst, zeigten neuere Studien, dass NPR-B eine größere kardioprotektive Rolle spielt, als bisher angenommen (DICKEY et al., 2007). Mit der höchsten Sensitivität bindet CNP an den Rezeptor, VNP und ANP schlechter und BNP am schlechtesten (LEVIN et al., 1998; PIAO et al., 2004; INOUE et al., 2005).

### **1.3.3. Natriuretischer Peptid-Rezeptor-C**

NPR-C kommt in mehreren Organen vor, unter anderem in Lunge, Gehirn, Herz, Nebennieren, Nieren, Mesenterium, Fettgewebe, Plazenta, Venen und der Aorta. Im Gegensatz zu NPR-A und NPR-B besitzt es keine Kinasehomologie und keine Guanylyl-Cyclase-Domäne, welche für die Produktion von cGMP nötig wäre. Es wird als Dimer exprimiert. Im Modell mit transgenen Mäusen, bei welchen NPR-C genetisch entfernt wurde, konnte gezeigt werden, dass bei homozygoten Mäusen die Halbwertszeit von radioaktiv markiertem ANP im Kreislauf um 66 % länger war als bei Mäusen des Wildtyps. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass NPR-C hauptsächlich als Modulator der Verfügbarkeit der Natriuretischen Peptide in den Zielorganen wirkt (JAUBERT et al., 1999; MATSUKAWA et al. 1999). Wie auch in anderen nutrient-type transmembranen Rezeptoren, wird der Ligand an NPR-C lysosomal hydrolysiert. Anschließend findet ein Rezeptorrecycling zur Zelloberfläche statt (POTTER et al., 2006). Es gibt außerdem Studien, die darauf hinweisen, dass NPR-C antiproliferative Effekte von BNP und CNP auf Fibroblasten auslösen kann (ROSE & GILES, 2008). Die stärkste Sensitivität hat NPR-C für VNP und ANP, gefolgt von CNP, BNP und DNP (LEVIN et al., 1998; INOUE et al., 2006; POTTER et al., 2006; JOHNS et al., 2007; ROSE & GILES, 2008).

### **1.3.4. Natriuretischer Peptid-Rezeptor-D**

NPR-D konnte bisher nur beim Aal isoliert werden (KASHIWAGI et al., 1995). Es wird vermutet, dass NPR-D aus NPR-C entstanden ist und ihm ebenfalls die Guanylyl-Cyclase-Katalytische Domäne fehlt. Allerdings liegt es, im Gegensatz zu NPR-C, wie NPR-A und NPR-B als Tetramer vor und wird nur in einzelnen Organen (vor allem in Gehirn) exprimiert. Das Wissen über die Funktion von

NPR-D ist zum jetzigen Zeitpunkt noch begrenzt. Am sensitivsten bindet NPR-D beim Aal an ANP, gefolgt von VNP und CNP (INOUE et al., 2006).

### **1.3.5. Neutrale Endopeptidase**

Die NEP 24.11 ist eine membrangebundene Metalloprotease. Eine Expression ihrer Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) kann durch Adenylatcyclase, Glucokortikoide, Thrombin, Calcitonin und Zytokine aktiviert werden (ROQUES, 1992). Zunächst wurde sie vor allem in der Niere gefunden, doch sie wird auch in diversen anderen Geweben exprimiert, wie zum Beispiel im Gehirn und in der Lunge (KERR & KENNY, 1974; TURNER et al., 2001).

Gemeinsam mit dem Clearance-Rezeptor NPR-C ist die NEP 24.11 beteiligt an der aktiven Elimination der Natriuretischen Peptide aus dem Kreislauf durch Hydrolyse. Wie auch bei den Rezeptoren ist die Aktivität der NEP je nach Natriuretischem Peptid unterschiedlich. Wahrscheinlich sind die Natriuretischen Peptiden mit einem längeren C-terminalen Rest resistenter gegen die Degradierung. Am besten wird CNP durch die NEP hydrolysiert, gefolgt von ANP und BNP. DNP ist das Peptid, welches am resistentesten gegen einen Abbau ist (DUSSAULE et al., 1993; CHEN et al., 2002).

Die NEP ist neben der Degradierung der Natriuretischen Peptide, welche am besten untersucht ist, auch verantwortlich für die Inaktivierung von Enkephalinen, Neuropeptiden, wie z. B. die Substanz P und möglicherweise auch dem  $\beta$ -Amyloid-Peptid, welches bei Alzheimer im Gehirn in Plaques abgelagert wird (TURNER et al., 2001).

### **1.4. Abbau von BNP und NT-proBNP**

Der Abbau der Natriuretischen Peptide erfolgt über zwei Hauptmechanismen: die enzymatische Degradierung durch NEP und die rezeptormediierte Endozytose mit nachfolgender lysosomaler Degradierung durch NPR-C (NAKAO et al., 1992b).

BNP und NT-proBNP werden durch unterschiedliche Mechanismen abgebaut. BNP wird entweder über passive Clearance-Mechanismen, z. B. Ausscheidung über die Niere oder aktiv über Degradierung durch NPR-C aus der Zirkulation entfernt. NT-proBNP wird hauptsächlich passiv über Organe mit hoher Blutflussrate aus der Zirkulation entfernt (z. B. Muskel, Leber, Niere). Studien

beim Menschen haben gezeigt, dass die Ausscheidungsraten über die Niere bei BNP und NT-proBNP vergleichbar sind und sowohl bei gesunden, als auch bei kranken Menschen nur etwa 15 – 20 % beträgt (SCHOU et al., 2005; GOETZE et al., 2006).

Die Halbwertszeit von BNP wird mit 13 – 20 Minuten angegeben. In der Zirkulation, wird BNP über Bindung an NPR-C abgebaut und zu einem geringeren Teil über Hydrolyse durch Proteasen, z. B. durch NEP. Im Gegensatz zu ANP scheint BNP relativ resistent gegenüber einer Degradierung durch NEP zu sein (SMITH et al., 2000). Es werden weitere Studien zur genauen Klärung des BNP-Metabolismus beim Menschen benötigt.

Es scheint keine aktiven Clearance-Mechanismen für NT-proBNP zu geben. Anscheinend wird es im Plasma an beiden Enden schnell degradiert. Eine Studie an Schafen zeigte eine längere Halbwertszeit von NT-proBNP (ca. 70 Minuten) in der Zirkulation (PEMBERTON et al., 2000). Die Halbwertszeit beim Menschen wird mit 25 Minuten kalkuliert (KROLL et al., 2007).

### **1.5. Physiologie**

ANP und BNP wirken über den gleichen Rezeptor NPR-A und besitzen deshalb ähnliche physiologische Wirkungen. Sie scheinen ein duales System zu bilden, mit ANP als sehr schnell reagierendes Hormon und BNP als "back-up-Hormon", welches erst bei länger andauernder Volumenüberlastung aktiviert wird (MAIR, 2008).

ANP und BNP regulieren den Blutdruck und den Flüssigkeitshaushalt. Sie wirken hypotensiv, indem sie die Druck- und Volumenüberlastung reduzieren, vor allem durch eine Verminderung des intravasalen Volumens (LEVIN et al., 1998; POTTER et al., 2006). Durch eine erhöhte endotheliale Permeabilität in den Gefäßen gelangt intravaskuläre Flüssigkeit in den extravaskulären Raum, wodurch der venöse Widerstand sinkt. Es kommt zu einer Erniedrigung des intravasalen Volumens und damit zu einer Senkung der Vorlast (WIJEYARATNE & MOULT, 1993). ANP und BNP reduzieren außerdem den atrialen und ventrikulären enddiastolischen Druck. Dadurch erhöht sich der kardiale Auswurf und die diastolische Funktion verbessert sich.

ANP und BNP bewirken auch eine Vasodilatation. Sie unterdrücken den vasokonstriktiven Effekt von Endothelin-1, was zu einer arteriellen und venösen Vasodilatation führt (ABRAHAM et al., 1998).

In der Niere bewirken ANP und BNP vor allem eine verstärkte Natriurese und Diurese und dadurch eine Reduktion des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens. Sie wirken direkt an den Glomeruli und an den Sammelrohren. In den Glomeruli kommt es zu einer Dilatation der afferenten Arteriolen und einer Konstriktion der efferenten Arteriolen, dadurch steigt der intraglomeruläre Druck an und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird erhöht (MARIN-GREZ et al., 1986; WEIDMANN et al., 1986). In den Sammelrohren wird die Reabsorption von Natrium gehemmt und die Ausscheidung von Natrium und Wasser gesteigert (ZEIDEL et al., 1988). Die Effekte an den Sammelrohren werden durch das renale Peptid Urodilatin weiter verstärkt (SCHULZ-KNAPPE et al., 1988). ANP und BNP hemmen außerdem die Wirkung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) durch Hemmung der Ausschüttung von Renin, Angiotensin II und Aldosteron (RICHARDS et al., 1988). Der renale Blutfluss wird erhöht, was zu einer erhöhten Urinausscheidung führt (DILLINGHAM & ANDERSON, 1986). Die peripheren Wirkungen von ANP und BNP werden über direkte Aktionen im Zentralen Nervensystem (ZNS) noch verstärkt. So werden zentral der Appetit auf Salz und der Durst herabgesetzt (BURRELL et al., 1991; BLACKBURN et al., 1995).

ANP und BNP setzen den Sympatikotonus in den peripheren Gefäßen herab. Dies wird wahrscheinlich durch eine verminderte Ausschüttung von Katecholaminen ausgelöst, die zur Dämpfung des Sollwerts der Barorezeptoren in den Gefäßen führt. ANP verringert außerdem den Schwellenwert zur Aktivierung vagaler Effekte, dadurch wird die Reflextachykardie und Vasokonstriktion vermindert und so die Vorlast zusätzlich gesenkt und der Blutdruck weiter erniedrigt (SCHULTZ et al., 1988; YANG et al., 1992).

ANP und BNP besitzen eine antimitogene und antiproliferative Wirkung im kardiovaskulären System. Sie wirken antimitogen auf die Zellen des Endothels der glatten Gefäßmuskulatur (APPEL, 1990). Außerdem modulieren sie das Zellwachstum, die Proliferation und die Hypertrophie von Kardiomyozyten (HORIO et al., 2000). BNP wirkt außerdem antifibrotisch auf den Herzmuskel. Bei Mäusen mit fehlendem BNP wurden multifokale fibrotische Läsionen beobachtet, weshalb vermutet wird, dass es sich bei BNP um einen antifibrotischen Faktor aus den Kardiomyozyten handelt (CAO & GARDNER, 1995; TAMURA et al., 2000).

Es wurde außerdem beschrieben, dass Natriuretische Peptide auch eine

Bronchodilatation und eine Lipolyse in Fettgewebe auslösen (CHANEZ et al., 1990; SENGÈS et al., 2000).

## **2. Natriuretische Peptide in der Humanmedizin**

In der Humanmedizin haben sich die Natriuretischen Peptide schon seit einigen Jahren als nützliche Marker zur Diagnostik, Prognostik und Therapieentscheidung bei Herzkrankheiten etabliert. Am besten untersucht ist der diagnostische Nutzen von BNP und NT-proBNP bei Patienten mit Herzversagen. In zahlreichen Studien wurde immer wieder nachgewiesen, dass BNP und NT-proBNP bei Patienten mit Herzversagen erhöht sind, und dass die Werte mit dem Schweregrad der Krankheit korrelieren, der durch die Klassen der New York Heart Association (NYHA) festgelegt wird.

Die Konzentrationen von BNP und NT-proBNP sind beim Menschen abhängig von Alter, Geschlecht und Körpergewicht (VAN KIMMENADE & JANUZZI 2009). Mit dem Alter nimmt die Konzentration der Peptide zu, wahrscheinlich weil strukturelle und funktionelle Schäden am Myokard vorliegen, die aber klinisch und diagnostisch noch nicht in Erscheinung treten. Hinzu kommt häufig eine mit zunehmendem Alter eingeschränkte Nierenfunktion. Es wird auch vermutet, dass bei älteren Patienten, die Konzentration an Clearance-Rezeptoren abnimmt (KAWAI et al., 2004).

Frauen haben höhere Werte als Männer, was wahrscheinlich an einem unterschiedlichen Metabolismus liegt. Nachdem bei einer Hormonsubstitutionstherapie höhere BNP-Werte festgestellt wurden, wird ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Östrogenstatus und BNP vermutet (REDFIELD et al., 2002).

Bei Patienten mit erhöhtem Body Mass Index (BMI) sind die Werte niedriger als bei normalgewichtigen Personen (HORWICH et al., 2006), obwohl bei adipösen Patienten häufig ein erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Druck vorliegt (TAYLOR et al., 2006). Es wird vermutet, dass Substanzen, möglicherweise Androgene, die Synthese und Freisetzung der Vorstufen von BNP in den Myozyten adipöser Patienten hemmen (DAS et al., 2005).

Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion sind die Konzentrationen von BNP und NT-proBNP erhöht, beide korrelieren negativ mit der Kreatinin-

Clearance. Da NT-proBNP hauptsächlich über die Niere metabolisiert wird, wird vor allem dieser Marker durch Nierenfunktionsstörungen beeinflusst (ANWARUDDIN et al., 2006).

Die Konzentrationen von NT-proBNP und BNP werden außerdem durch die Schilddrüsenfunktion beeinflusst, bei einer Hyperthyreose treten erhöhte Werte auf (OZMEN et al., 2007).

Tabelle 1 zeigt die verschiedenen physiologischen und pathologischen Faktoren, die beim Menschen zu einer Erhöhung der NT-proBNP- und BNP-Konzentration führen können.

**Tabelle 1:** Einflussfaktoren auf die (NT-pro)BNP-Konzentration (LVH = linksventrikuläre Hypertrophie, LV = linksventrikuläre) (VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009)

Physiologische Faktoren	Kardiale Faktoren	Nicht-kardiale Faktoren
Alter	Herzversagen	Niereninsuffizienz
Geschlecht	Ischämie	Cor pulmonale
Gewicht	Arrhythmien	Sepsis
	Klappenerkrankungen	Pulmonäre Hypertension
	Hypertension mit LVH	Lungenembolie
	LV-Dysfunktion	Lungentumoren
	Kardiogener Schock	Intrazerebrale Blutungen
		Hgr. Lebererkrankungen
		Hyperthyreoidismus
		Anämie
		Apnoe Syndrom
		Hgr. erhöhtes Kortisol

## 2.1. BNP und NT-proBNP in der Diagnostik

In den Europäischen Leitlinien für die Diagnose und Behandlung von akutem und chronischen Herzversagen wurde die Rolle der Natriuretischen Peptide als Marker für Herzversagen hervorgehoben (DICKSTEIN et al., 2008). Mit einer Prävalenz von 0,8 – 2 % ist Herzversagen eine der häufigsten Krankheiten in der Population (KANNEL, 2000). Eine frühe Diagnose ist bei dieser Krankheit sehr wichtig, um

möglichst früh mit einer effektiven Therapie beginnen zu können und dadurch die Prognose zu verbessern. BNP und NT-proBNP haben eine hohe Sensitivität für die Diagnose oder den Ausschluss von akutem oder chronischem Herzversagen. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmawerte der Natriuretischen Peptide bei Patienten mit Herzversagen signifikant erhöht sind und eine enge Korrelation mit dem NYHA-Status vorliegt (MAISEL et al., 2002).

Zahlreiche Studien zeigen einen optimalen Nutzen der Messung der Konzentrationen von BNP und NT-proBNP im Plasma, gemeinsam mit Anamnese, klinischer Untersuchung und Röntgen des Thorax zur Diagnose von Herzversagen bei Patienten, die mit Dyspnoe in eine Notfallambulanz eingeliefert wurden (MAISEL et al., 2002; McCULLOUGH et al., 2002; JANUZZI et al., 2006).

Die Konzentrationen der Natriuretischen Peptide sind bei Patienten mit akutem myokardialem Infarkt und linksventrikulärer Dysfunktion erhöht. Diese Erhöhung bleibt bis über späte Phasen des kardialen Remodelling hinaus bestehen (HIRAYAMA et al., 2005). Erhöhte Werte korrelieren direkt mit der Prognose, der NYHA-Klasse, dem intraventrikulären Druck und dem Pulmonalvenendruck und verhalten sich umgekehrt proportional zur kardialen Auswurfleistung (SILVER et al., 2004). Eine Erhöhung der Konzentration von BNP wurde außerdem bei hypertropher Kardiomyopathie, diastolischer Dysfunktion und linksventrikulärer Hypertrophie beobachtet. Unter diesen Umständen scheint BNP mit dem myokardialen Massenindex und der Wanddicke in Beziehung zu stehen (DE LEMOS et al., 2009).

In mehreren Studien konnte eine hohe Aussagekraft der BNP- und NT-proBNP-Messung bei akuter Dyspnoe aufgrund von Herzversagen nachgewiesen werden. So stellten DAO und Mitarbeiter bei 250 Patienten in einer Notfallambulanz fest, dass die BNP-Werte bei Patienten mit kardial bedingter Dyspnoe signifikant höher waren, als bei Patienten mit nichtkardialer Dyspnoe (DAO et al., 2001). Dies wurde bestätigt in einer Studie von MORRISON und Mitarbeitern. Die BNP-Werte der Patienten mit kardialer Dyspnoe waren in dieser Studie höher als bei den Patienten, die Dyspnoe aufgrund respiratorischer Krankheiten zeigten (MORRISON et al., 2002). In der ersten multizentrischen Studie, der "Breathing Not Properly" (BNP) Studie mit 1586 Patienten, welche mit akuter Dyspnoe an eine Notfallambulanz überwiesen wurden, war das Hauptergebnis, dass die

Messung von BNP in Kombination mit der klinischen Untersuchung sehr gut zur Diagnose von Herzversagen geeignet ist. Bei einem BNP-Wert unter 100 pg/ml kann die Diagnose Herzversagen mit einer Sensitivität von 90 % ausgeschlossen werden (MAISEL et al., 2002).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für NT-proBNP in der International Collaborative of NT-proBNP Study "ICON", sowie in der Investigation of Dyspnoe in the Emergency department "PRIDE" Studie. Es wurde ein Cut-off von 300 pg/ml für NT-proBNP im Plasma festgelegt (JANUZZI et al., 2005, 2006a). Die erhöhten Werte beider Peptide korrelieren mit einer verminderten linksventrikulären Auswurfleistung (GUSTAFSSON et al., 2005) und können auch zur Erkennung einer asymptomatischen linksventrikulären systolischen Dysfunktion verwendet werden. NT-proBNP scheint hierbei sensitiver zu sein als BNP (COSTELLO-BOERRIGTER et al., 2006).

Eine diastolische Dysfunktion ist eine häufige Ursache für Herzversagen bei älteren Patienten und ist ebenfalls mit erhöhten BNP-Plasma-Werten verbunden. Die Werte sind jedoch nicht in dem Ausmaß erhöht wie bei einer systolischen Dysfunktion. Gemeinsam mit den diastolischen Veränderungen in der Echokardiographie kann BNP helfen, die Diagnose eines diastolischen Herzversagens zu bestätigen (LUBIEN et al., 2002).

In einer prospektiven Studie mit 100 Patienten, die mit Brustschmerz vorstellig wurden, waren die BNP-Werte bei den Patienten mit kardial bedingtem Brustschmerz signifikant höher, als bei Patienten mit nicht-kardialem Brustschmerz (BROWN et al., 2007).

NT-proBNP ist ebenso ein sensitzer Marker für eine myokardiale Ischämie. Es steigt in der frühen Phase deutlicher an als andere konventionelle Marker für myokardiale Schäden, insbesondere bei Patienten mit Myokardinfarkt ohne ST-Strecken-Hebung (OGAWA et al. 2006). Auch in einer Studie von HAAF und Mitarbeitern (2011) konnte eine signifikante Erhöhung der NT-proBNP-Plasmawerte bei Patienten mit Myokardinfarkt nachgewiesen werden. NT-proBNP ist somit gut geeignet zur frühen Diagnose und Risikoeinschätzung bei Patienten mit Verdacht auf Myokardinfarkt (HAAF et al., 2011).

Die NT-proBNP-Konzentration ist signifikant erhöht bei Patienten mit schwerer Mitralstenose im Vergleich zu Patienten mit moderater Stenose. Es gab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der Mitralstenose und der

NT-proBNP-Konzentration (ILTUMUR et al., 2005). Die Serumwerte von NT-proBNP korrelieren außerdem mit den Befunden in der Echokardiographie und der NYHA-Klasse bei Patienten mit Mitrastenose (ARAT-OZKAN et al., 2005).

## 2.2. BNP und NT-proBNP in der Prognostik

BNP und NT-proBNP haben sich als hervorragende Marker zur Abschätzung der Kurzzeit- und Langzeitprognose etabliert, nicht nur bei Patienten mit akutem oder chronischem Herzversagen, sondern im kompletten Spektrum der kardiovaskulären Krankheiten. So konnte in einer Studie von JANUZZI und Mitarbeitern (2006) bei 599 Patienten mit Dyspnoe gezeigt werden, dass die Patienten, die innerhalb eines Jahres starben, signifikant höhere NT-proBNP-Werte bei der Erstvorstellung aufwiesen als die Überlebenden (JANUZZI et al., 2006b). In der International Collaborative of NT-proBNP "ICON" Studie mit 1256 Patienten mit Dyspnoe wurde nachgewiesen, dass die NT-proBNP-Werte mit der Schwere der Symptome korrelieren und die Kurzzeitprognose umso schlechter war, je höher die Werte bei der Eingangsuntersuchung waren (JANUZZI et al., 2006a).

Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist die Messung von BNP gut geeignet, um das damit verbundene Risiko einzuschätzen. Hohe Werte sind verbunden mit wiederholten stationären Aufenthalten und einem erhöhten Risiko des plötzlichen Herztods (HARRISON et al., 2002). In mehreren Studien erwiesen sich die Konzentrationen von NT-proBNP und BNP als stärkste Vorhersagewerte für die Mortalität und eine Krankenhauseinweisung innerhalb von sechs Monaten (BETTENCOURT et al., 2004; ASPROMONTE et al., 2008). Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ohne ventrikulärer Dysfunktion liefert eine frühe Messung von BNP zusätzliche Information zu anderen Markern und scheint der stärkste unabhängige Marker für die Prognose zu sein (PALAZZUOLI et al., 2006). Daten aus einer großen Studie zu NT-proBNP kamen von der Australia-New Zealand Heart Failure Group. Bei 300 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ischämischer Ätiologie zeigte sich bei Werten von NT-proBNP über dem Median ein erhöhtes Risiko für dekompensierte Herzinsuffizienz und eine erhöhte Gesamtmortalität im Verlauf von 18 Monaten, unabhängig von Alter, NYHA-Klasse, linksventrikuläre Auswurffraktion (LVEF),

vorhergehendem Myokardinfarkt oder früherer Einweisung aufgrund von Herzversagen (RICHARDS et al., 2006).

### **2.3. BNP und NT-proBNP in der Therapie**

In der Humanmedizin werden die Natriuretischen Peptide BNP und NT-proBNP schon seit längerem zum Therapiemonitoring bei Herzkrankheiten eingesetzt. Anhand der Konzentrationen der Peptide wird die Therapie angepasst und der Therapieerfolg wird überprüft. Es werden außerdem künstlich hergestellte Peptide als Therapeutika verwendet.

#### **2.3.1. Einstellen der Therapie anhand von BNP- und NT-proBNP-Werten**

In mehreren Studien konnte ein positiver Effekt einer Herzinsuffizienz-Therapie mit dem Ziel einer Senkung der Plasma-Konzentrationen der Natriuretischen Peptide gezeigt werden, z. B. für Angiotensin-Converting Enzym Inhibitoren (ACE-Hemmer), Angiotensin-Rezeptor-Agonisten, Spironolacton und andere Diuretika (MURDOCH et al., 1999; TROUGHTON et al., 2000; TSUTAMOTO et al., 2001; ANAND et al., 2003). Die Wirkung von Betablockern auf den Plasmaspiegel von BNP und NT-proBNP ist komplexer. So kommt es bei Einleitung der Therapie zu einer leichten Erhöhung der Natriuretischen Peptide durch die Hemmung der adrenergen Stimulation (SANDERSON et al., 1995). Bei einer Langzeit-Therapie mit Betablockern kommt es jedoch zu einer Senkung des Plasmaspiegels der Natriuretischen Peptide, parallel zur Besserung der LVEF. Dies wird insbesondere bei der Applikation von vasodilatierenden Betablockern beobachtet (SANDERSON et al., 1995; RICHARDS et al., 1999).

Die Korrelation von Senkung der BNP-Levels und einer Besserung der Symptome der Patienten im Verlauf eines stationären Aufenthalts gibt Grund zu Annahme, dass eine Herzinsuffizienz-Therapie, geleitet durch Serien-Messungen der Natriuretischen Peptide in Zusammenhang mit anderen Daten aus Anamnese und klinischer Untersuchung, zu besseren Ergebnissen führt (SILVER et al., 2004).

In der "STARS-BNP-Studie" wurden 220 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (NYHA-Klasse II – III) und einer LVEF < 45 % medikamentell behandelt, entweder nach den aktuellen Richtlinien oder zusätzlich mit dem Ziel, die BNP-Konzentration unter einen Plasmawert von 100 pg/ml zu senken (BNP-Gruppe). Nach 15-monatiger Behandlung war in der BNP-Gruppe die Inzidenz für Tod durch Herzversagen oder Krankenhouseinweisung aufgrund von

Herzinsuffizienz um 50 % geringer als bei den Patienten, welche eine Standardtherapie erhielten (JOURDAIN et al., 2007).

In der "BATTLESCARRED-Studie" wurden 364 Patienten, welche mit Herzinsuffizienz stationär aufgenommen wurden untersucht. Hier wurden drei Therapiewege untersucht: die herkömmliche Behandlung, intensives klinisches Management und eine an NT-proBNP orientierte Therapie. Nach 12 Monaten war die Gesamtsterblichkeit bei den Patienten mit Intensivtherapie und NT-proBNP-Therapie um 50 % reduziert im Vergleich zur herkömmlichen Therapie. Nach zwei bis drei Jahren waren diese beiden Therapien jedoch der herkömmlichen Therapie in Bezug auf die Mortalität nicht mehr signifikant überlegen. Es konnte eine signifikante Verbindung zwischen dem Alter der Patienten und dem Nutzen der an NT-proBNP-Werten orientierten Therapie beobachtet werden. Bei Patienten unter 75 Jahren konnte im Vergleich zur herkömmlichen Therapie eine geringere Mortalität nach ein bis drei Jahren nachgewiesen werden, jedoch nicht bei Patienten im Alter von 75 Jahren oder älter. Die Mortalität bei den unter 75-jährigen war sogar im Vergleich zur Gruppe mit Intensivtherapie geringer als bei den Patienten mit NT-proBNP-Therapie (LAINCHBURY et al., 2009).

### **2.3.2. Verabreichung von BNP als Therapie**

Bei Infusion von humanem BNP bei gesunden Freiwilligen kommt es zu einer erhöhten Natriurese und einer erhöhten Ausscheidung von cGMP im Urin (YOSHIMURA et al., 1991).

Nesiritide oder rekombinantes humanes BNP ist ein Molekül, welches eine identische Struktur wie endogenes humanes BNP<sub>1-32</sub> hat. Die Wirkungen einer 24-Stunden-Infusion von Nesiritide bei Patienten mit kongestivem Herzversagen wurden in einer multizentrischen placebokontrollierten Studie untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion von Vor- und Nachlast und dadurch eine Erhöhung des Schlagvolumens und des kardialen Auswurfs (MILLS et al., 1999).

O'CONNOR und Mitarbeiter (2011) empfehlen Nesiritide nicht zur Standardtherapie bei Herzversagen, da in einer groß angelegten Studie mit über 7000 Patienten nur eine kleine nichtsignifikante Verbesserung der Dyspnoe auftrat. Es konnte außerdem kein Einfluss auf die Mortalität oder die Häufigkeit einer Rehospitalisierung nachgewiesen werden. Es kam zu keiner Verschlechterung der Nierenfunktion, aber zu einer Häufung von hypotensiven Phasen (O'CONNOR et al., 2011).

Ein neues synthetisches Natriuretisches Peptid ist das chimeric designed natriuretic peptide (CD-NP) (LISY et al., 2008). Es ist das erste Natriuretische Peptid, welches zwei Rezeptoren, nämlich NPR-A und NPR-B aktivieren kann. Es zeigt die physiologischen Wirkungen eines Natriuretischen Peptides, hat aber eine geringere hypotensive Wirkung als BNP. Besonders vielversprechend ist die antifibrotische Wirkung von CD-NP (MARTIN et al., 2012).

### **3. Natriuretische Peptide in der Veterinärmedizin**

Auch in der Tiermedizin wurde die Messung von Natriuretischen Peptiden Gegenstand zahlreicher Studien. Wie in der Humanmedizin wurden die ersten Erfahrungen mit Messungen von ANP gemacht. So wurden bei Hunden mit Mitralsuffizienz, Herzwurmerkrankung und Herzversagen eine höhere Konzentration festgestellt als bei herzgesunden Patienten (TAKEMURA et al., 1991; VOLLMAR et al., 1991; HÄGGSTRÖM et al., 1994). BOSWOOD und Mitarbeiter (2003) validierten einen ELISA für proANP<sub>31-67</sub> zur Diagnostik von Herzversagen beim Hund (BOSWOOD et al., 2003).

Wie auch in der Humanmedizin zeigte sich bald, dass BNP und NT-proBNP besser als Marker für Herzkrankheiten geeignet sind. Bald kam ein Radioimmunoassay für kanines BNP zum Einsatz. So wurden von ASANO und Mitarbeitern 1999 perioperative Änderungen in der Plasmakonzentration von ANP und BNP bei Hunden mit persistierendem Ductus arteriosus (PDA) gemessen. Dabei wurde kein Zusammenhang zwischen ANP und dem Schweregrad des PDA festgestellt, wobei die postoperativen Werte bei beiden Peptiden signifikant niedriger waren als vor der Operation. Die BNP-Werte sanken langsamer als die ANP-Werte, stiegen nach zehn Tagen sogar wieder auf präoperative Werte an und sanken dann erneut ab. So wurde vermutet, dass BNP eine andere pathophysiologische Bedeutung als ANP widerspiegelt (ASANO et al., 1999a).

#### **3.1. Messung von BNP und NT-proBNP beim Hund**

Beim Hund gibt es inzwischen zahlreiche Studien zur Anwendung von Natriuretischen Peptiden als Marker für Diagnostik, Prognostik und Therapiemonitoring bei Herzkrankheiten. In früheren Studien wurde zunächst die

ANP-Konzentration gemessen (TAKEMURA et al., 1991; COLBATZKY et al., 1993; VOLLMAR et al., 1994), doch BNP hat sich schnell als besserer Marker etabliert.

### 3.1.1. BNP

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen beim Menschen konnten beim herzgesunden Hund keine Zusammenhänge zwischen der BNP-Konzentration und Alter, Gewicht oder Geschlecht festgestellt werden (ERIKSSON et al., 2001; CHETBOUL et al., 2004; TIETGEN, 2004). Bei herzkranken Hunden steigt die BNP-Konzentration mit dem Alter an, was aber wahrscheinlich an einem Fortschreiten der Herzkrankheit liegt (CHETBOUL et al., 2004).

Wie in der Humanmedizin sind die Plasmawerte von BNP bei Hunden mit kongestivem Herzversagen erhöht und korrelieren mit der Schwere der vorliegenden Herzkrankheit. Innerhalb der verschiedenen ISAHCH-Klassen werden bei Hunden in höheren Klassen signifikant höhere BNP-Plasmawerte gemessen. Außerdem zeigen Hunde im dekompensierten Herzversagen signifikant höhere Werte als Hunde im kompensierten Herzversagen. (ASANO et al., 1999b; MACDONALD et al., 2003, HÄUSSLER, 2004).

Auch bei moderater bis schwerer Mitralsuffizienz ohne Herzversagen korreliert BNP mit der Schwere der Krankheit und gibt zusätzlich Informationen über die Prognose. Je höher der Plasmawert, umso höher ist die Mortalität und mit jedem Anstieg um 10 pg/ml steigt die Mortalität innerhalb einer Zeitspanne von vier Monaten um ungefähr 44 % an (MACDONALD et al., 2003).

Bei asymptomatischen Patienten wurde BNP als Biomarker zur Früherkennung einer subklinischen Herzkrankheit getestet. CHETBOUL und Mitarbeiter (2004) stellten fest, dass BNP sich als nützlicher Marker für asymptomatische Kardiomyopathie eignet. Sie bestimmten BNP bei Golden Retrievern, die sich in der okkulten Phase einer Kardiomyopathie befanden. Bei einem Cut-off-Wert von 65 pg/ml ergab sich eine Sensitivität von 78 % und eine Spezifität von 86 % zur Erkennung des okkulten Stadiums einer Kardiomyopathie bei Hunden, die älter als ein Jahr waren (CHETBOUL et al., 2004). Bei Boxern mit arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie (ARVC) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der BNP-Konzentrationen bei gesunden Hunden und jenen mit

ARVC nachgewiesen werden. Die Veränderungen am Herzen sind bei den betroffenen Hunden anscheinend nicht ausgeprägt genug, um eine signifikante Erhöhung der BNP-Konzentration zu bewirken (BAUMWART & MEURS, 2005).

In einer Studie mit Hunden der Rassen Boxer und Dobermann wurde unter anderem BNP zum Screening auf okkulte Kardiomyopathie benutzt. Bei Hunden mit okkulter Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) war BNP signifikant erhöht. Bei einem Cut-off-Wert von 6,2 pg/ml ergaben sich eine Sensitivität von 95,2 % und eine Spezifität von 61,9 % für die Erkennung einer okkulten Kardiomyopathie. Im Gegensatz dazu hatten ANP und kardiales Troponin I (cTnI) relativ niedrige prädiktive Werte (OYAMA et al., 2007).

Auch bei subklinischer Mitralsuffizienz zeigte sich, dass BNP zur Früherkennung nützlich sein könnte. Die BNP-Plasmawerte stiegen bereits in moderaten bis schweren asymptomatischen Stadien der Krankheit an (MOESGAARD et al., 2011).

BNP wurde schon bald als Biomarker zur Unterscheidung zwischen kardialen und nicht-kardialen Ursachen für Dyspnoe bei Hunden verwendet. In einer Studie mit 48 Hunden waren bei kardialer Dyspnoe die Plasmawerte von BNP signifikant höher als bei Patienten mit nicht-kardialen Ursachen. Bei einem Cut-off-Wert von 17,4 pg/ml für BNP im Plasma ergaben sich eine Sensitivität von 86,4 % und eine Spezifität von 80,8 % für die Diagnose von herzbedingter Dyspnoe (PROSEK et al., 2007).

Die Entwicklung eines speziellen ELISA für kanines BNP vereinfachte die Diagnostik beim Hund erheblich. DEFRENESCO und Mitarbeiter (2007) zeigten bei 330 Hunden, welche mit Husten oder Dyspnoe vorgestellt wurden, dass mithilfe von BNP eine Unterscheidung zwischen kardialen und nicht-kardialen Ursachen für die Symptomatik möglich ist. Mit einem Cut-off-Wert von 6 pg/ml wurden eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 78 % erreicht. Die BNP-Plasmawerte stiegen außerdem mit dem Schweregrad der Herzkrankheit signifikant an, und es gab einen signifikanten Unterschied der Werte zwischen den verschiedenen Herzkrankheiten. Besonders hohe Werte wurden bei Hunden mit DCM gemessen (Median: 36,9 pg/ml). Zur Differenzierung zwischen herzgesunden und subklinisch herzkranken Patienten war der Test jedoch nicht geeignet. Bei einem Cut-off-Wert von 1,95 pg/ml für BNP im Plasma war die

Sensitivität nur 68 % und die Spezifität 79 %, was für eine klinische Anwendung nicht ausreichend ist (DEFRANCESCO et al., 2007).

### **3.1.2. NT-proBNP**

NT-proBNP erwies sich inzwischen in zahlreichen Studien als exzelter kardiovaskulärer Biomarker bei Hunden.

In einigen Studien konnte für die NT-proBNP-Konzentration kein signifikanter Zusammenhang mit Alter, Geschlecht oder Gewicht bei gesunden Hunden gezeigt werden (BOSWOOD et al., 2008; OYAMA et al., 2008; KELLIHAN et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnten andere Autoren jedoch Zusammenhänge zwischen der NT-proBNP-Konzentration und diesen Faktoren nachweisen. In einer Studie von OYAMA und Mitarbeitern (2008) wiesen gesunde Rassehunde signifikant höhere NT-proBNP-Medianwerte auf als gesunde Mischlinge (OYAMA et al., 2008). In einer Studie zur Dilatativen Kardiomyopathie bei Hunden der Rasse Dobermann zeigten gesunde Hunde, die älter als acht Jahre waren, signifikant höherer NT-proBNP-Plasmakonzentrationen als die jüngeren Kontrollhunde (WEISS et al., 2011). In einer Studie von ETTINGER und Mitarbeitern (2012) zeigte sich eine positive Korrelation der NT-proBNP-Konzentration mit dem Alter bezogen auf alle herzgesunden und herzkranken Gruppen. Es zeigte sich außerdem ein schwacher Zusammenhang mit dem Reproduktionsstatus der Hunde. Keine Korrelation konnte mit dem Gewicht oder Geschlecht nachgewiesen werden (ETTINGER et al., 2012).

Die NT-proBNP-Konzentration zeigt relativ starke individuelle zeitliche Schwankungen bei gesunden Hunden. KELLIHAN und Mitarbeiter (2009) führten über drei Wochen drei NT-proBNP-Messungen aus Plasma und Serum durch. Sie konnten zeigen, dass die Konzentrationen von NT-proBNP aus dem Serum signifikant höher waren, als jene aus dem Plasma. Außerdem zeigten mehr als die Hälfte der Hunde mindestens einmal eine NT-proBNP-Konzentration im Serum von über 500 pmol/l und fast ein Drittel der Hunde hatte mindestens einmal einen Wert über 500 pmol/l im Plasma. Bei 20 % der Hunde schwankten Minimal- und Maximalwert von NT-proBNP um 200 pmol/l im Verlauf der Messungen (KELLIHAN et al., 2009).

Wie beim Menschen ist auch bei Hunden mit renaler Dysfunktion die NT-proBNP-Konzentration signifikant erhöht. In einer Pilotstudie von SCHMIDT

und Mitarbeitern (2009) zeigten acht herzgesunde Hunde mit Niereninsuffizienz signifikant höhere NT-proBNP-Konzentrationen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (SCHMIDT et al., 2009). Diese Ergebnisse wurden in den Untersuchungen von RAFFAN und Mitarbeitern (2009) bestätigt. Hunde mit Azotämie zeigten NT-proBNP-Konzentrationen, die in dieser Höhe normalerweise Hinweis auf eine Herzkrankheit geben (RAFFAN et al., 2009).

Die NT-proBNP-Konzentration korrelierte positiv mit dem LA:Ao (OYAMA et al., 2008; CHETBOUL et al., 2009; TAKEMURA et al., 2009; ETTINGER et al., 2012). Es gab außerdem eine positive Korrelation mit dem LVIDD (FINE et al., 2008; ETTINGER et al., 2012).

Die NT-proBNP-Konzentration wurde in mehreren Studien zur Unterscheidung zwischen herzkranken und gesunden Hunden verwendet. So zeigten Hunde mit Mitralsuffizienz oder DCM eine signifikant höhere Konzentration von NT-proBNP im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Bei einem Cut-off-Wert von 445 pmol/l konnten herzkranke Hunde mit einer Sensitivität von 83,2 % und einer Spezifität von 90 % von gesunden Hunden unterschieden werden (OYAMA et al., 2008).

Bei Beaglen mit induzierter Aortenstenose war die Konzentration von NT-proBNP sowohl drei als auch sechs Monate nach dem Eingriff signifikant erhöht. Es ist somit ein guter Marker zur Diagnostik von frühem ventrikulärem Remodelling aufgrund einer Aortenstenose (HORI et al., 2008).

In einer Studie von TARNOW und Mitarbeitern (2009) wurden Cavalier King Charles Spaniels mithilfe der NT-proBNP-Konzentration auf Mitralsuffizienz untersucht. Es wurde ein Cut-off-Wert von 299 pmol/l zur Differenzierung zwischen gesunden Hunden und solchen mit moderater bis schwerer Mitralsuffizienz angegeben. Die Sensitivität betrug 82 % die Spezifität 50 %. (TARNOW et al., 2009). Hunde der Rasse Dobermann mit DCM zeigten ebenfalls signifikant höhere NT-proBNP-Werte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (WEISS et al., 2011).

Bei Hunden mit experimentell ausgelöster pulmonärer Hypertension war in schweren Fällen die Konzentration von NT-proBNP erhöht. Leichte Formen konnten mithilfe von NT-proBNP nicht diagnostiziert werden (HORI et al., 2012). Die Plasma-NT-proBNP-Konzentration könnte sich auch bei akuten oder subakuten myokardialen Schäden als diagnostischer Marker eignen. So war die

Plasma-NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit experimentell ausgelöster asymptomatischer myokardialer Ischämie kurz nach der Schädigung signifikant erhöht und diese Erhöhung blieb über mehrere Tage bestehen. Innerhalb von sechs Monaten sanken die Werte durch ventrikuläres Remodelling wieder auf die Ausgangswerte ab (HORI et al., 2012).

In einer groß angelegten Studie mit 1134 Hunden mit unterschiedlichen Herzkrankheiten ergab sich ein Cut-off-Wert von 847 pmol/l zur Feststellung, ob es sich bei den Symptomen der Patienten um eine Herzkrankheit oder um eine andere Erkrankung handelt. Die Sensitivität lag bei 68,2 % und die Spezifität bei 83 %. Bei einem Wert von über 900 pmol/l wird von den Autoren eine weitere kardiale Abklärung empfohlen. Es zeigte sich außerdem, dass die NT-proBNP-Konzentration bei Rechtsherzversagen niedriger ist als bei Linksherzversagen. Die höchsten NT-proBNP-Werte wurden bei bilateralem Herzversagen gemessen (ETTINGER et al., 2012).

HASSDENTEUFEL und Mitarbeiter (2012) ermittelten in ihrer Studie folgende Richtwerte: Liegt die NT-proBNP-Konzentration unter 500 pmol/l, so liegt wahrscheinlich keine Herzkrankheit oder eine Herzkrankheit ohne erhöhte Wandspannung vor. Liegt die NT-proBNP-Konzentration im Bereich 500 - 900 pmol/l, so liegt möglicherweise eine asymptomatische erworbene Herzkrankheit ohne erhöhte Wandspannung oder eine respiratorische Krankheit mit leichter pulmonaler Hypertonie vor. Liegt die NT-proBNP-Konzentration über 900 pmol/l, so handelt es sich wahrscheinlich um ein kongestives Herzversagen, eine asymptomatische angeborene Herzkrankheit mit erhöhter Wandspannung, eine schwere pulmonale Hypertonie oder eine Sepsis (HASSDENTEUFEL et al., 2012).

Die NT-proBNP-Konzentration wurde inzwischen in mehreren Studien zur Unterscheidung zwischen kardialen und nichtkardialen Ursachen für Dyspnoe verwendet.

In einer Studie mit 77 Hunden konnte gezeigt werden, dass Hunde mit respiratorischen Ursachen für Husten oder Dyspnoe signifikant niedrigere Werte von NT-proBNP aufwiesen als Hunde mit kardialen Ursachen. Im Rahmen dieser Studie wurde der Testkit VETSIGN™ Canine CardioSCREEN NT-proBNP der Firma Guildhay Limited England validiert. Die Autoren gaben einen Cut-off-Wert von 210 pmol/l an, mit einer Sensitivität von 85 % und einer Spezifität von

82,4 %. Dieser Cut-off-Wert wurde vom Hersteller übernommen (BOSWOOD et al., 2008). FINE und Mitarbeiter (2008) untersuchten 46 Hunde mit Dyspnoe oder Husten und stellten fest, dass die Konzentration von NT-proBNP im Plasma bei Hunden mit Herzkrankheiten signifikant höher war (Median: 2544 pmol/l) als bei Hunden mit respiratorischen Krankheiten (Median: 357 pmol/l). Bei allen 21 Hunden mit respiratorischer Dyspnoe lag die NT-proBNP-Konzentration unter 800 pmol/l, bei 23 der 25 herzkranken Hunde (96 %) war die NT-proBNP-Konzentration höher als 1400 pmol/l (FINE et al., 2008). In einer weiteren Studie konnten bei einem NT-proBNP-Wert über 1158 pmol/l Hunde mit kardialen von Hunden mit respiratorischen Ursachen für Husten oder Dyspnoe mit einer Sensitivität von 85,5 % und eine Spezifität von 81,3 % unterschieden werden. In diese Studie wurden auch Hunde aufgenommen, die neben einer primären respiratorischen Ursache für Dyspnoe zusätzlich eine asymptomatische Mitralsuffizienz hatten (OYAMA et al., 2009). Ein Cut-off-Wert von 713,5 pmol/l wurde zur Unterscheidung nichtkardialen Hustens von Husten aufgrund von Mitralsuffizienz mit Herzversagen angegeben. Es ergab sich eine Sensitivität von 91,3 % und eine Spezifität von 85,7 % (TAKEMURA et al., 2009). In der Studie von ETTINGER und Mitarbeitern (2012) mit 1134 Hunden war die durchschnittliche NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit nichtkardialem Husten oder Dyspnoe ebenfalls signifikant niedriger (448 pmol/l), als bei Hunden mit kardialem Husten oder Dyspnoe (1446 pmol/l) (ETTINGER et al., 2012).

In der Gruppe der Hunde mit nichtkardialer Dyspnoe in der Studie von HASSDENTEUFEL und Mitarbeitern (2012) lag die mediane NT-proBNP-Konzentration bei 876 pmol/l, wobei die Hunde dieser Gruppe nicht alle herzgesund waren, jedoch wurde eine respiratorische Ursache für die Dyspnoe diagnostiziert. Die Gruppe der Hunde mit kardialer Dyspnoe zeigte eine mediane NT-proBNP-Konzentration von 2000 pmol/l (HASSDENTEUFEL et al., 2012).

Eine weitere vielversprechende Anwendung von NT-proBNP bei Hunden ist die Diagnose einer asymptomatischen oder okkulten Phase einer Herzkrankheit. In diesem Stadium ist eine frühe Diagnose notwendig, um das Fortschreiten zu beobachten und, falls möglich, therapeutisch einzutreten, bevor klinische Symptome auftreten.

So zeigten sich bei Hunden mit asymptomatischer Mitralsuffizienz signifikant höhere NT-proBNP-Konzentrationen als bei herzgesunden Hunden (CHETBOUL et al., 2009). Vor allem aber bei der dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns wurde NT-proBNP inzwischen schon mehrfach als Marker zur frühen Erkennung der Krankheit verwendet. In einer Studie mit 100 Hunden der Rasse Dobermann wurde die Kombination von 24-Stunden-EKG (Holter) und Messung von NT-proBNP untersucht. Es ergab sich eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 93,2 % zur Erkennung der von DCM betroffenen Hunde. Die Hunde im okkulten Stadium der DCM wiesen bereits signifikant höhere Werte auf als die nichtbetroffenen Hunde (MORRIS et al., 2009). WEISS und Mitarbeiter (2011) untersuchten 328 Hunde der Rasse Dobermann in verschiedenen Krankheitsstadien der DCM. In allen Stadien war die NT-proBNP-Konzentration signifikant erhöht. Sehr vielversprechend erwies sich die Messung der NT-proBNP-Konzentration im Screening von Hunden der Rasse Dobermann auf Vorliegen einer okkulten DCM. Die Hunde der "last-normal"-Gruppe, also Hunde mit normalen Befunden in Echokardiographie und 24-Stunden-EKG, zeigten bereits eine signifikante Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Vermutlich führen bereits Veränderungen auf zellulärer Ebene zu einer vermehrten Ausschüttung von NT-proBNP, noch bevor morphologische Veränderungen am Herz durch konventionelle Diagnostik festgestellt werden können. Auch bei Hunden mit mehr als 100 ventrikulären Extrasystolen (VES) ohne echokardiographische Hinweise auf eine Volumenüberladung oder systolische Dysfunktion war die Konzentration von NT-proBNP erhöht. Bei einem Cut-off-Wert von 400 pmol/l konnten Echoveränderungen mit einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 75 % vorhergesagt werden. Bei Werten von NT-proBNP über 550 pmol/l waren Echoveränderungen sehr wahrscheinlich. Liegt NT-proBNP über dem Cut-off-Wert von 400 pmol/l empfehlen die Autoren engmaschigere Kontrollen (WEISS et al., 2011).

Auch zur Einschätzung des Schweregrads von Herzkrankheiten hat sich NT-proBNP in der Veterinärmedizin bereits als sehr hilfreich erwiesen. So korreliert die NT-proBNP-Konzentration mit dem Schweregrad der Herzkrankheit. Bei Patienten der ISACHC-Klassen II und III und einem Herzgeräusch von Grad 5 zeigten sich signifikant höhere Werte als bei Patienten

der Klasse I. Werte über 1725 pmol/l bei herzkranken Hunden gaben Hinweis auf das Vorliegen eines Herzversagens, wohingegen bei Werten unter 820 pmol/l ein Herzversagen unwahrscheinlich war. Die NT-proBNP-Konzentration korrelierte außerdem mit dem Vertebral Heart Score (VHS) und die Autoren gaben einen Cut-off-Wert von 680 pmol/l zur Unterscheidung von herzkranken Hunden ohne Kardiomegalie und solchen mit Kardiomegalie an. Bei diesem Cut-off-Wert ergab sich eine Sensitivität von 92,7 % und eine Spezifität von 67 % (OYAMA et al., 2008). Es konnte bestätigt werden, dass die NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit Mitralsuffizienz mit dem Schweregrad der Herzkrankheit korreliert (PIANTEDOSI et al., 2009; SERRES et al., 2009; TAKEMURA et al., 2009; TARNOW et al., 2009).

Bei Cavalier King Charles Spaniels in unterschiedlichen Krankheitsstadien kam es zu einer signifikanten Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration bei schwerer Mitralsuffizienz mit und ohne Herzversagen. Bei leichter Mitralsuffizienz konnte kein Unterschied zu den Werten bei gesunden Hunden festgestellt werden. Anhand der NT-proBNP-Konzentration konnte das Fortschreiten der Mitralsuffizienz abgeschätzt werden (TARNOW et al., 2009).

SERRES und Mitarbeiter (2009) untersuchten 75 Hunde mit symptomatischer Mitralsuffizienz. Bei Hunden die der ISACHC Klasse III zugewiesen wurden, waren die Werte von NT-proBNP signifikant höher als bei Hunden der Klasse II. Es wurde außerdem überprüft, ob sich die NT-proBNP-Konzentration als Vorhersagewert für die Mortalität in einer Zeitspanne von sechs Monaten eignet. Die Werte bei den Hunden, die innerhalb dieses Zeitraumes starben, waren signifikant höher als bei den Überlebenden. Die höchste Sensitivität (80 %) und Spezifität (73 %) zur Vorhersage der Gesamtmortalität innerhalb von sechs Monaten wurde bei einem Cut-off-Wert von 1500 pmol/l erreicht (SERRES et al., 2009). Bei 72 Hunden mit asymptomatischer Mitralsuffizienz (ISACHC Klasse I) war die NT-proBNP Konzentration eine von acht Variablen, welche als Vorhersagewerte für Tod oder Herzversagen innerhalb von zwölf Monaten bestimmt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass bei den Hunden, die innerhalb von zwölf Monaten starben oder eine dekompensierte Herzinsuffizienz entwickelten, die initiale NT-proBNP-Konzentration bei Einlieferung signifikant höher war, als bei den Hunden, die über den Zeitraum stabil blieben. Ein Cut-off-Wert von 466 pmol/l ergab eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 76 % für die Vorhersage einer Progression der Herzkrankheit innerhalb von

zwölf Monaten (CHETBOUL et al., 2009).

NT-proBNP und LVEDDN waren die einzigen beiden Variablen, die unabhängig mit einer erhöhten Gesamtmortalität innerhalb eines Jahres korrelieren. Es wurden 100 Hunde mit symptomatischer (16 %) und asymptomatischer (84 %) Mitralsuffizienz untersucht. Bei Hunden, welche bei der Erstuntersuchung einen NT-proBNP-Wert über 740 pmol/l zeigten, war die Gefahr eines kardialbedingten Todes innerhalb von einem Jahr signifikant höher als bei Hunden mit Werten unter 740 pmol/l. Für jede Erhöhung um 100 pmol/l stieg die Gesamtmortalität um 7 % an (MOONARMART et al., 2010).

Es wurde außerdem die Überlebenszeit von Hunden untersucht, die mit einer respiratorischen Symptomatik aufgrund von Herzversagen aufgrund von MMVD vorgestellt wurden. Die Hunde hatten vorberichtlich keine Episoden eines früheren Herzversagens und waren noch nicht vorbehandelt. Es wurde bei der Erstvorstellung die NT-proBNP-Konzentration bestimmt und eine Standardbehandlung mit Furosemid und Pimobendan eingeleitet. Nach sieben bis 30 Tagen wurden die Hunde erneut untersucht und die NT-proBNP-Konzentration gemessen. Die beste Vorhersage der Überlebenszeit war anhand der Messung von NT-proBNP nach sieben bis 30 Tagen und dem klinischen Status bei der Erstvorstellung möglich. Hunde mit NT-proBNP-Werten unter 965 pmol/l bei der Folgeuntersuchung überlebten signifikant länger als Hunde mit Werten über 965 pmol/l (WOLF et al., 2012).

In der Studie von ETTINGER und Mitarbeitern (2012) wurden die NT-proBNP-Konzentrationen von 1134 Hunden mit Herzkrankheiten unterschiedlicher Schwere bestimmt. Es ergab sich eine signifikante Korrelation der NT-proBNP-Konzentration und dem Stadium der Herzkrankheit, außerdem stieg die Konzentration signifikant an, wenn es zu einem Herzversagen kam (ETTINGER et al., 2012).

Die Kombination verschiedener Biomarker erscheint sehr vielversprechend und könnte eine höhere Aussagekraft als die Messung eines einzelnen Markers besitzen. Bei Hunden mit MMVD wurden NT-proBNP und cTnI gemeinsam gemessen, um die Prognose einzuschätzen. Die Kombination dieser beiden Marker war zur Identifikation von Hunden mit kürzeren Überlebenszeiten besser geeignet als die Messung des jeweiligen Einzelmarkers. Der zeitliche Verlauf der Konzentrationen beider Marker ließ außerdem Rückschlüsse auf die Todesursache (kardial versus nicht-kardial) zu. Bei beiden Markern stieg die Konzentration bei

kardialen Todesursachen signifikant schneller an (HEZZELL et al., 2012).

Eine Therapie, die sich an der NT-proBNP-Konzentration orientiert ist eine weitere wichtige Indikation zur Messung dieses Biomarkers. In einer Pilotstudie wurden Serienmessungen bei Hunden mit Mitralsuffizienz unter Behandlung mit dem Diuretikum Furosemid durchgeführt. Neben der herkömmlichen Vorgehensweise mit klinischer Untersuchung, Laborwerten, Herzultraschall und Thoraxröntgen wurden Serienmessungen der NT-proBNP-Konzentration durchgeführt. Die Dosierung der Diuretika wurde anhand der Ergebnisse der konventionellen Diagnostik ohne Kenntnis des Resultats der NT-proBNP-Messung festgelegt. Bei Hunden, bei denen es im Verlauf der Therapie zu einem Abfall der NT-proBNP-Werte kam, war es signifikant wahrscheinlicher, dass sich der behandelnde Tierarzt für eine Reduktion der Furosemiddosis entschied, und dass röntgenologische Hinweise auf ein Herzversagen fehlten. Kam es jedoch zu einem Anstieg der NT-proBNP-Werte im Verlauf der Behandlung, waren eine Entscheidung zur Erhöhung der Furosemiddosis und röntgenologische Hinweise auf das Vorliegen eines Herzversagens signifikant wahrscheinlicher. Diese Ergebnisse zeigen, dass die NT-proBNP-Konzentration im Plasma Veränderungen im klinischen Status anzeigen und dem Kliniker helfen kann, über die Notwendigkeit und Intensität einer Therapie zu entscheiden (ACHEN et al., 2009).

### **3.2. Messung von NT-proBNP bei der Katze**

Auch bei der Katze wird die Konzentration von NT-proBNP durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Bei Katzen mit Hypertension und gleichzeitiger Niereninsuffizienz werden signifikant höher Werte gemessen als bei gesunden Katzen oder bei Katzen mit einer Niereninsuffizienz ohne Hypertension (LALOR et al., 2009). Auch die Schilddrüsenfunktion hat einen Einfluss auf die NT-proBNP-Konzentration, die bei Katzen mit Hyperthyreose signifikant höher ist als bei Katzen mit normaler Schilddrüsenfunktion (MENAUT et al., 2012).

Es wurden mehrere Untersuchungen zur Nutzung von BNP und NT-proBNP zur Diagnostik von Herzkrankheiten bei der Katze durchgeführt. CONNOLLY und Mitarbeiter (2008) bestimmten die Konzentrationen von NT-proANP und NT-proBNP bei 78 Katzen. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem NT-proBNP dazu geeignet ist, Katzen mit asymptomatischer Herzkrankheit von gesunden

Katzen und Katzen mit chronischem Herzversagen (CHF) zu unterscheiden (CONNOLLY et al., 2008). Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Katzen mit CHF die Natriuretischen Peptide signifikant höher waren als bei gesunden (FOX et al., 2009; HSU et al., 2009; ZIMMERING et al., 2009).

Auch bei Katzen wurde untersucht, ob anhand der NT-proBNP-Konzentration eine Unterscheidung zwischen respiratorischen und kardialen Ursachen für Dyspnoe möglich ist. In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass anhand der NT-proBNP-Konzentration bei Katzen mit Dyspnoe zwischen CHF, verursacht durch verschiedene Kardiomyopathien, und primär respiratorischen Krankheiten unterschieden werden kann (WEISS et al., 2008; CONNOLLY et al., 2009; FOX et al., 2009).

Die NT-proBNP-Konzentrationen waren bei Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie (HCM) jedes Stadiums signifikant höher als in den gesunden Kontrollgruppen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass bei milder und moderater HCM kein signifikanter Unterschied in den NT-proBNP-Werten vorliegt, jedoch Katzen beider Stadien signifikant niedrigere Werte hatten als Katzen mit schwerer HCM (CONNOLLY et al., 2008; FOX et al., 2009; WEISS et al., 2011). WEISS und Mitarbeiter (2011) gaben einen Cut-off-Wert von 100 pmol/l an, ab dem eine kardiologische Abklärung mittels Echokardiographie durchgeführt werden sollte. Werte im Bereich von 100 bis 150 pmol/l gelten als verdächtig für eine Herzkrankheit, Werte über 150 pmol/l sind sehr verdächtig für eine Herzkrankheit (WEISS et al., 2011). Auch Katzen mit okkulter Kardiomyopathie sowie Katzen mit asymptomatischer Herzvergrößerung können anhand der Messung der NT-proBNP-Konzentration identifiziert werden (FOX et al., 2011; TOMINAGA et al., 2011).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Patientengut**

Insgesamt wurden 124 Hunde im Rahmen dieser Studie untersucht. Dabei handelte es sich um Patienten, die in der kardiologischen oder internistischen Sprechstunde der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgestellt wurden oder sich im Privatbesitz von Studierenden und Mitarbeitern befanden. 73 Hunde waren männlich, und 51 Hunde waren weiblich, 14 der männlichen und 26 der weiblichen Hunde waren kastriert.

Von den 124 Hunden waren 48 klinisch gesund (Kontrollgruppe) und 76 zeigten chronisch oder akut Dyspnoe oder Husten.

Die Hunde wurden anhand der Ergebnisse der Röntgenuntersuchung des Thorax und der Echokardiographie in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Klinisch gesunde Hunde (n = 48)

Gruppe 2: Hunde mit respiratorischen Ursachen für Husten oder Dyspnoe (n = 57)

Gruppe 3: Hunde mit kardialen Ursachen für Husten oder Dyspnoe (n = 19)

#### **2. Einschlusskriterien**

Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten die Hunde akut oder chronisch Husten und/oder Dyspnoe zeigen.

Die Hunde in der Kontrollgruppe mussten in der klinischen Untersuchung, in den Laborwerten, im Herzultraschall und im Thorax-Röntgen unauffällig sein.

#### **3. Ausschlusskriterien**

Hunde, bei denen eine Azotämie vorlag, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Die im klinikeigenen Labor gültigen Obergrenzen der Referenzwerte betrugen 10,78 mmol/l für Harnstoff und 125 µmol/l für Kreatinin.

#### **4. Untersuchungen**

Es wurden eine Anamnese erhoben, eine allgemeine klinische und kardiovaskuläre Untersuchung, eine Röntgenuntersuchung des Thorax in zwei

Ebenen, eine Echokardiographie, sowie eine venöse Blutprobenentnahme zur Bestimmung der Laborparameter durchgeführt.

#### **4.1. Anamnese**

Vor Beginn der klinischen Untersuchung wurden Rasse, Geschlecht, sowie Alter und Gewicht der Hunde ermittelt, und es wurde der Vorbericht aufgenommen. Hierbei wurde insbesondere erfragt, ob kardiologische oder respiratorische Symptome, wie Husten, Atemnot oder Leistungsinsuffizienz vorlagen.

#### **4.2. Klinische Untersuchung**

Es wurde eine ausführliche Allgemeinuntersuchung, sowie eine kardiovaskuläre Untersuchung durchgeführt. Es erfolgten eine palpatorische Beurteilung des Pulses an der *Arteria femoralis*, eine Beurteilung der Schleimhäute sowie ein sorgfältige Auskultation von Herz und Lunge.

#### **4.3. Laborparameter**

Ein Blutbild mit Differenzialblutbild wurde angefertigt; die Serumparameter Harnstoff, Kreatinin, Alkalische Phosphatase, Alaninaminotransferase, Bilirubin, Gesamteiweiß, Albumin und Glucose sowie die Konzentration der Elektrolyte (Kalium, Phosphat, Natrium und Chlorid) wurde bestimmt.

#### **4.4. Röntgen des Thorax in zwei Ebenen**

Röntgenbilder des Thorax wurden in zwei Ebenen (latero-lateraler und ventro-dorsaler Strahlengang) angefertigt. Die Aufnahmen wurden sofern möglich immer in vollständiger Inspiration gemacht. Bei der Auswertung wurde besonderes Augenmerk auf das Herz, die großen Gefäße, sowie Lunge und Trachea gelegt. Um die Herzgröße objektiv beurteilen zu können wurde der VHS gemessen.

#### **4.5. Echokardiographie**

Eine echokardiographische Untersuchung zur Beurteilung von Kammergrößen, Wanddicke, Wandbewegungen, Klappenformen und –bewegungen, der großen, vom Herz abgehenden Blutgefäße, der anatomischen Verhältnisse und der kardialen Funktion wurde durchgeführt.

##### **4.5.1. Allgemeines**

Die Hunde wurden mit dem Ultraschallgerät Vivid® 7 (Firma General Electric Medical Systems, Horten, Norwegen) in der Abteilung für Tierkardiologie der Medizinischen Kleintierklinik der LMU untersucht. Für die Patienten wurden in

Abhängigkeit vom Gewicht zwei verschiedene Schallköpfe mit einer Frequenz von 3,5/8 MHz sowie einer Frequenz von 2,0/3,5 MHz eingesetzt. Die Harmonic-Einstellungen wurden zwischen 3,5/6,9 und 2,0/4,3 MHz gewählt.

Alle Hunde wurden ohne Sedation in rechter und linker Seitenlage auf einem speziellen kardiologischen Untersuchungstisch mit einer Aussparung auf Höhe des Herzens, durch den der Schallkopf aufgesetzt werden kann, untersucht. Die zu untersuchenden Stellen wurden mit ausreichend 70-prozentigem Alkohol und Ultraschallkontaktgel vorbereitet, um eine bessere Ankopplung des Schallkopfes zu ermöglichen. Während der gesamten Ultraschalluntersuchung wurde ein mitlaufendes Ein-Kanal-EKG aufgezeichnet.

Es wurden zweidimensionale Standard-, sowie M-Mode- (Motion Mode), Blutfluss- und Gewebedoppleraufnahmen angefertigt. Die dabei verwendete Terminologie und Orientierung entsprach den Standards des Komitees für Echokardiographie des American Colleges of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) (THOMAS et al., 1993).

#### **4.5.2. 2D-Ultraschall**

Die Hunde wurden zunächst von der rechten Seite untersucht. Im rechtsseitigen parasternalen Längsachsenschnitt wurden zunächst subjektiv die myokardiale Kontraktilität sowie die Dimensionen der Vorhöfe und Ventrikel beurteilt. Außerdem wurden Morphologie und Motilität der Atrioventrikularklappen und deren Aufhängeapparat dargestellt und beurteilt. Anschließend wurde der linksventrikuläre Ausflusstrakt dargestellt und hinsichtlich morphologischer Veränderungen untersucht. Danach wurde die rechtsparasternale Kurzachse in zwei Ebenen beurteilt. Auf Höhe der Papillarmuskeln wurden die Dimensionen von linkem und rechtem Ventrikel, sowie die systolische Funktion beurteilt. Basal wurden nach der „Schwedischen Methode“ die Querschnitte von linkem Vorhof (LA) und der Aorta (Ao) ausgemessen und das Verhältnis der beiden zueinander bestimmt. Zusätzlich wurde der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt auf mögliche Veränderungen hin untersucht.

Es folgte die Untersuchung in linker Seitenlage. Im linksapikalen Vier- und Fünfkammerblick wurden erneut Kammerdimensionen und Globalfunktion beurteilt. Es wurden außerdem der links- und in einer weiteren Schnittebene der rechtsventrikuläre Ausflusstrakt subjektiv untersucht.

#### **4.5.3. M-Mode-Echokardiographie**

Es wurden M-Mode-Aufnahmen des linken Ventrikels angefertigt, um eine objektive Beurteilung der linksventrikulären Dimensionen zu ermöglichen. Zunächst wurde von rechts in der parasternalen Längsachse die Messung apikal der maximalen Mitralklappenöffnung senkrecht zur langen Achse der linken Kammer durchgeführt. Dann wurde eine weitere M-Mode-Messung in der rechtsparasternalen Kurzachse auf Höhe der Papillarmuskeln direkt unterhalb der Mitralklappe durchgeführt.

Dabei wurde der Durchmesser des interventrikulären Septums, des linken Ventrikels und der freien Wand des linken Ventrikels in Systole und Diastole gemessen. Aus den ermittelten Messwerten wurde die Verkürzungsfraktion berechnet.

#### **4.5.4. Dopplerechokardiographie**

Mit dem Blutflussdoppler wurden alle vier Herzklappen auf Turbulenzen, Insuffizienzen und Stenosen untersucht. Des Weiteren wurden das atrio- und interventrikuläre Septum auf mögliche Defekte hin kontrolliert. Aorten- und Pulmonalflussgeschwindigkeit wurden zusätzlich zur Farbdoppleruntersuchung mit einem Spektraldoppler (PW- und CW-Doppler) gemessen.

### **5. Messung von NT-proBNP**

Bei allen Hunden wurde die NT-proBNP-Konzentration mittels eines ELISA im Plasma bestimmt. Für die Messungen wurde der Test VC4010 VETSIGN™ Canine CardioSCREEN NT-proBNP der Firma Guildhay Limited England verwendet.

#### **5.1. Blutprobenentnahme**

Die Blutprobenentnahme mit einer sterilen Einmalkanüle erfolgte entweder aus der *Vena cephalica antebrachii* oder aus der *Vena jugularis* nach Rasur und Desinfektion der Entnahmestelle. Das Blut wurde in auf -20°C vorgekühlte Kalium-beschichtete Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Röhrchen mit 5 ml Volumen (K-EDTA 5 ml, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nürnbrecht, Deutschland) entnommen. Vor und nach der Blutentnahme wurden die Röhrchen auf Eis gelagert.

## 5.2. Blutprobenverarbeitung

Das Blut wurde direkt nach der Abnahme bei 4° C und 3600 Umdrehungen für zehn Minuten zentrifugiert. Jeweils 1 ml Plasma wurde in Polystyrenröhren abpipettiert und bei -70° C bis zur Durchführung des ELISA gelagert.

## 5.3. Testprinzip

Bei dem verwendeten Test handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, welcher dazu dient, die Immunoreaktivität von NT-proBNP in kaninen Serum- oder Plasmaproben zu messen. Für eine möglichst hohe Spezifität enthält der Testkit zwei gereinigte immunoaffine Antikörper, welche aus Schafseren gewonnen werden und spezifisch an kanines NT-proBNP Antigen binden. In der Mikrotiterplatte ist der Capture-Antikörper Anti-NT-proBNP (25 – 41) enthalten, welcher in jedem Well aufgetragen ist. Der Tracer besteht aus dem mit Meerrettich konjugierten Erkennungs-Antikörper Anti-NT-proBNP (1 – 22). In der Inkubationsphase werden die Standards bzw. Plasmaproben gemeinsam mit dem Tracer in die Wells gegeben. Vorhandenes NT-proBNP bindet an den in den Wells vorhandenen Capture-Antikörper und es entsteht ein Sandwich-Komplex mit dem Erkennungs-Antikörper. Die Mikrotiterplatte wird gewaschen und damit unspezifisch gebundenes Material entfernt. Daraufhin wird das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt, und das gebundene NT-proBNP kann durch einen enzymkatalysierten Farbumschlag in einen Mikrotiterplattenleser quantifiziert werden. Die Farbintensität ist dabei direkt proportional zur Menge an NT-proBNP in der jeweiligen Probe. Aus den gemessenen Werten wird eine Standardkurve erstellt; anhand dieser Kurve werden die NT-proBNP-Konzentrationen der einzelnen Proben errechnet.

Der Hersteller gibt nach Evaluierung des Tests folgende Werte vor: zur Unterscheidung von gesunden Hunden und Hunden mit respiratorischen Ursachen für Dyspnoe versus Hunde mit kardialen Krankheiten ergaben sich eine Area Under the Curve (AUC) von 95,2. Bei einem Cut-off-Wert von 210 pmol/l liegt die Sensitivität bei 85 %, die Spezifität bei 90 %, der positive prädiktive Wert (PPV) bei 94 %, der negative prädiktive Wert (NPV) bei 77 % und die Genauigkeit bei 87 %. Das Erkennungslimit liegt bei 42 pmol/l, die Intra-Assay-Präzision ergibt 6,4 % für niedrige Konzentrationen, 8,4 % für mittlere Konzentrationen und 7,1 % für hohe Konzentrationen. Die Werte für die Inter-

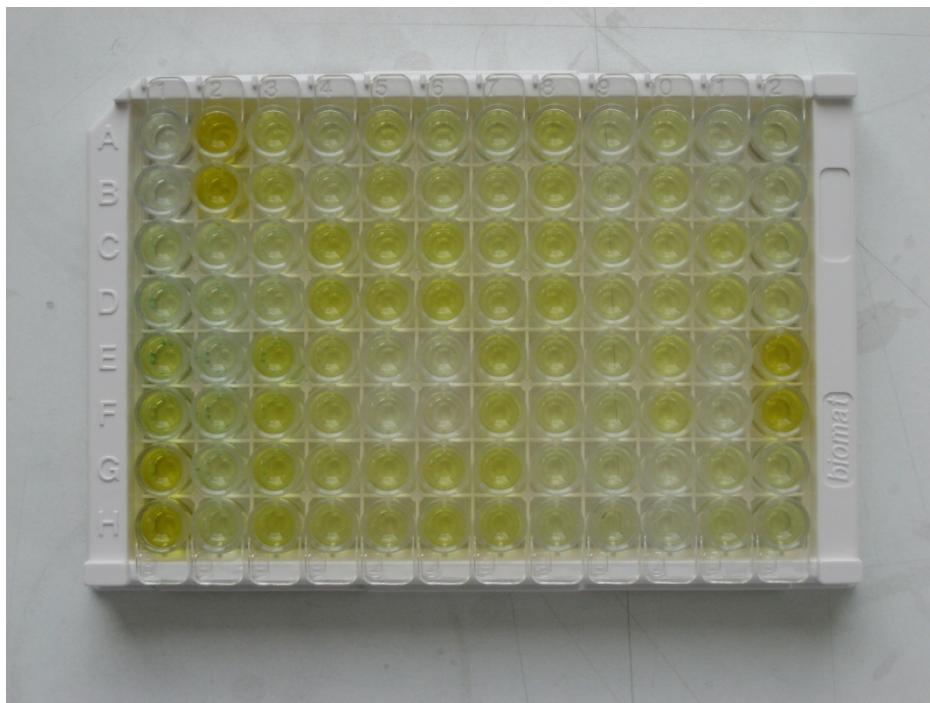
Assay-Präzision liegen bei 7,1 % für niedrige, 8,6 % für mittlere und 8,2 % für hohe Konzentrationen (BOSWOOD et al., 2008).

#### **5.4. Testdurchführung**

Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Plasmaproben und Reagenzien wurden in einem Wasserbad auf Raumtemperatur temperiert. Zuerst wurde der Waschpuffer hergestellt. Hierzu wurden die im Testkit enthaltenen 100 ml Pufferkonzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Anschließend wurden die mitgelieferten, gefriergetrockneten Standards in 0,3 ml destilliertem Wasser aufgelöst, bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und mit dem Rüttelgerät REAX 2000 der Firma Heidolph, Deutschland gut gemischt. In die ersten beiden Reihen der 96-Loch Mikrotiterplatten wurden jeweils 20 µl der mitgelieferten Standards im Doppelansatz pipettiert. Darunter, ebenfalls im Doppelansatz, wurden jeweils 20 µl der Plasmaproben pipettiert. Daraufhin wurden mit einer Mehrkanalpipette in alle Wells jeweils 200 µl Tracer zugegeben und die Platte auf dem Rüttelgerät TPM 2 der Firma Sarstedt, Deutschland für eine Minute durchmischt. Die Platte wurde danach mit einem selbstklebenden Plastikfilm abgedeckt, und es folgte eine Inkubationsphase im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Stunden.

Nach der Inkubationsphase wurde der Inhalt der Wells verworfen und die Platte wurde fünfmal mit jeweils 350 µl Waschpuffer pro Well ausgewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde die Platte dreimal auf eine Einmalhandtuch geklopft, um alle Flüssigkeitsrückstände zu entfernen. Anschließend wurden jeweils 200 µl des Substrats mit der Mehrkanalpipette in alle Wells gegeben, die Platte wieder auf dem Rüttelgerät für eine Minute durchmischt, mit Plastikfolie abgeklebt und es erfolgte eine erneute Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Abbildung 1 zeigt eine Mikrotiterplatte vor Zugabe der Stoplösung.

Anschließend wurde in jedes Well 50 µl Stoplösung pipettiert, und die Platte erneut auf dem Rüttler gut durchmischt. Direkt im Anschluss wurde die Absorptionsrate in einem ELISA-Reader (Spectra Rainbow Thermo, Firma TECAN, Österreich) mit 450 nm gemessen. Dargestellt wurden die Daten mit dem Softwareprogramm easyWIN kinetics Software Version 6.0a der Firma TECAN Deutschland GmbH.



**Abbildung 1:** Mikrotiterplatte nach Farbumschlag

### 5.5. Berechnung der NT-proBNP-Konzentration

Zur Bestimmung der NT-proBNP-Werte anhand der optischen Dichte wurden die gemessenen Werte an die Firma GUILDHAY Limited, England geschickt. Die Umrechnung in die jeweiligen Konzentrationen erfolgte dort nach der 4-Parameter-log-Formel:

$$y = (a-d)/(1+(x/c)^b) + d$$

Die Variable x bezeichnet hierbei die optische Dichte, y die zugehörige NT-proBNP-Konzentration. Die Parameter a, b, c und d wurden für jede Platte anhand der gemessenen optischen Dichten der Standardkonzentrationen durch ein Parameterschätzverfahren nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate berechnet. Die Schätzung der optimalen Parameter erfolgte nach dem Verfahren von LEVENBERG und MARQUARDT in der Implementierung des Numerik-Softwarepaketes SKILAB, Version 4.1.2 ([www.scilab.org](http://www.scilab.org), 2008) (LEVENBERG, 1944; MARQUARDT, 1963).

## 6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit den Programmen MedCalc®

Statistical Software und SPSS® (Statistical Package for the Social Science) 13.0 für Windows durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt. Die allgemein üblichen Analysen wurden mit deskriptiver und explorativer Statistik durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Die Normal- bzw. Gleichverteilung der Daten wurden anhand von Histogrammen, Q-Q-Plots sowie des Kolmogorov-Smirnov-Tests beurteilt. Mittels deskriptiver und explorativer Statistik wurden die allgemein üblichen Analysen durchgeführt.

### **6.1. Einflussfaktoren**

Der Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht auf die NT-proBNP-Konzentration in der herzgesunden Kontrollgruppe wurde untersucht. Es wurde jeweils ein Scatterplot mit Regressionsgerade, sowie Boxplots angefertigt. Verglichen wurden die Gruppen mit dem unabhängigen t-Test.

### **6.2. Vergleich der verschiedenen Gruppen**

Die verschiedenen Gruppen wurden mittels Univariatanalyse und Student-Newman-Keuls-Test auf statistische Signifikanzen untersucht.

### **6.3. Berechnung von Cut-off-Werten**

Zur Beurteilung des Potentials von NT-proBNP als Marker zur Differenzierung von kardialer und nicht-kardialer Dyspnoe wurden Receiver-Operator-Curves (ROC) erstellt und die Flächen unter den Kurven (area under the curve = AUC) berechnet. Es wurden außerdem verschiedene Cut-off-Werte auf ihre Sensitivität und Spezifität untersucht.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Patientencharakterisierung

Die am häufigsten vorkommenden Hunderassen in der Gesamtpopulation der Studie waren Dobermann (n = 16), Schäferhund und Australian Shepherd (n = 6), Dackel und Cocker Spaniel (n = 5), Golden Retriever, Yorkshire Terrier, Berner Sennenhund (n = 4), Jack Russel Terrier, Beagle und West-Highland-White-Terrier (n = 3). Hunderassen, die weniger als drei Mal vertreten waren sowie Mischlingshunde wurden zur weiteren Auswertung nach Gewichtsgruppen eingeteilt: klein: < 10 kg (n = 12), mittel: 10 - 25 kg (n = 30), groß: > 25 kg (n = 23).

In Tabelle 2 wird die Verteilung der physiologischen Parameter (Alter, Gewicht und Geschlecht) in den einzelnen Gruppen dargestellt.

**Tabelle 2:** Darstellung der Verteilung von Alter (in Jahren), Gewicht (in Kilogramm) und Geschlecht bezogen auf die gesamte Studienpopulation in den einzelnen Gruppen (MW = Mittelwert, Min = Minimum, Max = Maximum)

		Gesund	Respiratorisch	Kardial
<b>Hunde insgesamt</b>		48	57	19
<b>Alter (Jahre)</b>	<b>MW</b>	3,9	7,5	10,2
	<b>Median</b>	3	9	11
	<b>Min</b>	0,2	0,2	2
	<b>Max</b>	11	15	15
<b>Gewicht (kg)</b>	<b>MW</b>	24,3	19,9	22,4
	<b>Median</b>	25	17	17
	<b>Min</b>	2,7	2,5	9,4
	<b>Max</b>	46	59	62
<b>Geschlecht</b>	<b>weiblich</b>	26	21	4
	<b>männlich</b>	22	36	15

Das Alter war in allen Gruppen normal verteilt. Das mittlere Alter der Hunde mit kardialen Ursachen für Dyspnoe war signifikant höher ( $p = 0,05$ ) als in der herzgesunden Gruppe. Zwischen den Hunden der gesunden Gruppe und den Hunden der respiratorischen Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das mittlere Alter ( $p = 0,05$ ).

Das Gewicht war in allen Gruppen normalverteilt. Es bestand kein signifikanter Unterschied in bezug auf das mittlere Gewicht zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,05$ ).

Die Geschlechtsverteilung war in der gesunden Kontrollgruppe mit 45,8 % männlichen und 54,2 % weiblichen Tieren homogen. In der Gruppe der Hunde mit respiratorisch bedingter Dyspnoe waren 63,2 % männlich und 36,8 % weiblich, in der Gruppe mit kardiologischen Ursachen für die Symptomatik waren 79 % männlich und 21 % weiblich.

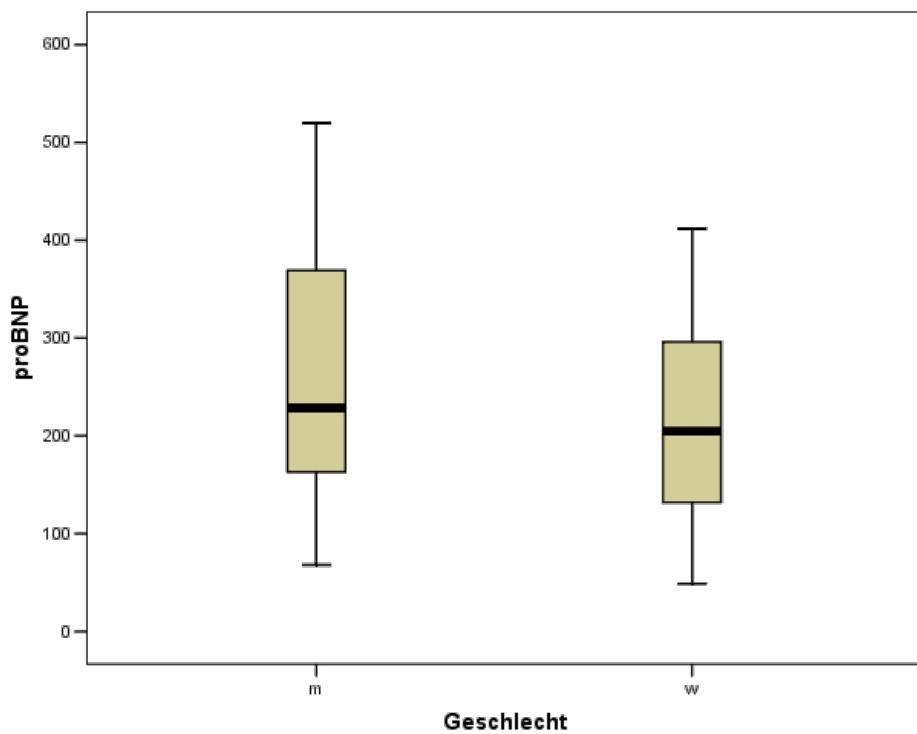
Die respiratorischen Krankheiten umfassten Pneumonie ( $n = 16$ ), Neoplasie ( $n = 6$ ), Trachealkollaps ( $n = 4$ ), Larynxparalyse ( $n = 3$ ), Zwingerhusten ( $n = 3$ ) und sonstige Krankheiten ( $n = 25$ ). Die Diagnosen der kardialen Gruppe umfassten Endokardiose ( $n = 12$ ), Kardiomyopathie ( $n = 6$ ), Trikuspidalklappendysplasie ( $n = 1$ ).

## 2. NT-proBNP

### 2.1. Einflussfaktoren

In der gesunden Kontrollgruppe wurde der Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht auf die NT-proBNP-Konzentration untersucht. Hierbei fanden sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

In Abbildung 2 sind die NT-proBNP-Konzentrationen in Bezug auf das Geschlecht dargestellt.



**Abbildung 2:** Darstellung der mittleren NT-proBNP-Konzentrationen in Bezug auf das Geschlecht (m = männlich, w = weiblich)

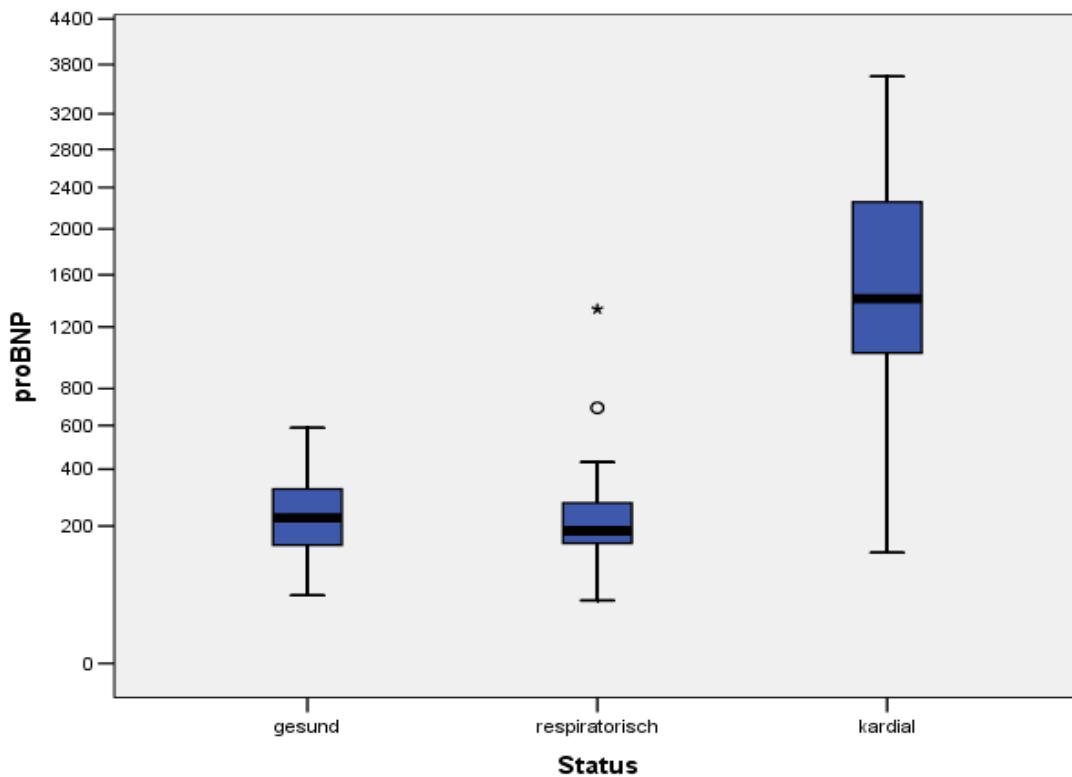
## 2.2. Vergleich kardiale *versus* respiratorische Dyspnoe

Die NT-proBNP-Konzentrationen wurden zwischen gesunden Hunden der Kontrollgruppe, Hunden mit kardial bedingter Dyspnoe und Hunden mit Dyspnoe aufgrund respiratorischer Erkrankungen verglichen. Tabelle 3 zeigt den Mittelwert, den Median, die Standardabweichung, sowie den Minimal- bzw. Maximalwert für die einzelnen Gruppen in pmol/l.

**Tabelle 3:** Darstellung der NT-proBNP-Konzentrationen in pmol/l in den verschiedenen Gruppen (n = Anzahl der Hunde, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Min = Minimum, Max = Maximum)

	Gesund	Respiratorisch	Kardial
<b>n</b>	48	57	19
<b>MW</b>	246	240	1859
<b>Median</b>	224	187	1410
<b>SA</b>	135	186	1638
<b>Min</b>	49	42	130
<b>Max</b>	588	1330	7440

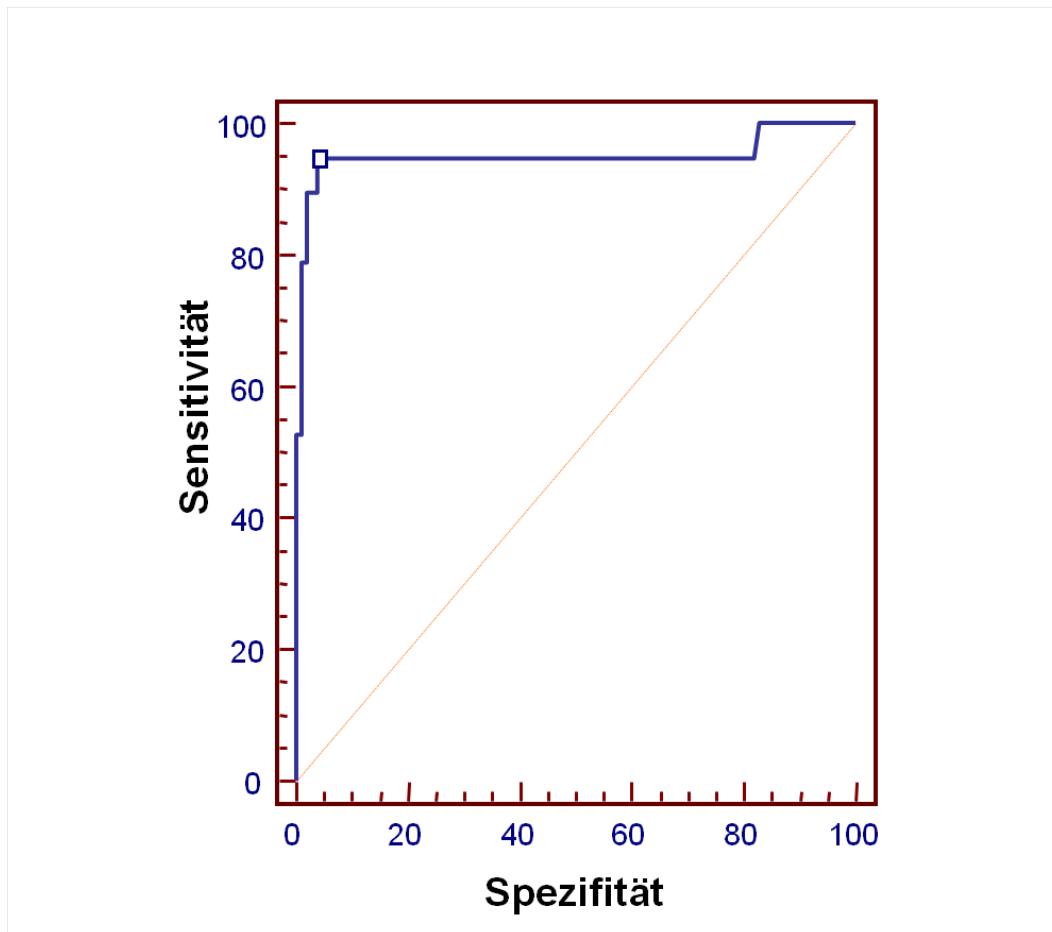
Der Mittelwert und der Median der NT-proBNP-Konzentration lagen bei Hunden mit kardial bedingter Dyspnoe mit 1859 pmol/l bzw. 1410 pmol/l höher als bei Hunden mit respiratorischen Erkrankungen (240 pmol/l bzw. 187 pmol/l) und bei gesunden Hunden (247 pmol/l bzw. 224 pmol/l), diese Unterschiede waren statistisch signifikant ( $p = 0,001$ ). Zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Hunden mit Dyspnoe aufgrund von respiratorischen Erkrankungen bestand kein signifikanter Unterschied in der NT-proBNP-Konzentration. Abbildung 3 zeigt die mittleren NT-proBNP-Konzentrationen in den einzelnen Gruppen.



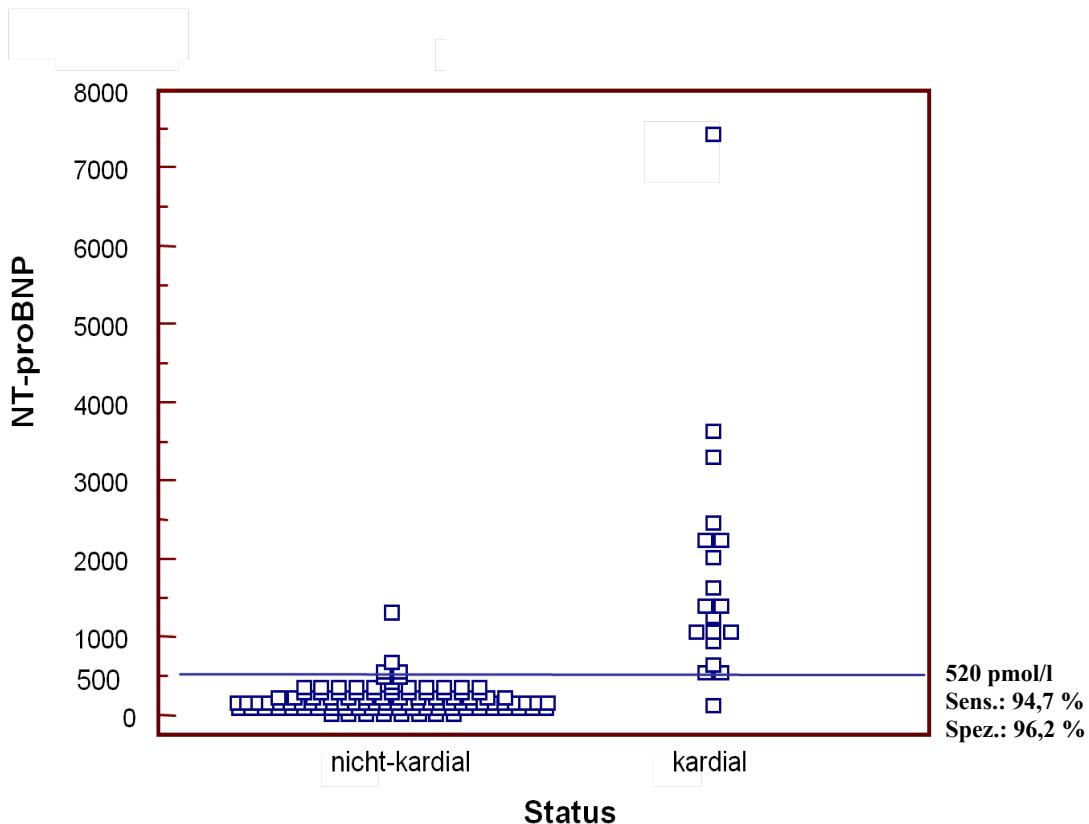
**Abbildung 3:** Darstellung der mittleren NT-proBNP-Konzentrationen in den einzelnen Gruppen

### 2.3. Cut-off

Es wurde der optimale Cut-off Wert berechnet, um zwischen kardial und respiratorisch bedingter Dyspnoe zu unterscheiden. Für einen Cut-off-Wert von 520 pmol/l ergab sich eine Sensitivität von 94,7 % und eine Spezifität von 96,2 %. Abbildung 4 zeigt die ROC-Kurve und Abbildung 5 das Dot-Diagramm für die Differenzierung zwischen kardial und respiratorisch bedingter Dyspnoe.



**Abbildung 4:** ROC-Kurve zur Unterscheidung von kardialen und nicht-kardialen (respiratorischen) Ursachen von Dyspnoe oder Husten. AUC = 0,95



**Abbildung 5:** Dot-Diagramm zur Darstellung von Sensitivität und Spezifität zur Differenzierung der Hunde mit kardialer und nicht-kardialer Dyspnoe bei einem Cut-off-Wert von 520 pmol/l

## V. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die Konzentration von NT-proBNP gut als Biomarker zur Unterscheidung von respiratorischen und kardialen Ursachen von Dyspnoe oder Husten beim Hund eignet. Die NT-proBNP-Konzentrationen waren bei Hunden mit Herzversagen signifikant höher, als bei herzgesunden Hunden mit respiratorischen Krankheiten. Zur Unterscheidung zwischen kardialen und respiratorischen Ursachen für Dyspnoe oder Husten wurde ein Cut-off-Wert von 520 pmol/l ermittelt. Dieser Cut-off-Wert weist eine gute Sensitivität von 94,7 % und eine gute Spezifität von 96,2 % auf.

Der verwendete ELISA-Testkit (VETSIGN Canine CardioSCREEN Nt-proBNP, Guildhay Ltd, UK) wurde in dieser Studie nicht neu validiert. Eine Validierung wurde in der Studie von BOSWOOD und Mitarbeitern 2008 durchgeführt, und die Ergebnisse wurden vom Hersteller übernommen. Die ermittelten Variationskoeffizienten für die Intra- und Inter-Assay-Präzisionen lagen stets unter 10 %. Die Nachweisgrenze für NT-proBNP lag bei 42 pmol/l (BOSWOOD et al., 2008).

Die Einteilung der Patienten in die einzelnen Gruppen wurde in der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München mittels Herzultraschall und Röntgen des Thorax vorgenommen. Trotz der umfangreichen durchgeführten Untersuchungen kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Patienten mit extrakardialen Ursachen für eine Erhöhung von NT-proBNP fälschlicherweise als herzgesund klassifiziert wurden. Möglicherweise lagen bei einzelnen Patienten myokardiale Schäden auf zellulärer Ebene vor, die mittels Ultraschall nicht diagnostiziert werden konnten. Patienten mit Niereninsuffizienz, die bekanntermaßen erhöhte NT-proBNP-Werte aufweisen (RAFFAN et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009) wurden ausgeschlossen.

Es wurde der Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht auf die NT-proBNP-Konzentration innerhalb der gesunden Kontrollgruppe untersucht. In der vorliegenden Studie konnte kein Einfluss auf die NT-proBNP-Konzentration durch einen dieser Faktoren nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen aus anderen Studien (BOSWOOD et al., 2008; OYAMA et al., 2008;

KELLIHAN et al., 2009; ETTINGER et al., 2012). WESS und Mitarbeiter (2011) konnten jedoch nachweisen, dass Hunde der Rasse Dobermann, die älter als acht Jahre waren signifikant höhere Werte aufweisen (WESS et al., 2011). Beim Menschen steigt NT-proBNP ebenfalls mit dem Alter an. (KAWAI et al., 2004; VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009). Es wird vermutet, dass der Anstieg im Alter mit einer verminderten Clearance des Peptides über die Niere zusammenhängt (KAWAI et al., 2004; WESS et al., 2011). Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen beim Hund, sinkt die Konzentration von NT-proBNP beim Menschen mit steigendem BMI signifikant ab (DAS et al., 2005; HORWICH et al., 2006). Frauen haben ausserdem höhere Werte als Männer (REDFIELD et al., 2002; VAN KIMMENADE & JANUZZI, 2009).

Zwei Hunde aus der Gruppe mit respiratorischer Dyspnoe hatten NT-proBNP-Konzentrationen, die über dem ermittelten Cut-off-Wert von 520 pmol/l lagen. Bei einem dieser Patienten handelte es sich um einen schwerkranken Jagdterrier mit Thrombozytopenie, geringgradiger Anämie und unklaren Verschattungen der Lunge auf dem Röntgenbild des Thorax in beiden Ebenen. Die NT-proBNP-Konzentration lag bei 692 pmol/l. In der Echokardiographie war der Patient als herzgesund eingestuft worden. Möglicherweise lagen bei diesem Patienten wie bereits oben erwähnt, Schäden des Myokards auf zellulärer Ebene vor, die in der Echokardiographie nicht erkennbar waren. Die Veränderungen in der Lunge könnten auch zu einer beginnenden pulmonären Hypertonie geführt haben, die auch in der Echokardiographie noch nicht sichtbar war und zu den erhöhten NT-proBNP-Werten geführt haben könnte. Eine Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit pulmonärer Hypertonie wurde bereits in anderen Studien nachgewiesen (FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2008; ATKINSON et al., 2009; TARNOW et al., 2009). Der andere Patient war ein Westhighland-White-Terrier, der eine Lungenfibrose und aufgrund dessen eine hochgradige pulmonäre Hypertonie aufwies. Dies erklärt die hohe NT-proBNP-Konzentration von 1330 pmol/l. Die Dyspnoe bei diesem Patienten war primär respiratorisch bedingt, die Veränderungen am Herzen waren sekundär und nicht Ursache für die Symptomatik, weswegen der Hund in die Gruppe der Hunde mit respiratorischer Dyspnoe eingeteilt wurde.

Ein Patient aus der Gruppe mit kardialer Dyspnoe zeigte eine auffällig niedrige

NT-proBNP-Konzentration von 130 pmol/l, obwohl eine hochgradige Mitralsuffizienz mit sekundärem Myokardschaden vorlag. Dieser Patient war bei Vorstellung in der Klinik in einem sehr kritischen Allgemeinzustand und es ist anzunehmen, dass die Probenentnahme erst nach Therapiebeginn und Stabilisierung des Patienten erfolgte. Unter Therapie sinkt die NT-proBNP-Konzentration signifikant ab (ACHEN et al., 2009; ATKINSON et al., 2009). Die niedrige NT-proBNP-Konzentration bei diesem Patienten lässt sich sicherlich nicht nur dadurch erklären. Man würde bei einem solchen Patienten eine sehr hohe NT-proBNP-Konzentration erwarten, da eine so starke Abnahme der Konzentration in so kurzer Zeit kaum möglich ist. Dass Patienten mit einer hochgradigen Mitralsuffizienz stark erhöhte NT-proBNP-Werte aufweisen, wurde bereits von anderen Autoren gezeigt (TAKEMURA et al., 2009; TARNOW et al., 2009). Wahrscheinlicher ist, dass zusätzlich beim Probenhandling ein Fehler unterlaufen ist, eventuell die Kühlkette kurzfristig unterbrochen war und es dabei zu einem vermehrten Abbau von NT-proBNP gekommen ist.

Eine Limitation dieser Studie ist, dass alle Patienten in der Gruppe mit kardiologischen Ursachen für Dyspnoe oder Husten im Herzversagen waren. Dies könnte möglicherweise zu einem höheren Cut-off-Wert geführt haben. Hier muss berücksichtigt werden, dass Hunde mit Herzkrankheiten häufig erst in späten Stadien der Krankheit Symptome wie Dyspnoe oder Husten zeigen. Außerdem kommt es in Überweisungskliniken sehr häufig zu einer Präselektion der Patientenpopulation, was zu einer Häufung von Patienten mit schwereren Herzkrankheiten geführt haben könnte. Hinzu kommt auch, dass die Patientenzahl in der Gruppe mit kardiologischen Erkrankungen mit 19 Patienten relativ klein war. Hier sollten auf jeden Fall weitere Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen und Patienten in unterschiedlichen Stadien einer Herzkrankheit durchgeführt werden.

Eine weitere Limitation ist, dass kein Proteaseinhibitor in den Probenröhrchen verwendet wurde. Studien zur Stabilität kardialer natriuretischer Peptide bei Hund und Mensch zeigten, dass eine Zugabe von Aprotinin als Proteaseinhibitor nicht sinnvoll ist, da der Abbau der Peptide nicht wesentlich vermindert wird (BUCKLEY et al., 1999; GOBINET-GEORGES et al., 2000; MOLZAHN 2012). Der Testkit für canines NT-proBNP wurde inzwischen von der Firma IDEXX

übernommen und wird als Cardiopet® proBNP (IDEXX Laboratories, USA) vermarktet. Die Firma IDEXX bietet Röhrchen mit Proteaseinhibitor an. In einer Studie zur Messung von NT-proBNP bei Katzen wurde der Abbau von NT-proBNP durch den Proteaseinhibitor zwar signifikant gehemmt, jedoch nicht verhindert (CONNOLLY et al., 2011). Im Gegensatz dazu ergab eine andere Studie, dass der Abbau von NT-proBNP bei Katzen durch Proteaseinhibitoren nicht signifikant verhindert wird (GÜNTHER et al., 2010). Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Mehrfachmessungen oder Serienmessungen der NT-proBNP-Konzentration über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Es ist inzwischen bekannt, dass die NT-proBNP-Konzentrationen auch beim Hund individuellen zeitlichen Schwankungen unterliegt (KELLIHAN et al., 2009). Da es in dieser Studie aber in erster Linie um die Fragestellung ging, ob bei einem Notfallpatienten mit Dyspnoe oder Husten anhand von NT-proBNP zwischen kardialen und respiratorischen Ursachen unterschieden werden kann, waren Serienmessungen nicht sinnvoll. Es konnte gezeigt werden, dass trotz dieser Schwankungen mit einer einmaligen Messung eine Unterscheidung der Ursache für die Symptomatik möglich ist.

Die Vorbehandlung der Patienten war in dieser Studie nicht standardisiert. Beim Menschen sinkt NT-proBNP unter Therapie der zugrundeliegenden Herzkrankheit signifikant ab (MURDOCH et al., 1999; TROUGHTON et al., 2000; TSUTAMOTO et al., 2001; ANAND et al., 2003), auch beim Hund wurde dies bereits nachgewiesen (ACHEN et al., 2009; ATKINSON et al., 2009). In der Regel wurde versucht, die Blutprobe für die Messung von NT-proBNP direkt bei Einlieferung des Patienten in die Klinik zu gewinnen. Bei Patienten, die in einem sehr kritischen Allgemeinzustand vorgestellt wurden, der eine sofortige Notfallbehandlung erforderlich machte, war es nicht in allen Fällen möglich, vor Therapiebeginn eine Blutprobe zu entnehmen. Auch konnte eine Vorbehandlung der Patienten vor Einlieferung in die Klinik durch einen niedergelassenen Tierarzt nicht immer mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Da jedoch die in dieser Studie ermittelten Werte für herzkranke Hunde nicht auffallend niedrig waren und die Unterschiede zu den gesunden Hunden und jenen mit respiratorischer Dyspnoe signifikant waren, ist davon auszugehen, dass eine mögliche Vorbehandlung keinen wesentlichen Einfluss auf die NT-proBNP Messungen gehabt haben dürfte.

Die Tatsache, dass Hunde mit kardial bedingter Dyspnoe oder Husten höhere NT-proBNP-Werte aufweisen als Hunde mit primär respiratorisch bedingten Symptomen wurde in mehreren Studien bestätigt (BOSWOOD et al., 2008; FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2009; ETTINGER et al., 2012). Bei den Medianwerten der NT-proBNP-Konzentrationen ergaben sich aber teilweise erheblich Unterschiede zur vorliegenden Studie. Die Medianwerte der vorliegenden Studie lagen für Hunde mit kardial bedingter Dyspnoe oder Husten bei 1410 pmol/l, bei Hunden mit respiratorischer Dyspnoe oder Husten bei 187 pmol/l. In den Studien von FINE und Mitarbeitern (2008) und OYAMA und Mitarbeitern (2009) lagen die Werte deutlich über den Medianwerten der vorliegenden Arbeit. Bei Hunden mit kardial bedingter Dyspnoe lagen sie bei 2544 pmol/l bzw. 2445 pmol/l, bei Hunden mit respiratorischer Dyspnoe bei 357 pmol/l bzw. 413 pmol/l (FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2009). In einer aktuellen Studie lag lediglich der Medianwert der Hunde mit respiratorisch bedingter Dyspnoe mit 448 pmol/l über dem Wert der vorliegenden Studie (ETTINGER et al., 2012). Die ermittelten NT-proBNP-Konzentrationen in der Studie von OYAMA und Mitarbeitern (2009) lassen sich nicht direkt mit den Werten der vorliegenden Studie vergleichen, da ein anderer Testkit (Canine CardioCare NT-proBNP, Veterinary Diagnostics Institute, Calif) verwendet wurde. Außerdem wurden die Werte aus dem Serum bestimmt, was möglicherweise höhere Werte ergibt, als eine Messung aus dem Plasma (KELLIHAN et al., 2009). Dies konnte aber bisher in keiner anderen Studie bestätigt werden. Bei den Testkits der anderen Studien (FINE et al., 2008; ETTINGER et al., 2012) handelte es sich höchstwahrscheinlich um eine andere Charge, als die in der vorliegenden Studie verwendete, was zu Unterschieden in den Messergebnissen geführt haben könnte. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass Testkits, die in verschiedenen Firmen in Europa oder den USA hergestellt wurden, unterschiedliche Messergebnisse hervorbringen (FINE et al., 2008; ETTINGER et al., 2012). In einer Studie wurden lyophilisierte Proteaseinhibitoren in die Probenröhrchen zugegeben, was einen Abbau von NT-proBNP weitgehend verhindert haben könnte (ETTINGER et al., 2012). Da jedoch nur der Medianwert der Hunde mit respiratorisch bedingter Dyspnoe höher ist als in der vorliegenden Arbeit, ist es unwahrscheinlich, dass die Ursache für die höheren Werte bei den Proteaseinhibitoren liegt. Wahrscheinlicher sind

rassespezifische Unterschiede, oder myokardiale Schäden auf zellulärer Ebene, die in der Echokardiographie nicht nachweisbar waren, aber eine vermehrte Ausschüttung von NT-proBNP ausgelöst haben könnten. Die Charakteristika der jeweiligen Studienpopulationen sowie die Anzahl der untersuchten Hunde ist bei der Interpretation der Ergebnisse der einzelnen Studien ebenfalls zu berücksichtigen. Bei FINE und Mitarbeitern (2008) und OYAMA und Mitarbeitern (2009) betrug beispielsweise die Anzahl der Hunde mit kardial bedingter Dyspnoe 25 bzw. 62 Hunde und lag damit über der Patientenzahl der vorliegenden Studie. In diesen beiden Studien wurde bei den meisten Hunden mit kardial bedingter Dyspnoe ein Linksherzversagen aufgrund einer Mitralsuffizienz oder eine Dilatative Kardiomyopathie diagnostiziert. Dass diese beiden Herzerkrankungen im fortgeschrittenen Stadium bei Hunden häufig besonders hohe NT-proBNP-Konzentrationen hervorrufen haben auch andere Autoren bestätigt (TAKEMURA et al., 2009; TARNOW et al., 2009; WESS et al., 2011; ETTINGER et al., 2012). Es wurden außerdem in keiner der genannten Studien Mehrfachmessungen durchgeführt, so dass wöchentliche, individuelle Schwankungen nicht beachtet werden konnten (KELLIHAN et al., 2009).

Die Diskrepanz in den Konzentrationen von NT-proBNP zeigt sich auch in den unterschiedlichen ermittelten Cut-off-Werten verschiedener Studien. Das Problem mit großen Unterschieden der ermittelten Cut-off-Werte für natriuretische Peptide bestand anfangs auch in der Humanmedizin (WORSTER et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurde ein Cut-off-Wert von 520 pmol/l für die NT-proBNP-Konzentration ermittelt. Einen deutlich niedrigen Cut-off-Wert ergab die Studie von BOSWOOD und Mitarbeitern (2008), er lag bei 210 pmol/l und wurde, wie bereits oben erwähnt, vom Hersteller des Testkits übernommen. Folgende Faktoren könnten beim Zustandekommen des niedrigen Cut-off-Wertes bei BOSWOOD und Mitarbeitern (2008) eine Rolle gespielt haben: Eine Echokardiographie wurde nur bei fünf der 17 Hunde mit respiratorischen Erkrankungen durchgeführt, was dazu geführt haben könnte, dass gleichzeitig vorliegende kardiale Erkrankungen nicht erkannt wurden. Es gab kein einheitliches Probenhandling, manche Proben wurden gefroren an das Fremdlabor verschickt, manche wurden vor dem Versand nicht eingefroren. Bei den nichtgefrorenen Proben könnte es zu einem erheblichen Abbau von NT-proBNP gekommen sein. Keiner der Hunde in der Gruppe der kardial bedingten Dyspnoe

befand sich zum Zeitpunkt der NT-proBNP-Messung im Herzversagen, was ebenfalls die insgesamt niedrigeren NT-proBNP-Werte und somit den niedrigeren Cut-off-Wert erklärt (BOSWOOD et al., 2008).

In anderen Studien waren die Cut-off-Werte höher als in der vorliegenden Arbeit. Die höchsten Cut-off-Werte wurden in einer Studie von OYAMA und Mitarbeitern (2009) mit 1158 pmol/l ermittelt. TAKEMURA und Mitarbeiter (2009) ermittelten einen Wert von 713,5 pmol/l (OYAMA et al., 2009; TAKEMURA et al., 2009). In der erstgenannten Studie wurden die Werte aus dem Serum bestimmt. KELLIHAN und Mitarbeiter (2009) zeigten, dass im Serum höhere NT-proBNP-Konzentrationen vorliegen als im Plasma (KELLIHAN et al., 2009). Bei OYAMA und Mitarbeitern (2009) wurden außerdem in die Gruppe der respiratorisch bedingten Dyspnoe auch Hunde miteinbezogen, die zusätzlich zur respiratorischen Erkrankung eine Herzerkrankung unterschiedlichen Schweregrades aufwiesen, was ebenfalls zu höheren NT-proBNP-Werten geführt haben könnte. In der vorliegenden Arbeit hatte nur ein Hund in der Gruppe mit respiratorisch bedingter Dyspnoe Veränderungen am Herz. Es lag bei diesem Patienten eine pulmonäre Hypertonie vor und deswegen ergab sich eine erhöhte NT-proBNP-Konzentration von 1330 pmol/l. In der Studie von OYAMA und Mitarbeitern (2009) waren die Hunde mit kardialer Dyspnoe wie in der vorliegenden Studie alle im Herzversagen, was zu einem höheren Cut-off-Wert geführt haben kann. Bei allen Hunden mit kardialer Dyspnoe, die in die Studie von TAKEMURA und Mitarbeiter (2009) aufgenommen wurden, lag eine Mitralsuffizienz unterschiedlichen Schweregrades vor. Somit lässt diese Studie Aussagen über die NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit unterschiedlichen Schweregraden einer Mitralsuffizienz, nicht aber bei anderen Herzkrankheiten zu. Dies macht einen direkten Vergleich mit anderen Studien, in die Hunde mit unterschiedlichen Herzkrankheiten aufgenommen wurden, schwierig. In der Studie von TAKEMURA und Mitarbeitern (2009), sowie von OYAMA und Mitarbeitern (2009) wurde das Vorliegen einer Niereninsuffizienz bei den eingeschlossenen Hunden nicht ausgeschlossen. Da in anderen Studien bei Hunden mit Niereninsuffizienz erhöhte NT-proBNP-Werte gemessen wurden (RAFFAN et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009), kann nicht ausgeschlossen werden, dass in die Studie von TAKEMURA und Mitarbeitern (2009), sowie OYAMA und Mitarbeitern (2009) Hunde eingeschlossen wurden, deren NT-proBNP-Konzentration aufgrund einer unerkannten Niereninsuffizienz erhöht

war. Dies könnte zu einer Verfälschung der ermittelten Cut-off-Werte geführt haben.

Die Firma IDEXX, die den Testkit für canines NT-proBNP inzwischen vermarktet gibt inzwischen nach oben korrigierte Werte als Cut-off-Werte an: Liegt die NT-proBNP-Konzentration unter 900 pmol/l, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass klinische Symptome, wie Husten, Dyspnoe oder Leistungsinsuffizienz durch eine Herzkrankheit verursacht werden, gering.

Im Bereich 900 - 1800 pmol/l ist keine Unterscheidung der klinischen Symptome in kardiale und nichtkardiale Ursachen möglich. Der Hersteller empfiehlt in diesem Fall weitere diagnostische Schritte. Bei einer NT-proBNP-Konzentration über 1800 pmol/l ist eine kardiale Ursache für die Symptomatik sehr wahrscheinlich.

Der klinische Einsatz von NT-proBNP als Biomarker ist grundsätzlich limitiert. Bei der Interpretation der gemessenen NT-proBNP-Konzentrationen müssen individuelle zeitliche Schwankungen berücksichtigt werden (KELLIHAN et al., 2009). Bei unklaren Ergebnissen kann es notwendig sein, die NT-proBNP-Messung zu einem späteren Zeitpunkt zu wiederholen oder zusätzliche Untersuchungen wie eine Echokardiographie durchzuführen.

Eine Erhöhung NT-proBNP-Konzentration bei Hunden mit Niereninsuffizienz (RAFFAN et al., 2009; Schmidt et al., 2009) muss bei der Interpretation der Messwerte ebenfalls berücksichtigt werden. Diese lässt sich durch die verminderte Exkretion von NT-proBNP über die Nieren, aufgrund einer verminderten glomerulären Filtrationsrate erklären (HALL, 2005). Außerdem kommt es durch die renale Dysfunktion zu einem erhöhten Plasmavolumen, was wiederum zu einer Dilatation des linken Ventrikels und damit zu einer Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration führt (ANWARUDDIN et al., 2006). Viele, vor allem ältere Hunde mit chronischen Herzkrankheiten weisen zusätzlich eine Niereninsuffizienz auf (cardiorenales Syndrom). Dies muss bei der Interpretation der ermittelten NT-proBNP-Werte berücksichtigt werden. Da bei diesen Patienten die NT-proBNP-Konzentration auch durch die Azotämie erhöht sein kann, besteht die Gefahr, einen Patienten eventuell fälschlicherweise als "herzkrank" einzustufen. In diesem Fall wird möglicherweise weitere Diagnostik, wie zum Beispiel eine Echokardiographie durchgeführt, was zu vermeidbaren Kosten führen kann, für den Patienten selbst jedoch keine nachteiligen Folgen hat.

Trotzdem sollten in weiteren Studien spezielle Cut-off-Werte für die NT-proBNP-Konzentration bei Patienten mit Niereninsuffizienz ermittelt werden, vor allem, da bei älteren Patienten häufig Herz- und Nierenkrankheiten gleichzeitig auftreten. Mit zunehmenden Erfahrungswerten beim Einsatz von NT-proBNP in der Veterinärmedizin könnte ein nächster Schritt sein, für verschiedene Fragestellungen unterschiedliche Cut-off-Werte zu etablieren.

Bei klinischem Einsatz von NT-proBNP-Messungen ist zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um einen zusätzlichen Test handelt, der die konventionelle Diagnostik nicht vollständig ersetzen soll. Wie jeder andere diagnostische Test, sollte eine NT-proBNP-Messung nur bei Patienten durchgeführt werden, bei denen eine Indikation gegeben ist.

In Zukunft sollte die Entwicklung eines Schnelltests für NT-proBNP entsprechend des "bedside"-Tests aus der Humanmedizin forciert werden, damit gerade in der täglichen Praxis und in der Notfallpraxis schnell ein Ergebnis vorliegt und das weitere Vorgehen entschieden werden kann.

Wichtig ist die weitere Durchführung großer kontrollierter Studien, um feste Referenzwerte und klare Cut-off-Werte zu etablieren, damit Unsicherheiten für praktische Tierärzte möglichst ausgeräumt werden und eindeutige Entscheidungen getroffen werden können. Auch sollte weiter untersucht werden, welche sekundären Erkrankungen beim Hund die Werte von NT-proBNP verändern (z.B. Sepsis, Schilddrüsenkrankheiten) und gegebenenfalls für Begleiterkrankungen, die einen Einfluss auf die NT-proBNP-Konzentration haben können, eigene Cut-off-Werte ermittelt werden. Sinnvoll wäre auch, eine größere Anzahl an Hunden mit primären respiratorischen Krankheiten und zusätzlichen Herzkrankheiten zu untersuchen, um zu evaluieren, ob für diese Patientengruppe eventuell höhere Referenzwerte nötig sind.

Vielversprechend ist auch die Kombination mehrerer Biomarker, wie bereits in der Studie von HEZZELL und Mitarbeitern (2012) die Kombination von hscTnI und NT-proBNP. Weitere mögliche Einsatzgebiete die Anwendung im Screening, vor allem auf okkulte Stadien von Herzkrankheiten bei Hund und Katze (z.B. DCM, HCM), sowie die Anwendung zum Therapiemonitoring, zur Verlaufskontrolle und zur Prognosestellung (HEZZELL et al., 2012). Hier sollten weitere Studien mit großen Patientenzahlen durchgeführt werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im klinischen Alltag ist es oft notwendig, zwischen kardialen und respiratorischen Ursachen für Dyspnoe oder Husten bei Hunden zu unterscheiden. Für weitere diagnostische und therapeutische Schritte ist es unerlässlich, die Grundkrankheit, welche die Dyspnoe verursacht, frühzeitig zu diagnostizieren. Dies war bisher nur durch Echokardiographie und durch Röntgenuntersuchungen des Thorax möglich. Die Durchführbarkeit dieser Untersuchungen ist bei instabilen, schwer dyspnöischen Hunden oft erheblich eingeschränkt. In der Humanmedizin hat sich die Messung der Konzentration von Natriuretischen Peptiden wie B-Typ Natriuretischem Peptid (BNP) und dessen Prohormon N-terminales proBNP (NT-proBNP) bereits bewährt, um zwischen kardialen und respiratorischen Ursachen für Dyspnoe zu unterscheiden. BNP wird als Prohormon proBNP synthetisiert, ins Blut freigesetzt und in NT-proBNP und BNP gespaltet. NT-proBNP selbst hat keine physiologische Aktivität, ist aber stabiler als BNP und deshalb einfacher zu bestimmen. In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass Hunde im kongestiven Herzversagen erhöhte BNP- und NT-proBNP-Konzentrationen aufweisen.

Das Ziel dieser Studie war, die Eignung von NT-proBNP zur Unterscheidung zwischen kardialen und respiratorischen Ursachen für Dyspnoe oder Husten zu evaluieren. Hierfür wurde zwischen 2004 und 2006 die NT-proBNP-Konzentration in Plasmaproben von 124 Hunden mittels eines ELISA (VETSIGN Canine CardioSCREEN NT-proBNP, Guildhay Ltd, UK) gemessen. Anhand von Echokardiographie und Röntgenuntersuchungen des Thorax wurden die Hunde in drei Gruppen eingeteilt: klinisch gesunde Hunde (Kontrollgruppe, n = 48), Hunde mit Dyspnoe oder Husten aufgrund von respiratorischen Ursachen (n = 57) und Hunde mit Dyspnoe oder Husten aufgrund von kardialen Ursachen (n = 19).

Zwischen der durchschnittlichen NT-proBNP-Konzentration bei klinisch gesunden Hunden und Hunden mit respiratorisch bedingter Dyspnoe fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied (246 versus 240 pmol/l). Die durchschnittliche NT-proBNP-Konzentration war bei Hunden mit kardial bedingter Dyspnoe oder Husten mit 1859 pmol/l signifikant höher als bei Hunden der beiden anderen Gruppen ( $p < 0,001$ ). Es wurde ein Cut-off-Wert von 520

pmol/l ermittelt. Die Sensitivität und Spezifität zur Unterscheidung zwischen kardialen und respiratorischen Ursachen für Dyspnoe oder Husten bei Hunden lag bei 94,7 % und 96,2 %, die AUC betrug 0,95. Zwischen Alter, Geschlecht oder Körpermengewicht und der NT-proBNP-Konzentration bestand in dieser Studie kein Zusammenhang. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Messung der NT-proBNP-Konzentration gut geeignet ist, um kardiale von respiratorischen Ursachen für Dyspnoe oder Husten beim Hund zu unterscheiden.

## VII. SUMMARY

In clinical practice it is important to be able to differentiate cardiac and respiratory causes of dyspnea or coughing in dogs. This differentiation is important for further decisions on diagnostic methods and treatment. Echocardiography and thoracic x-rays have been the standard diagnostic methods in dyspneic dogs. These methods however are often not easy to perform in a severely dyspneic dog. Measurement of Natriuretic Peptide concentrations, such as B-type Natriuretic Peptide (BNP) and its prohormone N-terminal proBNP (NT-proBNP) is helpful in distinguishing cardiac from non-cardiac causes of dyspnea in humans. BNP is synthesized as a prohormone proBNP, secreted into the blood stream, and cleaved into NT-proBNP and BNP. NT-proBNP has no physiologic activity but is more stable than BNP and therefore easier to measure. Previous canine studies have shown elevated BNP and NT-proBNP concentrations in dogs with congestive heart failure.

The aim of this study was to evaluate the utility of NT-proBNP to differentiate between cardiac and respiratory causes of coughing or dyspnea in dogs. Therefore, NT-proBNP concentration was measured in plasma samples from 124 dogs between 2004 and 2006 using an ELISA antibody assay (VETSIGN Canine CardioSCREEN NT-proBNP, Guildhay Ltd, UK). The dogs were classified according to echocardiography and thoracic x-rays into one of the following groups: clinical healthy (control) group ( $n = 48$ ), dogs with dyspnea or coughing due to respiratory causes ( $n = 57$ ), and dogs with dyspnea or coughing due to cardiac causes ( $n = 19$ ).

There was no significant difference in the NT-proBNP concentrations between the control group (mean 246 pmol/l) and the respiratory group (mean 240 pmol/l). NT-proBNP concentrations in dogs with dyspnea or coughing due to cardiac causes were significantly higher ( $p < 0.001$ ) than in the other two groups (mean 1859 pmol/l). Using a cut-off value of 520 pmol/l, NT-proBNP had a sensitivity of 94.7 % and a specificity of 96.2 % for the differentiation between cardiac and respiratory causes for dyspnea or coughing in dogs; the AUC was 0.95. There was no correlation between age, gender, or weight and the NT-proBNP concentrations. The results of this study showed that NT-proBNP is a good marker for

differentiation between cardiac and respiratory causes for dyspnea or coughing in dogs.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abraham WT, Lowes BD, Ferguson DA, Odom J, Kim JK, Robertson AD, Bristow MR, Schrier RW. Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure. *J Card Fail* 1998; 4: 37-44.

Achen SE, Gordon SG, Roland RM, Saunders AB, Boggess MM, Miller MW. Serial evaluation of NT-proBNP in Dogs with CHF predicts clinical score and the presence or absence of radiographic pulmonary edema. *J Vet Intern Med* [abstract] 2009; 23: 687.

Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, Latini R, Masson S, Maggioni AP, Glazer RD, Tognoni G, Cohn JN. Val-HeFT Investigators. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003; 107: 1278-83.

Anwaruddin S, Lloyd-Jones DM, Baggish A, Chen A, Krauser D, Tung R, Chae C, Januzzi JL Jr. Renal function, congestive heart failure, and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide measurement: results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 91-7.

Appel RG. Mechanism of atrial natriuretic factor-induced inhibition of rat mesangial cell mitogenesis. *Am J Physiol* 1990 Sep; 259: 312-8.

Arat-Ozkan A, Kaya A, Yigit Z, Balci H, Okçun B, Yazicioglu N, Küçükoglu S. Serum N-terminal pro-BNP levels correlate with symptoms and echocardiographic findings in patients with mitral stenosis. *Echocardiography* 2005; 22: 473-8.

Asano K, Kadosawa T, Okumura M, Fujinaga T. Peri-operative changes in echocardiographic measurements and plasma atrial and brain natriuretic peptide concentrations in 3 dogs with patent ductus arteriosus. *J Vet Med Sci* 1999a; 61: 89-91.

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* 1999b; 61: 523-9.

Aspromonte N, Valle R, Peacock WF, Vanderheyden M, Maisel A. Inpatient monitoring and prognostic importance of B-type natriuretic peptide. *Congest Heart Fail* 2008; 14 Suppl 1: 30-4.

Atkinson KJ, Fine DM, Thombs LA, Gorelick JJ, Durham HE. Evaluation of pimobendan and N-terminal probrain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1190-6.

Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide. *Peptides* 1996; 17: 1243-51.

- Baumwart RD, Meurs KM. Assessment of plasma brain natriuretic peptide concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Vet Res* 2005; 66: 2086-9.
- Bettencourt P, Friões F, Azevedo A, Dias P, Pimenta J, Rocha-Gonçalves F, Ferreira A. Prognostic information provided by serial measurements of brain natriuretic peptide in heart failure. *Int J Cardiol* 2004; 93: 45-8.
- Bilder GE, Schofield TL, Blaine EH. Release of atrial natriuretic factor. Effects of repetitive stretch and temperature. *Am J Physiol* 1986; 251: 817-21.
- 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: 245-51.
- Boswood A, Attree S, Page K. Clinical validation of a proANP 31-67 fragment ELISA in the diagnosis of heart failure in the dog. *J Small Anim Pract* 2003; 44: 104-8.
- Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 2008; 49: 26-32.
- Brown A, George J, Murphy MJ, Struthers A. Could BNP screening of acute chest pain cases lead to safe earlier discharge of patients with non-cardiac causes? A pilot study. *QJM* 2007; 100: 755-61.
- 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: 689-95.
- Burnett JC Jr, Kao PC, Hu DC, Heser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* 1986; 231: 1145-7.
- Burrell LM, Lambert HJ, Baylis PH. Effect of atrial natriuretic peptide on thirst and arginine vasopressin release in humans. *Am J Physiol* 1991; 260: 475-9.
- Cao L, Gardner DG. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 1995; 25: 227-34.
- Carvajal JA, Aguan K, Thompson LP, Buhimschi IA, Weiner CP. Natriuretic peptide-induced relaxation of myometrium from the pregnant guinea pig is not mediated by guanylate cyclase activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 181-8.
- Casco VH, Veinot JP, Kurosaki de Bold ML, Masters RG, Stevenson MM, de Bold AJ. Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 799-809.

Chanez P, Mann C, Bousquet J, Chabrier PE, Godard P, Braquet P, Michel FB. Atrial natriuretic factor (ANF) is a potent bronchodilator in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 321-4.

Charles CJ, Prickett TC, Espiner EA, Rademaker MT, Richards AM, Yandle TG. Regional sampling and the effects of experimental heart failure in sheep: differential responses in A, B and C-type natriuretic peptides. *Peptides* 2006; 27: 62-8.

Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4355-65.

Chen HH, Lainchbury JG, Burnett JC Jr. Natriuretic peptide receptors and neutral Endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic natriuretic peptide dendroaspis natriuretic peptid. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1186-91.

Chetboul V, Serres F, Tissier R, Lefebvre HP, Sampedrano CC, Gouni V, Poujol L, Hawa G, Pouchelon JL. Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 984-94.

Chetboul V, Tessier-Vetzel D, Escriou C, Tissier R, Carlos C, Boussouf M, Pouchelon JL, Blot S, Derumeaux G. Diagnostic potential of natriuretic peptides in the occult phase of golden retriever muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 845-50.

Christoffersen C, Goetze JP, Bartels ED, Larsen MO, Ribel U, Rehfeld JF, Rolin B, Nielsen LB. Chamber-dependent expression of brain natriuretic peptide and its mRNA in normal and diabetic pig heart. *Hypertension* 2002; 40: 54-60.

Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, Shaknovich A, Pondolino K, Clark M, Camargo MJ. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. *J Clin Invest* 1986; 78: 1362-74.

Colbatzky F, Vollmar A, Mönch U, Hermanns W. Synthesis and distribution of atrial natriuretic peptide (ANP) in hearts from normal dogs and those with cardiac abnormalities. *J Comp Pathol* 1993; 108: 149-63.

Connolly DJ, Hezzell MJ, Fuentes VL, Chang YM, Swan R, Syme HM. The effect of protease inhibition on the temporal stability of NT-proBNP in feline plasma at room temperature. *J Vet Cardiol* 2011; 13: 13-9.

Connolly DJ, Magalhaes RJ, Syme HM, Boswood A, Fuentes VL, Chu L, Metcalf M. Circulating natriuretic peptides in cats with heart disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 96-105.

Connolly DJ, Soares Magalhaes RJ, Fuentes VL, Boswood A, Cole G, Boag A, Syme HM. Assessment of the diagnostic accuracy of circulating natriuretic peptide concentrations to distinguish between cats with cardiac and non-cardiac causes of respiratory distress. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: 41-50.

Costello-Boerrigter LC, Boerrigter G, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Urban LH, Mahoney DW, Jacobsen SJ, Heublein DM, Burnett JC Jr. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide in the general community: determinants and detection of left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 345-53.

Currie MG, Geller DM, Cole BR, Siegel NR, Fok KK, Adams SP, Eubanks SR, Galluppi GR, Needleman P. Atriopeptins: bioactive peptides derived from mammalian cardiac atria. *J Hypertens Suppl* 1984; 2: 309-12.

Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, Clopton P, Alberto J, Hlavin P, Maisel AS. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 379-85.

Das SR, Drazner MH, Dries DL, Vega GL, Stanek HG, Abdullah SM, Canham RM, Chung AK, Leonard D, Wians FH Jr, de Lemos JA. Impact of body mass and body composition on circulating levels of natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Circulation* 2005; 112: 2163-8.

De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981; 28: 89-94.

De Lemos JA, McGuire DK, Khera A, Das SR, Murphy SA, Omland T, Drazner MH. Screening the population for left ventricular hypertrophy and left ventricular systolic dysfunction using natriuretic peptides: results from the Dallas Heart Study. *Am Heart J* 2009; 157: 746-53.

DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA, Hansen BD, Keene BW, Moore DT, Atkins CE. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 243-50.

Del Ry S, Passino C, Maltinti M, Emdin M, Giannessi D. C-type natriuretic peptide plasma levels increase in patients with chronic heart failure as a function of clinical severity. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 1145-8.

Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR. Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. *Endocrinology* 2007; 148: 3518-22.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömborg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Eur J Heart Fail 2008; 10: 933-89.

Dillingham MA, Anderson RJ. Inhibition of vasopressin action by atrial natriuretic factor. Science 1986; 231: 1572-3.

Downie PF, Talwar S, Squire IB, Davies JE, Barnett DB, Ng LL. Assessment of the stability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in vitro: implication for assessment of left ventricular dysfunction. Clin Sci (Lond) 1999; 97: 255-8.

Dussaule JC, Stefanski A, Béa ML, Ronco P, Ardaillou R. Characterization of neutral endopeptidase in vascular smooth muscle cells of rabbit renal cortex. Am J Physiol 1993; 264: 45-52.

Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC Jr. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. Circ Res 1988; 62: 191-5.

El-Gehani F, Tena-Sempere M, Ruskoaho H, Huhtaniemi I. Natriuretic peptides stimulate steroidogenesis in the fetal rat testis. Biol Reprod 2001; 65: 595-600.

Eriksson AS, Järvinen 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: 1818-24.

Espinier EA, Richards AM, Yandle TG, Nicholls MG. Natriuretic hormones. Endocrinol Metab Clin North Am 1995; 24: 481-509.

Ettinger SJ, Farace G, Forney SD, Frye M, Beardow A. Evaluation of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with and without cardiac disease. J Am Vet Med Assoc 2012; 240: 171-80.

Fine DM, DeClue AE, Reinero CR. Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. J Am Vet Med Assoc 2008; 232:1674-9.

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: 859-65.

Forssmann WG, Richter R, Meyer M. The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. Histochem Cell Biol 1998; 110:335-57.

Forssmann WG. Cardiac hormones with renal effects. Potential role in health and disease. *Contrib Nephrol* 1986; 50: 1-13.

Fox PR, Oyama MA, Reynolds C, Rush JE, DeFrancesco TC, Keene BW, Atkins CE, Macdonald KA, Schober KE, Bonagura JD, Stepien RL, Kelliher HB, Nguyenba TP, Lehmkuhl LB, Lefbom BK, Moise NS, Hogan DF. Utility of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) to distinguish between congestive heart failure and non-cardiac causes of acute dyspnea in cats. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: 51-61.

Fox PR, Rush JE, Reynolds CA, DeFrancesco TC, Keene BW, Atkins CE, Gordon SG, Schober KE, Bonagura JD, Stepien RL, Kelliher HB, Macdonald KA, Lehmkuhl LB, Nguyenba TP, Sydney Moise N, Lefbom BK, Hogan DF, Oyama MA. Multicenter evaluation of plasma N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-pro BNP) as a biochemical screening test for asymptomatic (occult) cardiomyopathy in cats. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1010-6.

Furuya M, Tawaragi Y, Minamitake Y, Kitajima Y, Fuchimura K, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Structural requirements of C-type natriuretic peptide for elevation of cyclic GMP in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 964-9.

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: 519-23.

Goetze JP, Jensen G, Møller S, Bendtsen F, Rehfeld JF, Henriksen JH. BNP and N-terminal proBNP are both extracted in the normal kidney. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 8-15.

Goetze JP, Kastrup J, Pedersen F, Rehfeld JF. Quantification of pro-B-type natriuretic peptide and its products in human plasma by use of an analysis independent of precursor processing. *Clin Chem* 2002; 48: 1035-42.

Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK, Forte LR. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and Escherichia coli heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investig Med* 1997; 45: 276-82.

Günther C, Hildebrandt N, Haßdenteufel E, Henrich E, Schiller S, Schneider M. Influence Of Sample Preparation In Measurement Of N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide In Cats. *Journal Of Veterinary Internal Medicine (Abstract)* 2010; 24: 1559.

Gustafsson F, Steensgaard-Hansen F, Badskjaer J, Poulsen AH, Corell P, Hildebrandt P. Diagnostic and prognostic performance of N-terminal ProBNP in primary care patients with suspected heart failure. *J Card Fail* 2005; 11 Suppl: 15-20.

Haaf P, Balmelli C, Reichlin T, Twerenbold R, Reiter M, Meissner J, Schaub N, Stelzig C, Freese M, Paniz P, Meune C, Drexler B, Freidank H, Winkler K, Hochholzer W, Mueller C. N-terminal pro B-type natriuretic peptide in the early evaluation of suspected acute myocardial infarction. Am J Med 2011; 124: 731-9.

Häggström J, Hansson K, Karlberg BE, Kvart C, Olsson K. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniels. Am J Vet Res 1994; 55: 698-703.

Hall C. NT-ProBNP: the mechanism behind the marker. J Card Fail 2005; 11 Suppl: 81-3.

Harrison A, Morrison LK, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Clopton P, Dao Q, Hlavin P, Maisel AS. B-type natriuretic peptide predicts future cardiac events in patients presenting to the emergency department with dyspnea. Ann Emerg Med 2002; 39: 131-8.

Hasegawa K, Fujiwara H, Doyama K, Miyamae M, Fujiwara T, Suga S, Mukoyama M, Nakao K, Imura H, Sasayama S. Ventricular expression of brain natriuretic peptide in hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 1993; 88: 372-80.

Haßdenteufel E, Kresken JG, Henrich E, Hildebrandt N, Schneider C, Stosic A, Schneider M. [NT-proBNP as a diagnostic marker in dogs with dyspnea and in asymptomatic dogs with heart murmur]. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2012; 40: 171-9.

Häussler N. Bestimmung des "Brain Natriuretic Peptid" (BNP) bei herzkranken Hunden [Hochschulschrift, Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2004.

Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. Circ Res 1956b; 4:85-90.

Henry JP, Pearce JW. The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow. J Physiol 1956a; 131: 572-85.

Hezzell MJ, Boswood A, Chang YM, Moonarmart W, Souttar K, Elliott J. The combined prognostic potential of serum high-sensitivity cardiac troponin I and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. J Vet Intern Med 2012; 26: 302-11.

Hirata Y, Takata S, Kawahara Y, Takai Y, Chino N, Kimura T, Sakakibara S. Molecular mechanism of action by atrial natriuretic peptide in rat vascular smooth muscle cells. Jpn Circ J 1988; 52: 1430-5.

Hirayama A, Kusuoka H, Yamamoto H, Sakata Y, Asakura M, Higuchi Y, Mizuno H, Kashiwase K, Ueda Y, Okuyama Y, Hori M, Kodama K. Serial changes in plasma brain natriuretic peptide concentration at the infarct and non-infarct sites in patients with left ventricular remodelling after myocardial infarction. Heart 2005; 91: 1573-7.

Hooper JD, Scarman AL, Clarke BE, Normyle JF, Antalis TM. Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6931-7.

Hori Y, Tsubaki M, Katou A, Ono Y, Yonezawa T, Li X, Higuchi SI. Evaluation of NT-pro BNP and CT-ANP as markers of concentric hypertrophy in dogs with a model of compensated aortic stenosis. *J Vet Intern Med* 2008; 22:1118-23.

Hori Y, Uchide T, Saitoh R, Thoei D, Uchida M, Yoshioka K, Chikazawa S, Hoshi F. Diagnostic utility of NT-proBNP and ANP in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Vet J* 2012; 194: 215-21.

Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 2000; 35: 19-24.

Horwich TB, Hamilton MA, Fonarow GC. B-type natriuretic peptide levels in obese patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 85-90.

Hsu A, Kittleson MD, Paling A. Investigation into the use of plasma NT-proBNP concentration to screen for feline hypertrophic cardiomyopathy. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: 63-70.

Hughes D, Talwar S, Squire IB, Davies JE, Ng LL. An immunoluminometric assay for N-terminal pro-brain natriuretic peptide: development of a test for left ventricular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 1999; 96: 373-80.

Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1428-35.

Hunt PJ, Richards AM, Nicholls MG, Yandle TG, Doughty RN, Espiner EA. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROMNP): a new marker of cardiac impairment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47: 287-96.

Hunt PJ, Yandle TG, Nicholls MG, Richards AM, Espiner EA. The amino-terminal portion of pro-brain natriuretic peptide (Pro-BNP) circulates in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 1175-83.

Hystad ME, Geiran OR, Attramadal H, Spurkland A, Vege A, Simonsen S, Hall C. Regional cardiac expression and concentration of natriuretic peptides in patients with severe chronic heart failure. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 395-403.

Iltumur K, Karabulut A, Yokus B, Yavuzkir M, Taskesen T, Toprak N. N-terminal proBNP plasma levels correlate with severity of mitral stenosis. *J Heart Valve Dis* 2005; 14: 735-41.

Inoue K, Sakamoto T, Yuge S, Iwatani H, Yamagami S, Tsutsumi M, Hori H, Cerra MC, Tota B, Suzuki N, Okamoto N, Takei Y. Structural and functional evolution of three cardiac natriuretic peptides. *Mol Biol Evol* 2005; 22: 2428-34.

Inoue K, Takei Y. Molecular evolution of the natriuretic peptide system as revealed by comparative genomics. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2006; 1: 69-76.

Jamieson JD, Palade GE. Specific granules in atrial muscle cells. *J Cell Biol* 1964; 23: 151-72.

Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG, Tung R, Cameron R, Nagurney JT, Chae CU, Lloyd-Jones DM, Brown DF, Foran-Melanson S, Sluss PM, Lee-Lewandrowski E, Lewandrowski KB. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *Am J Cardiol* 2005; 95: 948-54.

Januzzi JL Jr, Sakuja R, O'donoghue M, Baggish AL, Anwaruddin S, Chae CU, Cameron R, Krauser DG, Tung R, Camargo CA Jr, Lloyd-Jones DM. Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide testing for prediction of 1-year mortality in patients with dyspnea treated in the emergency department. *Arch Intern Med*. 2006b; 166: 315-20.

Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, Bayes-Genis A, Ordonez-Llanos J, Santalo-Bel M, Pinto YM, Richards M. NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study. *Eur Heart J* 2006a; 27: 330-7.

Jaubert J, Jaubert F, Martin N, Washburn LL, Lee BK, Eicher EM, et al. Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10278-83.

Johns DG, Ao Z, Heidrich BJ, Hunsberger GE, Graham T, Payne L, Elshourbagy N, Lu Q, Aiyar N, Douglas SA. Dendroaspis natriuretic peptide binds to the natriuretic peptide clearance receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 145-9.

Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juilliére Y. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1733-9.

Kalra PR, Clague JR, Bolger AP, Anker SD, Poole-Wilson PA, Struthers AD, Coats AJ. Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 571-3.

Kangawa K, Fukuda A, Kubota I, Hayashi Y, Minamitake Y, Matsuo H. Human atrial natriuretic polypeptides (hANP): purification, structure synthesis and biological activity. *J Hypertens Suppl* 1984; 2: 321-3

Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000; 5: 167-73.

- Kashiwagi M, Katafuchi T, Kato A, Inuyama H, Ito T, Hagiwara H, Takei Y, Hirose S. Cloning and properties of a novel natriuretic peptide receptor, NPR-D. *Eur J Biochem* 1995; 233: 102-9.
- Kawai K, Hata K, Tanaka K, Kubota Y, Inoue R, Masuda E, Miyazaki T, Yokoyama M. Attenuation of biologic compensatory action of cardiac natriuretic peptide system with aging. *Am J Cardiol* 2004; 93: 719-23.
- Kellihan HB, Oyama MA, Reynolds CA, Stepien RL. Weekly variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: 93-7.
- Kerr MA, Kenny AJ. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 1974; 137: 477-88.
- Kisch B. [Electron microscopic examination of the heart]. *Z Wiss Mikrosk* 1956a; 62: 510-20.
- Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg* 1956b; 14: 99-112.
- Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992; 86: 1081-8.
- Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Hosoda K, Nakagawa O, Hama N. C-type natriuretic peptide (CNP) in rats and humans. *Endocrinology* 1991; 129: 1104-6
- Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 429-41.
- Kroll MH, Twomey PJ, Srisawasdi P. Using the single-compartment ratio model to calculate half-life, NT-proBNP as an example. *Clin Chim Acta* 2007; 380: 197-202.
- Lainchbury JG, Troughton RW, Strangman KM, Frampton CM, Pilbrow A, Yandle TG. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide-guided treatment for chronic heart failure: results from the BATTLESCARRED (NT-proBNP Assisted Treatment To Lessen Serial Cardiac Readmissions and Death) trial. *J Am Coll Cardiol* 2009; 55: 53-60.
- Lalor SM, Connolly DJ, Elliott J, Syme HM. Plasma concentrations of natriuretic peptides in normal cats and normotensive and hypertensive cats with chronic kidney disease. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: 71-9.
- Lang RE, Thölken H, Ganter D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T. Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 1985; 314: 264-6.
- LaPointe MC. Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* 2005; 26: 944-56.

Lee CY, Burnett JC Jr. Natriuretic peptides and therapeutic applications. Heart Fail Rev 2007; 12: 131-42.

Levenberg K. A Method for the Solution of Certain Problems in Least Squares. Quart Appl Math 1944; 2: 164-8.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. N Engl J Med 1998; 339: 321-8.

Lisy O, Huntley BK, McCormick DJ, Kurlansky PA, Burnett JC Jr. Design, synthesis, and actions of a novel chimeric natriuretic peptide: CD-NP. J Am Coll Cardiol 2008; 52: 60-8.

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: 1089-94.

Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. Nature 1995; 378: 65-8.

Lubien E, DeMaria A, Krishnaswamy P, Clopton P, Koon J, Kazanegra R, Gardetto N, Wanner E, Maisel AS. Utility of B-natriuretic peptide in detecting diastolic dysfunction: comparison with Doppler velocity recordings. Circulation 2002; 105: 595-601.

Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield M, Wei CM, Porter JG, Burnett JC Jr. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. Am J Physiol 1998; 274: 1684-9.

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: 172-7.

Magga J, Marttila M, Mäntymaa P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Brain natriuretic peptide in plasma, atria, and ventricles of vasopressin- and phenylephrine-infused conscious rats. Endocrinology 1994; 134: 2505-15.

Mair J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide-where are we now? Clin Chem Lab Med 2008; 46: 1507-14.

Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA; Breathing Not Properly Multinational Study Investigators. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. N Engl J Med 2002; 347: 161-7.

Mäntymaa P, Vuolteenaho O, Marttila M, Ruskoaho H. Atrial stretch induces rapid increase in brain natriuretic peptide but not in atrial natriuretic peptide gene expression in vitro. Endocrinology 1993; 133: 1470-3.

Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 1986; 324: 473-6.

Marquardt DW. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *SIAM J Appl Math* 1963; 11: 431-41.

Martin FL, Sangaralingham SJ, Huntley BK, McKie PM, Ichiki T, Chen HH, Korinek J, Harders GE, Burnett JC Jr. CD-NP: a novel engineered dual guanylyl cyclase activator with anti-fibrotic actions in the heart. *PLoS One* 2012; 7: 52422.

Martinez-Rumayor A, Richards AM, Burnett JC, Januzzi JL Jr. Biology of the natriuretic peptides. *Am J Cardiol* 2008; 101: 3-8.

Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, Smithies O. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7403-8.

McCullough PA, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Herrmann HC, Steg PG, Duc P, Westheim A, Omland T, Knudsen CW, Storrow AB, Abraham WT, Lamba S, Wu AH, Perez A, Clopton P, Krishnasamy P, Kazanegra R, Maisel AS. B-type natriuretic peptide and clinical judgment in emergency diagnosis of heart failure: analysis from Breathing Not Properly (BNP) Multinational Study. *Circulation* 2002; 106: 416-22.

Menaut P, Connolly DJ, Volk A, Pace C, Luis Fuentes V, Elliott J, Syme H. Circulating natriuretic peptide concentrations in hyperthyroid cats. *J Small Anim Pract* 2012; 53: 673-8.

Mills RM, LeJemtel TH, Horton DP, Liang C, Lang R, Silver MA, Lui C, Chatterjee K. Sustained hemodynamic effects of an infusion of nesiritide (human b-type natriuretic peptide) in heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Natrecor Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 155-62.

Minamino N, Kangawa K, Honzawa M, Matsuo H. Isolation and structural determination of rat neuromedin U. *Biochem Biophys Res Commun* 1988a; 156: 355-60

Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Isolation and identification of a high molecular weight brain natriuretic peptide in porcine cardiac atrium. *Biochem Biophys Res Commun* 1988b; 157: 402-9

Misono KS, Grammer RT, Fukumi H, Inagami T. Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 444-51

Moesgaard SG, Falk T, Teerlink T, Guðmundsdóttir HH, Sigurðardóttir S, Rasmussen CE, Olsen LH. Brain-natriuretic peptide and cyclic guanosine monophosphate as biomarkers of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Vet J* 2011; 189: 349-52.

Molzahn A. NT-proBNP bei der Dilatativen Kardiomyopathie des Dobermanns: Erstellung von Referenzwerten und Durchführung eines Testvergleichs sowie einer Follow-Up-Studie [Hochschulschrift, Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2012.

Moonarmart W, Boswood A, Luis Fuentes V, Brodbelt D, Souttar K, Elliott J. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and left ventricular diameter independently predict mortality in dogs with mitral valve disease. *J Small Anim Pract* 2010; 51: 84-96.

Morris N, Oyama MA, O'Sullivan ML, Singletary GE, Gordon SG. Utility of NT-proBNP Assay to Detect Occult Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Intern Med* [abstract] 2009; 23: 686.

Morrison LK, Harrison A, Krishnasamy P, Kazanegra R, Clopton P, Maisel A. Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 202-9.

Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H. 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: 1402-12

Mukoyama M, Nakao K, Saito Y, Ogawa Y, Hosoda K, Suga S, Shirakami G, Jougasaki M, Imura H. Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet* 1990; 335: 801-2.

Murdoch DR, McDonagh TA, Byrne J, Blue L, Farmer R, Morton JJ, Dargie HJ. 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: 1126-32.

Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors. *J Hypertens* 1992b; 10: 1111-4.

Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens* 1992a; 10: 907-12.

Nakao K, Sugawara A, Morii N, Sakamoto M, Yamada T, Itoh H, Shiono S, Saito Y, Nishimura K, Ban T. The pharmacokinetics of alpha-human atrial natriuretic polypeptide in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 31: 101-3.

Narayan H, Mohammed N, Quinn PA, Squire IB, Davies JE, Ng LL. Activation of a novel natriuretic endocrine system in humans with heart failure. *Clin Sci (Lond)* 2010; 118: 367-74.

Nicolau N, Butur G, Laky D. Electronmicroscopic observations regarding the presence of natriuretic granules in the ventricle of patients with cardiopathies. *Rom J Morphol Embryol* 1997; 43: 119-37.

O'Connor CM, Fiuzat M, Lindenfeld J, Miller A, Lombardi C, Carson P, Shaw LK, Wang LJ, Connolly P, Mills R, Yancy C, Mahaffey K. Mode of death and hospitalization from the Second Follow-up Serial Infusions of Nesiritide (FUSION II) trial and comparison of clinical events committee adjudicated versus investigator reported outcomes. *Am J Cardiol* 2011; 108: 1449-57.

Ogawa A, Seino Y, Yamashita T, Ogata K, Takano T. Difference in elevation of N-terminal pro-BNP and conventional cardiac markers between patients with ST elevation vs non-ST elevation acute coronary syndrome. *Circ J* 2006; 70: 1372-8.

Ogawa Y, Itoh H, Yoshitake Y, Inoue M, Yoshimasa T, Serikawa T, Nakao K. Molecular cloning and chromosomal assignment of the mouse C-type natriuretic peptide (CNP) gene (Nppc): comparison with the human CNP gene (NPPC). *Genomics* 1994; 24: 383-7.

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

Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, Fox PR, Reynolds CA, Gordon SG, Bulmer BJ, Lefbom BK, Brown BA, Lehmkuhl LB, Prosek R, Lesser MB, Kraus MS, Bossbaly MJ, Rapoport GS, Boileau JS. Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 235: 1319-25.

Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *Am J Vet Res* 2007; 68: 42-7.

Ozmen B, Ozmen D, Parildar Z, Mutaf I, Bayindir O. Serum N-terminal-pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP) levels in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Res* 2007; 32: 1-8.

Palazzuoli A, Deckers J, Calabro A, Campagna MS, Nuti R, Pastorelli M, Pasqui AL, Bruni F, Auteri A, Puccetti L. Brain natriuretic peptide and other risk markers for outcome assessment in patients with non-ST-elevation coronary syndromes and preserved systolic function. *Am J Cardiol* 2006; 98: 1322-8.

Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension* 2000; 36: 355-9.

Piantedosi D, Cortese L, Di Loria A, Brignola G, Prisco M, Persechino A, Ciaramella P. Plasma atrial natriuretic peptide (proANP 31-67), B-type natriuretic peptide (Nt-proBNP) and endothelin-1 (ET-1) concentrations in dogs with chronic degenerative valvular disease (CDVD). *Vet Res Commun* 2009; 33 Suppl 1: 197-200.

Piao FL, Park SH, Han JH, Cao C, Kim SZ, Kim SH. Dendroaspis natriuretic peptide and its functions in pig ovarian granulosa cells. *Regul Pept* 2004; 118: 193-8.

Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006; 27: 47-72.

Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 191: 341-66.

Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 238-42.

Raffan E, Loureiro J, Dukes-McEwan J, Fonfara S, James R, Swift S, Bexfield N, Herrtage ME, Archer J. The cardiac biomarker NT-proBNP is increased in dogs with azotemia. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1184-9.

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: 976-82.

Richards AM, Doughty R, Nicholls MG, Macmahon S, Ikram H, Sharpe N, Espiner EA, Frampton C, Yandle TG. Neurohumoral prediction of benefit from carvedilol in ischemic left ventricular dysfunction. Australia-New Zealand Heart Failure Group. *Circulation* 1999; 99: 786-92.

Richards AM, Lainchbury JG, Nicholls MG, Cameron AV, Yandle TG. Dendroaspis natriuretic peptide: endogenous or dubious? *Lancet* 2002; 359: 5-6.

Richards AM, Tonolo G, Tree M, Robertson JI, Montorsi P, Leckie BJ, Polonia J. Atrial natriuretic peptides and renin release. *Am J Med* 1988; 84: 112-8.

Richards M, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury JG, Troughton RW, Elliott J, Frampton CM, Crozier IG, Yandle TG, Doughty R, MacMahon S, Sharpe N; Christchurch Cardioendocrine Research Group; Australia-New Zealand Heart Failure Group. Comparison of B-type natriuretic peptides for assessment of cardiac function and prognosis in stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 52-60.

Ritter D, Chao J, Needleman P, Tetens E, Greenwald JE. Localization, synthetic regulation, and biology of renal atriopeptin-like prohormone. *Am J Physiol* 1992; 263: 503-9.

- Roques BP. Peptidomimetics as receptors agonists or peptidase inhibitors: a structural approach in the field of enkephalins, ANP and CCK. *Biopolymers* 1992; 32: 407-10.
- Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. *J Physiol* 2008; 586: 353-66.
- Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 479-602.
- Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest* 1989; 83: 298-305.
- Sanderson JE, Chan WW, Hung YT, Chan SK, Shum IO, Raymond K, Woo KS. Effect of low dose beta blockers on atrial and ventricular (B type) natriuretic factor in heart failure: a double blind, randomised comparison of metoprolol and a third generation vasodilating beta blocker. *Br Heart J* 1995; 74: 502-7.
- Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, Kanda T, Sakamaki T, Tanaka S, Nagai R, Abe S, Takeuchi T. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J Biol Chem* 1997; 272: 20545-54.
- Schellenberger U, O'Rear J, Guzzetta A, Jue RA, Prottter AA, Pollitt NS. The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein. *Arch Biochem Biophys* 2006; 451: 160-6.
- Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberg PW, Burnett JC Jr. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 126-30.
- Schmidt MK, Reynolds CA, Estrada AH, Prosek R, Maisenbacher HW, Sleeper MM, Oyama MA. Effect of azotemia on serum N-terminal proBNP concentration in dogs with normal cardiac function: a pilot study. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: 81-6.
- Schou M, Dalsgaard MK, Clemmesen O, Dawson EA, Yoshiga CC, Nielsen HB, Gustafsson F, Hildebrandt PR, Secher NH. Kidneys extract BNP and NT-proBNP in healthy young men. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1676-80.
- Schultz HD, Gardner DG, Deschepper CF, Coleridge HM, Coleridge JC. Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor. *Am J Physiol* 1988; 255: 6-13.
- Schulz H, Langvik TA, Lund Sagen E, Smith J, Ahmadi N, Hall C. Radioimmunoassay for N-terminal probrain natriuretic peptide in human plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 33-42.

Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr* 1988; 66: 752-9.

Schweitz H, Vigne P, Moinier D, Frelin C, Lazdunski M. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J Biol Chem* 1992; 267: 13928-32.

Sengenès C, Berlan M, De Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 2000 Jul; 14: 1345-51.

Serres F, Pouchelon JL, Poujol L, Lefebvre HP, Trumel C, Daste T, Sampedrano CC, Gouni V, Tissier R, Hawa G, Chetboul V. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *J Vet Cardiol* 2009; 11: 103-21.

Silver MA, Maisel A, Yancy CW, McCullough PA, Burnett JC Jr, Francis GS, Mehra MR, Peacock WF 4th, Fonarow G, Gibler WB, Morrow DA, Hollander J; BNP Consensus Panel. BNP Consensus Panel 2004: A clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Congest Heart Fail* 2004; 10 Suppl 3: 1-30.

Singh G, Kuc RE, Maguire JJ, Fidock M, Davenport AP. Novel snake venom ligand dendroaspis natriuretic peptide is selective for natriuretic peptide receptor-A in human heart: downregulation of natriuretic peptide receptor-A in heart failure. *Circ Res* 2006; 99: 183-90.

Smith MW, Espiner EA, Yandle TG, Charles CJ, Richards AM. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. *J Endocrinol* 2000; 167: 239-46.

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332:78-81.

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: 863-70

Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Imura H. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest* 1992; 90: 1145-9.

Takei Y, Ogoshi M, Inoue K. A 'reverse' phylogenetic approach for identification of novel osmoregulatory and cardiovascular hormones in vertebrates. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28: 143-60.

Takei Y, Takahashi A, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S. A novel natriuretic peptide isolated from eel cardiac ventricles. FEBS Lett 1991; 282: 317-20.

Takei Y. Structural and functional evolution of the natriuretic peptide system in vertebrates. Int Rev Cytol 2000; 194: 1-66.

Takemura G, Takatsu Y, Doyama K, Itoh H, Saito Y, Koshiji M, Ando F, Fujiwara T, Nakao K, Fujiwara H. Expression of atrial and brain natriuretic peptides and their genes in hearts of patients with cardiac amyloidosis. J Am Coll Cardiol 1998; 31: 754-65.

Takemura N, Koyama H, Sako T, Ando K, Motoyoshi S, Marumo F. Plasma atrial natriuretic peptide (ANP) in dogs with mild heartworm infection. J Vet Med Sci 1991; 53: 323-5.

Takemura N, Toda N, Miyagawa Y, Asano K, Tejima K, Kanno N, Arisawa K, Kurita T, Nunokawa K, Hirakawa A, Tanaka S, Hirose H. Evaluation of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) concentrations in dogs with mitral valve insufficiency. J Vet Med Sci 2009; 71: 925-9.

Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 17300-5.

Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 4239-44.

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: 1811-5.

Tarnow I, Olsen LH, Kvart C, Hoglund K, Moesgaard SG, Kamstrup TS, Pedersen HD, Häggström J. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. Vet J 2009; 180: 195-201.

Taylor JA, Christenson RH, Rao K, Jorge M, Gottlieb SS. B-type natriuretic peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide are depressed in obesity despite higher left ventricular end diastolic pressures. Am Heart J 2006; 152: 1071-6.

Thomas WP, Gaber CE, Jacobs GJ, Kaplan PM, Lombard CW, Moise NS, Moses BL. Recommendations for standards in transthoracic two-dimensional echocardiography in the dog and cat. Echocardiography Committee of the Specialty of Cardiology, American College of Veterinary Internal Medicine. J Vet Intern Med 1993; 7: 247-52.

Tietgen K. Bestimmung von "Brain Natriuretic Peptide" (BNP) bei gesunden Hunden [Hochschulschrift, Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2004.

Tominaga Y, Miyagawa Y, Toda N, Takemura N. The diagnostic significance of the plasma N-terminal pro-B-type natriuretic Peptide concentration in asymptomatic cats with cardiac enlargement. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 971-5.

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: 1126-30.

Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC Jr. Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res* 2002; 91: 1127-34.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Matsui T, Kinoshita M. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1228-33.

Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 2001; 23: 261-9.

Van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr. The evolution of the natriuretic peptides - Current applications in human and animal medicine. *J Vet Cardiol* 2009; 11 Suppl 1: 9-21.

Vollmar AM, Montag C, Preusser U, Kraft W, Schulz R. Atrial natriuretic peptide and plasma volume of dogs suffering from heart failure or dehydration. *Zentralbl Veterinarmed A* 1994; 41: 548-57.

Vollmar AM, Reusch C, Kraft W, Schulz R. Atrial natriuretic peptide concentration in dogs with congestive heart failure, chronic renal failure, and hyperadrenocorticism. *Am J Vet Res* 1991; 52: 1831-4.

Walther T, Stepan H. C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development. *J Endocrinol* 2004; 180: 17-22.

Wei CM, Aarhus LL, Miller VM, Burnett JC Jr. Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am J Physiol* 1993; 264: 71-3.

Weidmann P, Hasler L, Gnädinger MP, Lang RE, Uehlinger DE, Shaw S, Rascher W, Reubi FC. Blood levels and renal effects of atrial natriuretic peptide in normal man. *J Clin Inves* 1986; 77: 734-42.

Wennberg PW, Miller VM, Rabelink T, Burnett JC Jr. Further attenuation of endothelium-dependent relaxation imparted by natriuretic peptide receptor antagonism. *Am J Physiol* 1999; 277: 1618-21.

Wess G, Butz V, Mahling M, Hartmann K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. Am J Vet Res 2011; 72: 642-9.

Wess G, Daisenberger P, Hirschberger J. The Utility of NT-proBNP to Differentiate Cardiac and Respiratory Causes of Dyspnea in Cats. J Vet Intern Med [abstract] 2008; 22: 707.

Wess G, Daisenberger P, Mahling M, Hirschberger J, Hartmann K. Utility of measuring plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in detecting hypertrophic cardiomyopathy and differentiating grades of severity in cats. Vet Clin Pathol 2011; 40: 237-44.

Wijeyaratne CN, Moult PJ. The effect of alpha human atrial natriuretic peptide on plasma volume and vascular permeability in normotensive subjects. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76: 343-6.

Wolf J, Gerlach N, Weber K, Klima A, Wess G. Lowered N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in response to treatment predict survival in dogs with symptomatic mitral valve disease. J Vet Cardiol 2012; 14: 399-408.

Worster A, Balion CM, Hill SA, Santaguida P, Ismaila A, McKelvie R, Reichert SM, McQueen MJ, Booker L, Raina PS. Diagnostic accuracy of BNP and NT-proBNP in patients presenting to acute care settings with dyspnea: a systematic review. Clin Biochem 2008; 41: 250-9.

Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8525-9.

Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG, Cuneo R, Espiner EA, Livesey JH. Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. Life Sci 1986; 38: 1827-33.

Yang RH, Jin HK, Wyss JM, Chen YF, Oparil S. Pressor effect of blocking atrial natriuretic peptide in nucleus tractus solitarii. Hypertension 1992; 19: 198-205.

Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jougasaki M, Kurose M, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Imura H. Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. Circulation 1991; 84: 1581-8.

Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. Circulation 1993; 87: 464-9.

Zeidel ML, Kikeri D, Silva P, Burrowes M, Brenner BM. Atrial natriuretic peptides inhibit conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells. J Clin Invest 1988; 82: 1067-74.

Zeidel ML. Regulation of collecting duct Na<sup>+</sup> reabsorption by ANP 31-67. Clin Exp Pharmacol Physiol 1995; 22: 121-4.

Zimmering TM, Meneses F, Nolte IJ, Simon D. Measurement of N-terminal proatrial natriuretic peptide in plasma of cats with and without cardiomyopathy. Am J Vet Res 2009; 70: 216-22.

## **IX. DANKSAGUNG**

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Hirschberger, meinen Doktorvater, für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung der Doktorarbeit, seine Geduld und sein Verständnis während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Ich danke Herrn Dr. Gerhard Wess, für seine wertvollen fachlichen Anregungen, die maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben, seine Hilfe bei den statistischen Auswertungen und dem Team der Kardiologie für die Durchführung der Echokardiographien.

Herrn Prof. Ammer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München, danke ich für seine fachlichen Ratschläge und die Bereitstellung des Labors zur Durchführung der Tests.

Silja danke ich für das Korrekturlesen und dafür, dass sie immer für mich da war und mich seelisch und moralisch unterstützt hat.

Meinem Mann Andreas danke ich für die Hilfe bei allen IT-Belangen und dafür, dass er die ganze Zeit über immer hinter mir stand und an mich geglaubt hat.

Simone danke ich für die stetige Motivation und dafür, dass sie stets für mein seelisches und körperliches Wohlergehen gesorgt hat.

Meinen Eltern und Frau Vogl danke ich für die Motivation, Unterstützung und Hilfe im Kampf gegen jegliche Zweifel.

Und nicht zuletzt danke ich meinen drei Yorkies Pauli, Bobby und Mina, die stets für die nötige Entspannung und Ablenkung gesorgt haben