

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von PD Dr. Gerhard Wess

**NT-proBNP und proANP 31 - 67 in
verschiedenen Stadien der
Mitralklappenendokardiose des Hundes
und als prognostische Parameter im
Herzversagen**

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

von Johanna Katharina Wolf
aus Regensburg

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Mitralklappenendokardiose.....	2
1.1.	Pathologie und mögliche Pathogenese.....	2
1.2.	Pathophysiologie und Verlauf.....	3
1.3.	Schweregradeinteilung	4
1.3.1.	Einteilung nach echokardiographischen Parametern	4
1.3.1.1.	Beurteilung des Mitralklappenapparats im zweidimensionalen Bild.....	5
1.3.1.2.	Beurteilung des linken Vorhofs	5
1.3.1.3.	Beurteilung des linken Ventrikels mittels motion mode.....	6
1.3.1.4.	Simpson-Scheibchensummations-Methode	7
1.3.1.5.	Beurteilung mittels Doppler-Methoden	8
1.3.1.5.1.	Beurteilung der jet area	8
1.3.1.5.2.	Beurteilung der Vena contracta.....	9
1.3.1.5.3.	Beurteilung der proximal isovelocity surface area.....	10
1.3.2.	Einteilung nach klinischen und röntgenologischen Gesichtspunkten.....	11
1.3.2.1.	Modifiziertes System nach der New York Heart Association	11
1.3.2.2.	International Small Animal Cardiac Health Council	12
1.3.2.3.	System des Canine Heart Failure International Expert Forum und des American College of Veterinary Internal Medicine.....	12
2.	Natriuretische Peptide	13
2.1.	Allgemeines und Funktion	14
2.2.	Einteilung der natriuretischen Peptide	14
2.2.1.	Atriales natriuretisches Peptid und aminoterminales atriales natriuretisches Peptid.....	14
2.2.2.	B-Typ natriuretisches Peptid und N-terminals pro B-Typ natriuretisches Peptid.....	15
2.3.	Hauptanwendung in der Humankardiologie	16
2.4.	Natriuretische Peptide in der Kleintiermedizin.....	16
2.4.1.	Natriuretische Peptide in verschiedenen Stadien der Mitralklappenendokardiose.....	17

2.4.2.	Natriuretische Peptide als prognostische Parameter	18
2.5.	Abhängigkeit der Konzentration der natriuretischen Peptide von Geschlecht, Alter und Gewicht	19
2.6.	Abhängigkeit der natriuretischen Peptide von extrakardialen Erkrankungen	21
III.	1. PUBLIKATION	22
IV.	2. PUBLIKATION	57
V.	DISKUSSION	67
1.	Natriuretische Peptide in verschiedenen Stadien der Mitralklappenendokardiose	67
1.1.	NT-proBNP und proANP im dekompenzierten Stadium der Mitralklappenendokardiose	67
1.2.	NT-proBNP und proANP im asymptomatischen Stadium der Mitralklappenendokardiose im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ..	69
1.3.	NT-proBNP und proANP in CHIEF-Klasse B1 und B2	70
1.4.	Erhöhte natriuretische Peptid-Konzentrationen bei herzgesunden Hunde.....	71
1.5.	Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Konzentration der natriuretischen Peptide	72
2.	Natriuretische Peptide in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und Gewicht	73
3.	Natriuretische Peptide als prognostische Parameter	75
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	79
VII.	SUMMARY	81
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	83
IX.	DANKSAGUNG	107

Abkürzungsverzeichnis

2-D	zweidimensional
ANP	atriales natriuretisches Peptid
BMI	body mass index
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bzw.	beziehungsweise
CHF	congestive heart failure = kongestives Herzversagen
CHIEF	Canine Heart failure International Expert Forum
CKCS	Cavalier King Charles Spaniel
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
DNP	Dendroaspis-natriuretisches Peptid
EDD	enddiastolischer Durchmesser des linkes Ventrikels
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HWZ	Halbwertszeit
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
LA	linkes Atrium
LA/Ao	Verhältnis von linkem Atrium zu Aorta
LV	linker Ventrikel
MKE	Mitralklappenendokardiose
M-Mode	motion mode
MR	Mitralregurgitation
NP	natriuretische Peptide

NT-proANP	N-terminales pro-atriales natriuretisches Peptid
NT-proBNP	N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid
NYHA	New York Heart Association
PISA	proximal isovelocity surface area
proANP	pro-atriales natriuretisches Peptid 31 – 67
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RJ	Regurgitationsjet
SHBG	sex-hormone binding globuline
VIC	valvular interstitial cells = valvuläre Interstitiumszellen
VNP	ventrikuläres natriuretisches Peptid

I. EINLEITUNG

Die Mitralklappenendokardiose (MKE) stellt die häufigste Herzerkrankung beim Hund dar (DETWEILER & PATTERSON, 1965). Als Goldstandard, diese Erkrankung zu diagnostizieren und den Schweregrad zu beurteilen, gilt momentan die Echokardiographie. Diese Untersuchungsmöglichkeit steht aber in den wenigsten Kleintierpraxen zur Verfügung und ist außerdem für den Patientenbesitzer vergleichsweise kostenintensiv.

In zahlreichen human- und tiermedizinischen Studien wird berichtet, dass natriuretische Peptide (NP) bei Herzerkrankungen aller Art erhöht sind und mit der Schwere der Erkrankung steigen. Diese Studien zeigen das Potential der NP, durch eine einfache Blutuntersuchung Herzerkrankungen auch ohne Ultraschall zu diagnostizieren und eventuell auch den Schweregrad einer Erkrankung festzustellen. Allerdings untersuchen die bisher existierenden Studien über NP bei MKE nur relativ kleine Patientenpopulationen und liefern für die Differenzierung zwischen den verschiedenen Stadien der MKE mithilfe der NP keine übereinstimmenden Ergebnisse (SERRES et al., 2009; TAKEMURA et al., 2009). Weiterhin können NP als prognostische Parameter bei Patienten im kongestiven Herzversagen dienen. In der Humanmedizin haben die Konzentrationen der NP nach Therapiebeginn wesentlich bessere Aussagekraft hinsichtlich der Mortalität als die Werte bei Erstvorstellung (LOGEART et al., 2004). Da die Überlebenszeit bei Patienten mit MKE im dekompensierten Stadium schlecht prognostizierbar ist, könnten NP eine zusätzliche Option darstellen, den Patientenbesitzern hinsichtlich der Prognose für ihre Haustiere genauere Informationen zur Verfügung zu stellen. So ließen sich auch Risikopatienten identifizieren, die von einer entsprechenden Therapieanpassung profitieren könnten.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Konzentration von N-terminalem pro B-Typ natriuretischem Peptid (NT-proBNP) und pro-atrialem natriuretischem Peptid 31 – 67 (proANP) in verschiedenen Stadien der MKE und im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe zu untersuchen und zusätzlich den Einfluss von Alter, Geschlecht und Gewicht festzustellen. Außerdem sollte die prognostische Aussagekraft dieser beiden NP bei Patienten im dekompensierten Stadium der MKE an verschiedenen Untersuchungstagen evaluiert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Mitralklappenendokardiose

Die MKE ist die häufigste Herzerkrankung beim Hund. Es wird geschätzt, dass sie etwa 75 % der Herzerkrankungen beim Hund ausmacht (DETWEILER & PATTERSON, 1965), wobei männliche im Vergleich zu weiblichen Patienten ungefähr das doppelte Risiko haben im Alter eine schwere Form dieser Erkrankung zu entwickeln (SERFASS et al., 2006). Die Prävalenz ist bei kleinen Hunden (< 20 kg) höher als bei großen Rassen (DETWEILER & PATTERSON, 1965; THRUSFIELD et al., 1985; SWENSON et al., 1996; SERFASS et al., 2006). Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) sind prädisponiert die Erkrankung schon in relativ jungem Alter zu entwickeln, allerdings scheint sich das Fortschreiten der Erkrankung bis zum Herzversagen nicht vom Krankheitsverlauf anderer kleiner Hunderassen zu unterscheiden (HAGGSTROM et al., 1992; BEARDOW & BUCHANAN, 1993). Da bestimmte Rassen häufiger als andere von dieser Erkrankung betroffen sind, wird angenommen, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung spielen. Zwei Studien geben Hinweise darauf, dass es sich um eine polygenetische Erkrankung handeln könnte (SWENSON et al., 1996; OLSEN et al., 1999). In einer aktuellen Studie sind zwei Gen-Loci beim CKCS identifiziert worden, die in Zusammenhang mit der Entwicklung von MKE stehen (MADSEN et al., 2011).

1.1. Pathologie und mögliche Pathogenese

Die Erkrankung wird durch eine progressive, myxomatöse Degeneration der Mitralklappe alleine oder zusammen mit der Trikuspidalklappe verursacht (PEDERSEN et al., 1996; HAGGSTROM et al., 2005). Makroskopische Befunde sind verdickte Klappensegel mit verlängerten und ebenfalls verdickten Chordae tendineae. In späten Stadien der Erkrankung ist der linke Ventrikel (LV), der Mitralannulus und das linke Atrium (LA) dilatiert. Durch den Insuffizienzjet verursachte Wandläsionen, gerissene Chordae tendineae und sekundäre Fibrose der Klappensegel sind weitere mögliche pathologische Befunde der MKE (KOGURE, 1980). Es existiert ein Klassifikationssystem basierend auf dem Grad

der Nodularität, Verdickung und Verformung der Klappen (POMERANCE & WHITNEY, 1970).

Histopathologisch ist die Erkrankung durch Ablagerung von Glykosaminoglykanen in der Spongiosa und Fibrosa des Klappenapparats gekennzeichnet. Weiterhin besteht eine mit dem Schweregrad zunehmende Desorganisation der Kollagenfasern und Abtragung des Endothels (KOGURE, 1980; HADIAN et al., 2007; OYAMA & LEVY, 2009). Verschiedene Studien konnten Hinweise darauf finden, dass pathologische Veränderungen der valvulären Interstitiumszellen (valvular interstitial cells, VIC) in aktivere Myofibroblasten offensichtlich eine Schlüsselrolle in der myxomatösen Degeneration der Mitralklappen spielen (RABKIN et al., 2001; BLACK et al., 2005; HAN et al., 2008). Die Ursachen und molekularen Mechanismen für diesen pathologischen Prozess sind nicht bekannt. Möglicherweise führt mechanischer Stress auf das Endothel und/oder die VIC zu dieser Veränderung und zur Freisetzung von Mediatoren, die zur Produktion von Proteoglykanen und Reduzierung von Kollagen führen (RABKIN et al., 2001). Erhöhte tissue growth factor- β -Isoformen und Matrix-Metalloproteasen sind möglicherweise Mediatoren, die für die VIC-Differenzierung mitverantwortlich sind (RABKIN et al., 2001; DISATIAN et al., 2008; AUPPERLE et al., 2009; OBAYASHI et al., 2011). Des Weiteren gaben zahlreiche Studien Hinweise darauf, dass auch der Serotonin-Stoffwechsel stark mit der Differenzierung und Proliferation der VIC assoziiert ist (JIAN et al., 2002; GUSTAFSSON et al., 2005; OYAMA & CHITTUR, 2006). Erhöhte serotonerge Aktivität oder erniedrigte Serotonin-Clearance scheint die mitogenen Mechanismen der VIC zu aktivieren (CONNOLLY et al., 2009b). Eine weitere Studie zeigte außerdem eine höhere Dichte von Endothelin-Rezeptoren bei myxomatös veränderten Klappen als an gesunden Klappen (MOW & PEDERSEN, 1999).

1.2. Pathophysiologie und Verlauf

Die Veränderungen an den Klappen führen zu einer inkompletten Koaptation der Klappensegel und damit zur Insuffizienz. Durch die Klappeninsuffizienz und den damit verringerten Herzauswurf sinkt der Blutdruck, wodurch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) aktiviert wird. Die damit verbundene

Natrium- und Wasserretention führt zur Zunahme des Gesamtblutvolumens (KNOWLEN et al., 1983) und somit zur fortschreitenden Volumenüberladung des LV. Zusätzlich trägt auch das Regurgitationsvolumen zu dieser Vergrößerung des LV bei (CARABELLO, 1998). Durch den Regurgitationsjet (RJ) kommt es auch zur Erhöhung des Blutvolumens im LA und damit zu einer Druckerhöhung. Diese Druckerhöhung kann sich bis in die Lungenkapillaren fortsetzen und so in schweren Fällen zur Entstehung eines Lungenödems führen (KITTLESON, 1998).

Bei kleinen Rassen schreitet die Erkrankung in der Regel langsam, aber mit nicht vorhersehbarer Geschwindigkeit fort. Bei großen Rassen scheint die Progression allerdings schneller zu sein (BORGARELLI et al., 2004). Risiko-Faktoren für eine rapide Progression stellen Alter, Grad der Mitralregurgitation und Schwere der Klappenveränderungen, wie Prolaps der Klappe, Grad der Klappenverdickung oder Ruptur von größeren Chordae tendineae, dar (HAGGSTROM et al., 1992; PEDERSEN et al., 1999; OLSEN et al., 2003; SERRES et al., 2007; BORGARELLI et al., 2008). Nach dem Auftreten von kongestiven Herzversagen (congestive heart failure, CHF) scheinen die benötigte Dosis an Entwässerungsmedikamenten, das Verhältnis von LA zu Aorta (LA/Ao), Leistungsfähigkeit, Kreatininkonzentration und die systolische Funktion prognostische Aussagekraft zu haben (BORGARELLI et al., 2008; HAGGSTROM et al., 2008). Außerdem wurde berichtet, dass Komplikationen wie Vorhofflimmern, Ruptur eines größeren Sehnenfadens oder pulmonale Hypertonie mit schlechterem klinischen Ausgang assoziiert sind (HAGGSTROM et al., 2005).

1.3. Schweregradeinteilung

Die Schweregradeinteilung der MKE kann nach verschiedenen echokardiographischen Parametern erfolgen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Unterteilung nach klinischen und röntgenologischen Anzeichen.

1.3.1. Einteilung nach echokardiographischen Parametern

Der Schweregrad der Mitralinsuffizienz lässt sich mit unterschiedlichen echokardiographischen Methoden beurteilen. Studien in der Humanmedizin zeigten, dass ein einziger Parameter nicht ausreicht, um eine genaue Aussage zu treffen (THOMAS et al., 1999; BUCK et al., 2006). Deshalb wird sowohl in der

Humanmedizin (ZOGHBI et al., 2003) als auch in der Tiermedizin (BOON, 1998) empfohlen, eine Kombination aus zweidimensionaler (2-D) Echokardiographie und Doppler-Methoden für die Beurteilung der Mitralinsuffizienz zu verwenden. Im Folgenden werden einige routinemäßig genutzte Beurteilungsmöglichkeiten beschrieben.

1.3.1.1. Beurteilung des Mitralklappenapparats im zweidimensionalen Bild

Der Mitralklappenapparat besteht aus den Annula, den Segeln, den Chordae tendineae und den Papillarmuskeln. Die Evaluation dieser Strukturen soll den Ursprung der Mitralregurgitation (MR) erklären und ergibt Hinweise auf den Schweregrad. Zum Beispiel ist ein sogenannter Flail (Abbildung 1), durch den Riss einer randständigen Chorda tendinea verursacht, in der Regel mit einer schwereren MR assoziiert (ZOGHBI et al., 2003; SERRES et al., 2007).

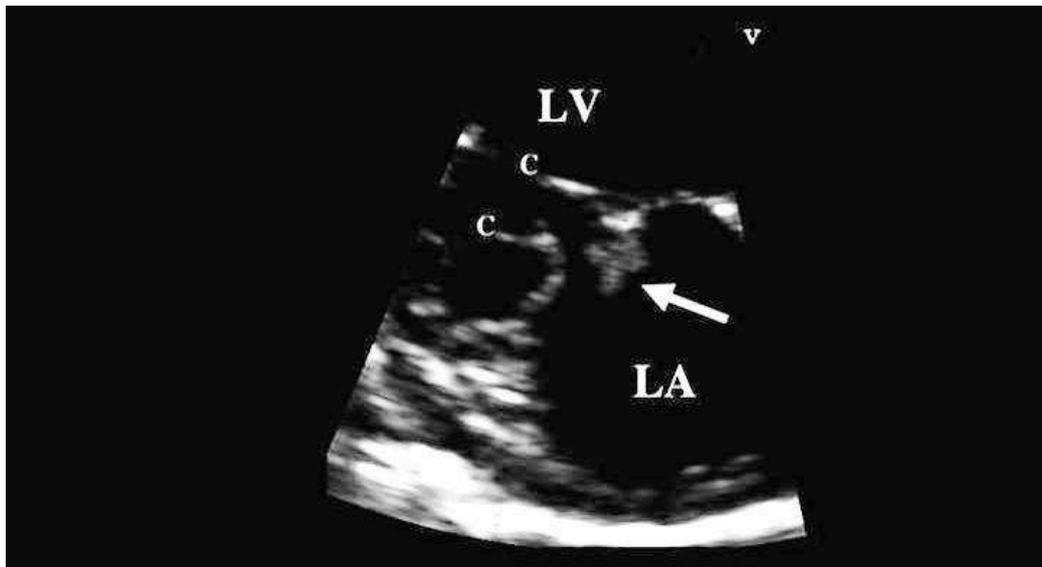


Abbildung 1: Flail des anterioren Mitralklappensegels (Pfeil). Aufnahme im rechtsparasternalen Vierkammerblick in der Systole (LA = linkes Atrium; LV = linker Ventrikel; c = Chordae tendineae; nach SERRES et al., 2007)

1.3.1.2. Beurteilung des linken Vorhofs

Für die Beurteilung des Schweregrades der MKE ist der Grad der Vergrößerung des linken Vorhofs ein wichtiger Parameter (PAPE et al., 1991; OYAMA, 2004). Nach Angaben in der aktuellen Literatur (HANSSON et al., 2002; SERFASS et al., 2006; CONNOLLY et al., 2008; LORD et al., 2010; WESS et al., 2010) wird die Vorhofgröße meist im Verhältnis zur Aorta in der basalen rechtsparasternalen Kurzachse bestimmt (Abbildung 2). Hierbei wird der Durchmesser der Aorta auf

einer Linie zwischen den Punkten, die sich an den Kommissuren der Aortenklappenblätter orientieren, gemessen. Der Durchmesser des linken Vorhofs wird zwischen der Kommissur des nichtkoronaren und linkskoronaren Aortenklappenblattes und der linksatrialen freien Wand bestimmt (HANSSON et al., 2002). Der Zeitpunkt der Messung ist die frühe Diastole, also der Zeitpunkt des Aortenklappenschlusses. Bei gesunden Hunden überschreitet das Verhältnis LA/Ao den Wert 1,6 nicht (RISHNIW & ERB, 2000; HANSSON et al., 2002).

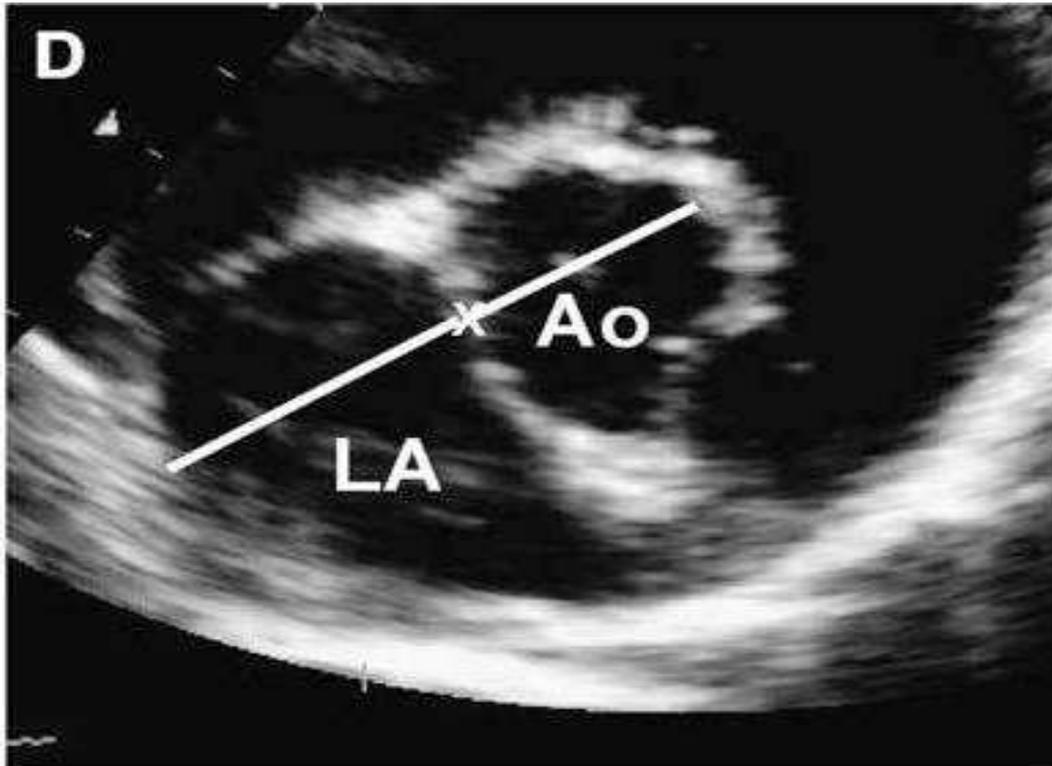


Abbildung 2: Beurteilung der Vorhofgröße (LA = linkes Atrium; Ao = Aorta; nach OYAMA, 2004)

1.3.1.3. Beurteilung des linken Ventrikels mittels motion mode

Mittels des motion modes (M-Mode) kann in der rechtsparasternalen Längs- und Kurzachse der Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole (EDD) als Parameter für eine Volumenüberladung und in der Systole (ESD) als Parameter für eine systolische Dysfunktion bestimmt werden. Dabei wird entlang einer Linie durch den linken Ventrikel die Bewegung der entsprechenden Wandsegmente in der zeitlichen Abfolge dargestellt (SCHILLER et al., 1989; THOMAS et al., 1993), (Abbildung 3). Nachteile dieser Methode sind Ungenauigkeiten, die dadurch entstehen können, dass nur an einer Stelle des Herzens gemessen wird. Außerdem können durch eine winkelungenaue Positionierung des Schallstrahls in

der Kurzachse die Dimensionen überschätzt werden (SCHOBER & BAADE, 2000).

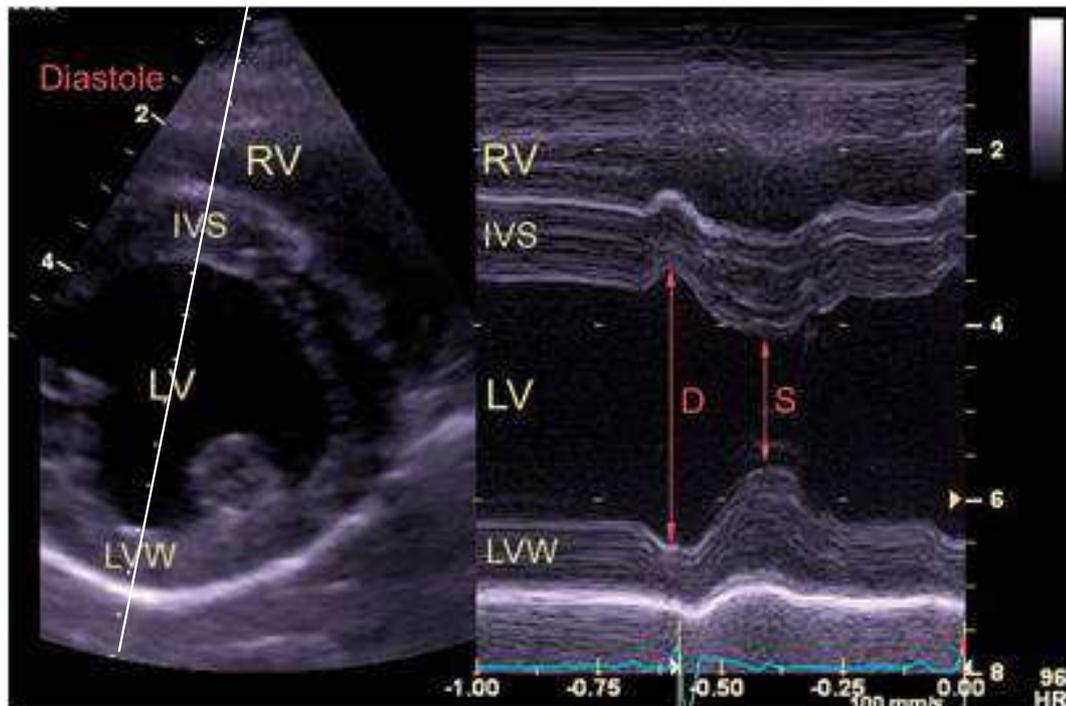


Abbildung 3: Motion mode Aufnahme des linken Ventrikels in der rechtsparasternalen Kurzachse; links: Messlinie durch den linken Ventrikel; rechts: Wandbewegung im zeitlichen Verlauf; (RV = rechter Ventrikel, IVS = interventrikuläres Septum, LV, = linker Ventrikel, LVW = linksventrikuläre Wand, D = Diastole, S = Systole; nach BONAGURA & SCHOBER, 2009).

1.3.1.4. Simpson-Scheibchensummations-Methode

In der Humanmedizin ist momentan die Simpson-Scheibchensummationsmethode für Volumenmessungen des LV die Methode der Wahl (LANG et al., 2005; LANG et al., 2006). Bei dieser Methode wird der LV im 2-D-Bild in zwei orthogonalen Ebenen, zum Beispiel im linksapikalen Vier- und Zweikammerblick, dargestellt. Das Endokard wird in der Diastole und der Systole markiert und dann die Länge des Ventrikels von der Mitte des Mitralannulus bis zur Herzspitze bestimmt. Ein mathematischer Algorithmus erstellt scheibchenförmige Zylinder und berechnet aus ihnen dann das enddiastolische und endsystolische Volumen der Kammer (KITTLESON, 1998). Wenn keine zwei adäquaten orthogonalen Ebenen verfügbar sind, kann auch eine Ebene verwendet werden (LANG et al., 2005; LANG et al., 2006). Messungen in der Tiermedizin werden in der Regel vom rechtsparasternalen Vierkammerblick und

vom links-apikalen Vierkammerblick durchgeführt (SERRES et al., 2008; WESS et al., 2010) (Abbildung 4).

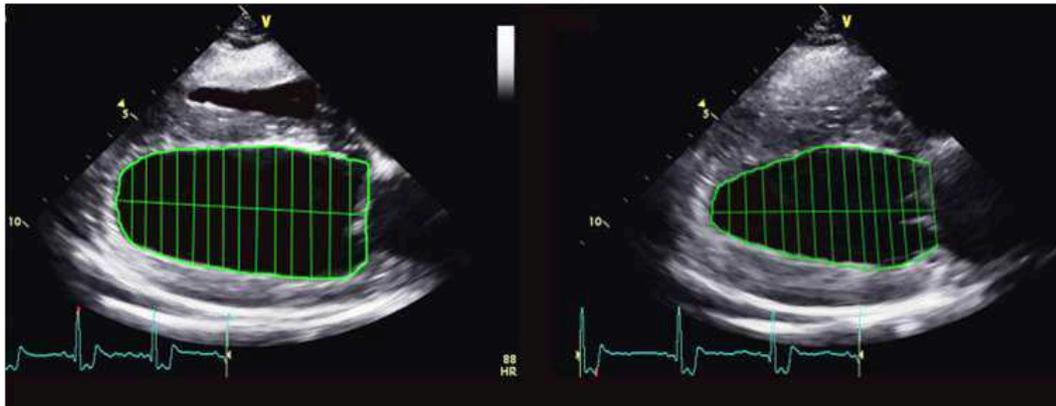


Abbildung 4: Simpson-Scheibchen-Summationsmethode, Aufnahme des linken Ventrikels in der Diastole (links) und in der Systole (rechts) in der rechtsparasternalen Längsachse (nach WESS et al., 2010).

1.3.1.5. Beurteilung mittels Doppler-Methoden

Mittels Farbdoppler ist der objektive Nachweis eines RJ möglich. Es gibt drei Methoden, um den Mitralregurgitationsschweregrad zu evaluieren: die jet area, die Vena contracta und die proximal isovelocity surface area (PISA) (ZOGHBI et al., 2003).

1.3.1.5.1. Beurteilung der jet area

Im linksapikalen Vierkammerblick kann mit Hilfe des Farbdopplers das Verhältnis des RJ zum LA dargestellt werden (Abbildung 5). Generell kann gesagt werden, dass große Jets, die eine größere Fläche des Atriums ausfüllen, einer größeren Mitralregurgitation entsprechen als kleine Jets, die nur bis kurz hinter die Klappen reichen (ZOGHBI et al., 2003). Allerdings ist die Korrelation zwischen jet area und Schweregrad der Mitralregurgitation aufgrund einiger technischer und hämodynamischer Limitationen gering. Zum einen erscheinen exzentrische Jets, die an der Wand anstoßen, kleiner als zentrale Jets und können somit unterschätzt werden (CHEN et al., 1991; ENRIQUEZ-SARANO et al., 1993; ZOGHBI et al., 2003). Zum anderen erscheint der Jet desto größer, je höher der Druck im linken Ventrikel ist, weshalb immer zusätzlich der Blutdruck gemessen werden sollte (ZOGHBI et al., 2003). Außerdem kann sich derselbe RJ, je nach Größe des linken Atriums, kleiner oder größer darstellen (ZOGHBI et al., 2003). Es hat sich in der Human- und Tiermedizin bewährt, die RJ-Fläche auf die

Vorhoffläche zu normalisieren. In der human- und veterinärmedizinischen Literatur werden, je nach Autor sehr unterschiedlich, eine Prozentzahl von 0 – 30 % als milde, 20 - 80 % als moderate und über 40 – 80 % als hochgradige Mitralinsuffizienz bezeichnet (HELMCKE et al., 1987; DETAINT et al., 2005; MOESGAARD et al., 2005; TARNOW et al., 2009; LJUNGVALL et al., 2010).



Abbildung 5: Jet area (rote Umrandung) im Vergleich zur Größe des linken Atriums (gelbe Umrandung). Der Jet verläuft exzentrisch, was zu einer Unterschätzung des Schweregrads führen kann (nach BUCK et al., 2006).

1.3.1.5.2. Beurteilung der Vena contracta

Als Vena contracta wird die engste Stelle des mit dem Farbdoppler dargestellten RJ, welche hinter der Regurgitationsöffnung auftritt, bezeichnet (Abbildung 6). Vom Durchmesser der Vena contracta können Rückschlüsse auf die effektive Regurgitationsöffnung gezogen werden (ENRIQUEZ-SARANO et al., 1994). Die Messung sollte bei größtmöglicher Vergrößerung in hoher Auflösung und in mehreren Ebenen senkrecht zur Kommissurlinie erfolgen (ZOGHBI et al., 2003). Nachteile dieser Methode sind, dass die Regurgitationsöffnung oft nicht konstant ist und bei hämodynamischen Änderungen oder während der Systole variieren

kann (KIZILBASH et al., 1998). Eine andere Studie zeigte, dass die Vena contracta die Regurgitationsöffnung überschätzt und stark von Flussrate und Geräteeinstellung abhängig ist (MASCHERBAUER et al., 2005). Dagegen wiesen Lesnik-Sobelga und Mitarbeiter allerdings eine gute Korrelation mit dem Schweregrad nach (LESNIAK-SOBELGA et al., 2004).

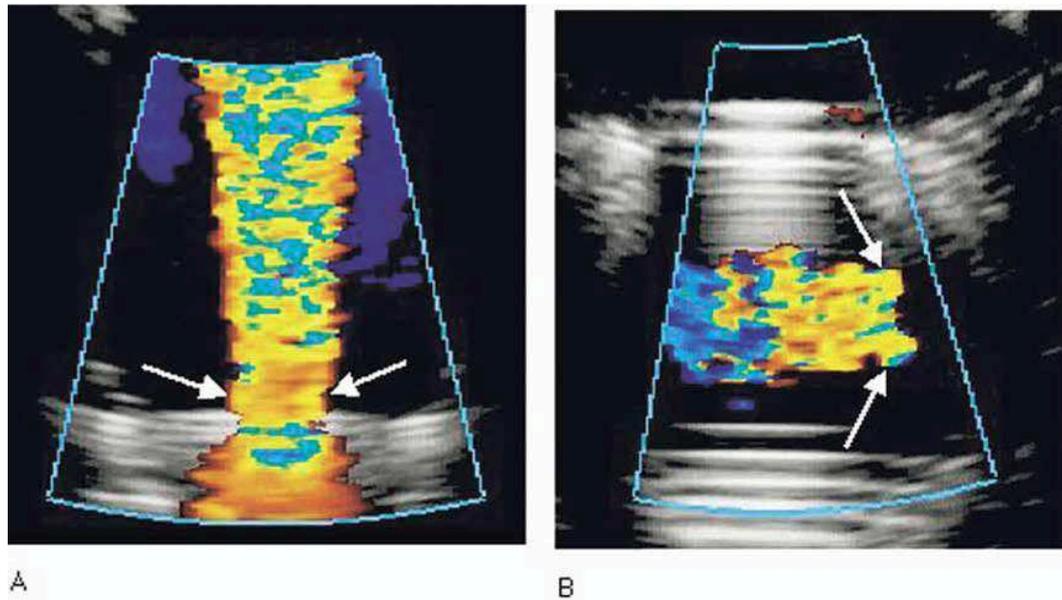


Abbildung 6: Regurgitationsjet in axialer (A) und dazu rechtwinkliger (B) Aufnahme. Die Vena contracta stellt die engste Stelle des Jets (Pfeile) dar (nach MASCHERBAUER et al., 2005).

1.3.1.5.3. Beurteilung der proximal isovelocity surface area

PISA ist eine weitere Methode um den Schweregrad einer Mitralinsuffizienz zu beurteilen und wird in der Humanmedizin routinemäßig genutzt (ZOGHBI et al., 2003). Die PISA-Methode beruht auf dem hämodynamischen Kontinuitätsprinzip, welches aussagt, dass Flüssigkeit, die auf eine enge Öffnung zufließt, von außen nach innen Hemisphären von höher werdender Geschwindigkeit und abnehmender Oberfläche bildet. Dieses Prinzip lässt sich auf den Blutfluss durch eine undichte Mitralklappe übertragen. Über den Radius der proximalen Fluss-Konvergenz-Hemisphäre und das Nyquist-Limit können dann die effektive Regurgitationsöffnung, die Flussrate durch die Regurgitationsöffnung und die Regurgitationsfraktion bestimmt werden (ZOGHBI et al., 2003) (Abbildung 7). Nachteile der Methode sind, dass zum einen die proximale Fluss-Konvergenz-Zone häufig nicht hemisphärisch ist, worauf aber die Formel zur Berechnung basiert (SIMPSON et al., 1996). Außerdem können exzentrische Jets, die keine

kreisrunde Öffnung haben nicht genau gemessen werden. PISA überschätzt bei schlitzförmigen Regurgitationsöffnungen und unterschätzt bei sichelförmigen Öffnungen (TOKUSHIMA et al., 2001).

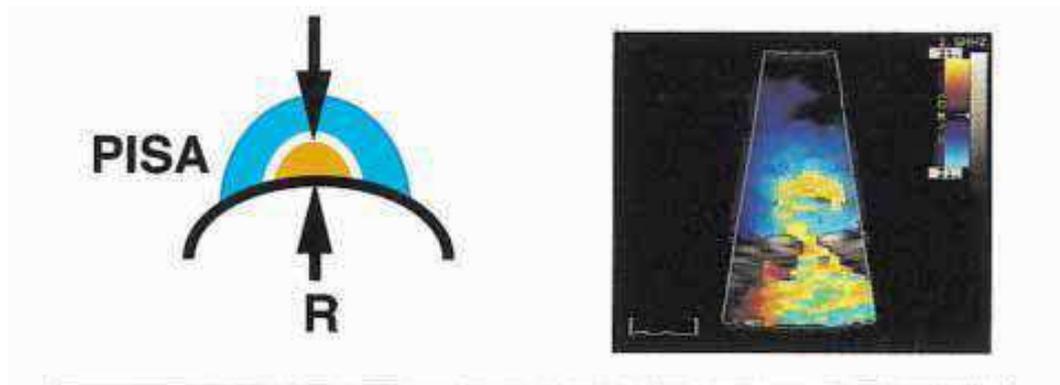


Abbildung 7: Links: Schema der proximal isovelocity surface area (PISA). Im axialen Blick wird der Radius (R) zentral parallel zur Blutflussrichtung gemessen. Rechts: Farb-Doppler-Aufnahme von PISA (nach TOKUSHIMA et al., 2001).

1.3.2. Einteilung nach klinischen und röntgenologischen Gesichtspunkten

Es gibt verschiedene funktionelle Klassifikationssysteme, anhand derer die Patienten nach klinischen Parametern, wie Leistungsschwäche und Husten oder Kardiomegalie auf dem Röntgenbild, eingeteilt werden (ETTINGER SJ, 1970). Die verschiedenen Systeme variieren in den Details, dienen aber als Schema um die Patienten nach dem Grad ihrer Symptome einteilen (ATKINS et al., 2009).

1.3.2.1. Modifiziertes System nach der New York Heart Association

Die humanmedizinische New York Heart Association (NYHA) hat ein Einteilungssystem entworfen, das vier Krankheitsstufen beschreibt. Für die Tiermedizin wurde dieses System leicht modifiziert und kann wie folgt zusammengefasst werden: Klasse 1 beschreibt Patienten mit asymptomatischen Herzerkrankungen. Zu Klasse 2 gehören Patienten mit einer Herzerkrankung, bei denen nur bei stärkerer Belastung Symptome auftreten. Patienten der Klasse 3 zeigen bereits Symptome bei milder Anstrengung und normalen täglichen Aktivitäten. Klasse-4-Patienten haben auch in Ruhe schwere klinische Anzeichen (ETTINGER SJ, 1970; CHETBOUL et al., 2007). Dieses Einteilungssystem gehört zusammen mit dem System des International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC) zu den bekanntesten Klassifizierungsmöglichkeiten (ATKINS

et al., 2009).

1.3.2.2. International Small Animal Cardiac Health Council

Das rein tiermedizinische ISACHC-System ist ein weiteres System, welches Patienten anhand ihrer klinischen Symptome einteilt. Als zusätzliches Kriterium wird die im Röntgen oder im Ultraschall darstellbare Kardiomegalie eingeschlossen (ISACHC, 1999). In der aktuellen Literatur wird dieses Klassifikationssystem momentan am häufigsten verwendet (GOUNI et al., 2007; SERRES et al., 2007; BORGARELLI et al., 2008; OYAMA et al., 2008).

Tabelle 1: ISACHC-Klassifikation

ISACHC Ia	ISACHC Ib	ISACHC II	ISACHC III
Asymptomatischer Patient; keine Kardiomegalie	Asymptomatischer Patient; radiologisch oder echokardiographisch darstellbare Kardiomegalie	Mildes bis moderates Herzversagen; Klinische Zeichen wie Husten oder leichte Dyspnoe in Ruhe oder bei geringer Anstrengung vorhanden	Fortgeschrittenes Herzversagen; schwere klinische Symptome wie Dyspnoe, deutlicher Aszites oder kardiogener Schock

1.3.2.3. System des Canine Heart Failure International Expert Forum und des American College of Veterinary Internal Medicine

Das Einteilungssystem des Canine Heart Failure International Expert Forum (CHIEF) ist das neueste Klassifikationsmöglichkeit in der Veterinärmedizin (STRICKLAND, 2008; HAGGSTROM, 2009) und ist dem humanmedizinischen System des American College of Cardiology/American Heart Association angepasst (HUNT et al., 2001). Es unterscheidet sich von den beiden erstgenannten Systemen durch zwei wichtige Punkte: Hunde, die bereits im CHF waren, aber symptomlos unter Therapie sind, werden nicht in die selbe Gruppe eingeteilt, wie asymptotische Hunde, die noch nie im Herzversagen waren. Außerdem werden Hunde berücksichtigt, bei denen keine momentane

Herzerkrankung vorliegt, aber ein hohes Risiko haben, zu erkranken, wie z.B. CKCS oder Dobermänner (HAGGSTROM, 2009).

Tabelle 2: CHIEF-Klassifikation

Stadium A	Stadium B	Stadium C	Stadium D
Patienten ohne nachgewiesene Herzerkrankung, aber mit dem Risiko zu erkranken	Patienten mit dokumentierter Herzerkrankung, aber ohne Anzeichen für Herzversagen	C1: Patienten im Herzversagen, aber unter Therapie symptomfrei C2: mildes bis moderates Herzversagen C3: schweres bis lebensgefährliches Herzversagen	Refraktäres Herzversagen; nicht responsiv auf optimale Therapie; ergänzende Methoden nötig, um den Patienten am Leben zu erhalten

Eine ähnliche Form dieses neuen Klassifikationssystem wird im Consensus Statement des American College of Veterinary Internal Medicine zur Therapie der MKE empfohlen (ATKINS et al., 2009). Hier wird zusätzlich eine Aufteilung in Stadium B1 und B2 vorgenommen, je nachdem, ob eine röntgenologisch oder echokardiographisch darstellbare Kardiomegalie (B2) vorliegt oder nicht (B1). Außerdem fällt hier die Untergliederung des Stadium C in mehrere Untergruppen weg.

2. Natriuretische Peptide

1981 injizierten de Bold und Mitarbeiter Ratten einen Extrakt aus atrialem Gewebe und induzierten damit Natriuresis (DE BOLD et al., 1981). Diese Beobachtung führte zur Entdeckung einer neuen Klasse von Hormonen, den natriuretischen Peptiden.

2.1. Allgemeines und Funktion

Die Familie der NP ist eine Gruppe von phylogenetisch, strukturell und funktionell verwandten Peptiden. Die Hauptfunktion dieser Peptide mit ihren natriuretischen, diuretischen und vasodilatatorischen Eigenschaften ist die Regulation des Flüssigkeitshaushalts (NISHIDA et al., 1990; LEVIN et al., 1998). Mediiert wird die Wirkung der NP durch eine Reihe von spezifischen Rezeptoren (VANDERHEYDEN et al., 2004).

2.2. Einteilung der natriuretischen Peptide

Bis jetzt sind fünf verschiedene Peptide dieser Gruppe bekannt. Das atriale natriuretische Peptid (ANP) mit seinem in der Niere produziertem Äquivalent Urodilatin (SCHULZ-KNAPPE et al., 1988), das B-Typ natriuretische Peptid (BNP), das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), das Dendroaspis natriuretische Peptid (DNP) und das ventrikuläre natriuretische Peptid (VNP). DNP wurde im Gift der grünen Mamba gefunden (SCHWEITZ et al., 1992), wobei ebenfalls DNP-Immunoreaktivität in humanem Plasma gezeigt werden konnte. Welches Gewebe DNP beim Menschen produziert ist allerdings bisher unklar (SCHIRGER et al., 1999). VNP wird vermutlich nur von primitiven Fischen produziert (INOUE et al., 2005). ANP, BNP und VNP werden primär von Kardiomyozyten produziert, während CNP vor allem im Gehirn und Endothelium freigesetzt wird (TAKEI et al., 2007). Es wird vermutet, dass CNP sowohl Neurotransmitterfunktion im zentralen Nervensystem als auch eine Rolle in der Regulation des Gefäßtonus hat (BARR et al., 1996; DEL RY et al., 2006). Im Gegensatz zu ANP und BNP hat es keine natriuretische oder diuretische Wirkung (IGAKI et al., 1998; HORIO et al., 2003).

2.2.1. Atriales natriuretisches Peptid und aminotermiales atriales natriuretisches Peptid

ANP wird vor allem in beiden Vorhöfen produziert und als proANP 1 - 126 in Granula gespeichert (HABIBULLAH et al., 1995). Bei erhöhter Wandspannung der Atrien, die durch Volumen- oder Drucküberladung entsteht, wird das C-terminale Ende, ANP 99 - 126 (ANP) abgespalten und in den Blutkreislauf freigesetzt (HABIBULLAH et al., 1995; VESELY, 2003), wo es durch Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), der Natrium-Ausscheidung und durch

Senken der Natrium-Rückresorption Natriurese und Diurese induziert (WEIDMANN et al., 1986; ZEIDEL et al., 1988). Auch wird die Sekretion von Renin, Angiotensin II und Aldosteron inhibiert (RICHARDS et al., 1988) und die zentrale und periphere Aktivität des Sympathikus gehemmt (LEVIN et al., 1998). Das N-terminale Ende, proANP 1 – 98 (NT-proANP), wird höchstwahrscheinlich zusammen mit ANP sezerniert (WINTERS et al., 1988). NT-proANP wird weiter proteolytisch in Fragmente aufgespaltet, die aus den Aminosäuren 1 - 30, 31 - 67 und 79 - 98 bestehen (WINTERS et al., 1989). Diese proANP-Peptide scheinen ähnliche physiologische Funktionen wie ANP zu haben (VESELY et al., 1987). Andere Autoren hingegen beschreiben keine biologische Aktivität dieser Fragmente (WEIR et al., 1994). Die Ventrikel selbst produzieren kaum ANP, allerdings ist die Produktion gesteigert bei volumenüberladenen oder hypertrophierten Ventrikeln und auch bei Feten und Neonaten (DE BOLD et al., 1981; SAITO et al., 1989; LEVIN et al., 1998). Die Halbwertszeit (HWZ) von ANP beträgt ein bis fünf Minuten. Dagegen besitzt NT-proANP die acht- bis zehnfache HWZ (LEVIN et al., 1998).

2.2.2. B-Typ natriuretisches Peptid und N-terminales pro B-Typ natriuretisches Peptid

BNP kann überall im myokardialen Gewebe gefunden werden, aber vor allem in den Ventrikeln (SUDOH et al., 1988; PORTER et al., 1989). Nach Stimuli, wie Dehnung des Myokards oder Hypoxie (NAKAGAWA et al., 1995; GOETZE et al., 2004), wird das Vorläufermolekül prä-proBNP 1 - 134 produziert (MARTINEZ-RUMAYOR et al., 2008). Nach Abspaltung eines 26 Aminosäuren langen Peptids entsteht proBNP 1 - 108 (SUDOH et al., 1988). Anschließend wird dieses Peptid in zwei Teile aufgespaltet, nämlich in den aminoterminalen und biologisch inaktiven Teil, NT-proBNP 1 – 76, und das biologisch aktive BNP 77 - 108. Nach seiner Freisetzung scheint BNP in gleicher Weise wie ANP Diurese und Natriurese zu induzieren und das sympathische Nervensystem und das RAAS zu inhibieren (NISHIDA et al., 1990; CLARKSON et al., 1996; LEVIN et al., 1998; BRUNNER-LA ROCCA et al., 2001). Da die HWZ von NT-proBNP deutlich länger als die von BNP ist, wird die Messung von NT-proBNP der von BNP vorgezogen (VANDERHEYDEN et al., 2004; DANIELS & MAISEL, 2007).

2.3. Hauptanwendung in der Humankardiologie

Die NP, vor allem BNP und NT-proBNP haben sich als kardiovaskuläre Biomarker in der Humanmedizin etabliert. Es wurde gezeigt, dass sie exzellente Marker sind für die Diagnose von akutem Herzversagen bei Patienten, die wegen Dyspnoe in die Notaufnahme gebracht werden (MAISEL et al., 2002; JANUZZI et al., 2005). Vor allem, wenn traditionelle Diagnostikmethoden, wie Röntgen oder Ultraschall, keine eindeutigen Ergebnisse liefern, kann die zusätzliche Bestimmung von NT-proBNP die Genauigkeit der Diagnose verbessern (MUELLER et al., 2004; JANUZZI et al., 2005). Außerdem können NP genutzt werden, um Aussagen über die Prognose bei Patienten im Herzversagen, mit ventrikulärer Dysfunktion oder mit Herzinfarkten zu treffen (TSUTAMOTO et al., 1999; HALL, 2004; LOGEART et al., 2004; BAYES-GENIS et al., 2007). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Einzel- oder Serienmessungen oder die prozentuale Änderung zwischen zwei Messungen von NP dabei helfen können, Risikopatienten zu identifizieren (MAEDA et al., 2000; CHENG et al., 2001; LOGEART et al., 2004). Außerdem scheinen NP eine bessere prognostische Aussagekraft hinsichtlich Morbidität und Mortalität zu besitzen als herkömmliche klinische und echokardiographische Parameter (GARDNER et al., 2003). Eine weitere Indikation für den diagnostischen Einsatz von NP in der Kardiologie ist die Therapieanpassung anhand von NP. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass eine medikamentöse Therapie, die anhand der BNP- oder NT-proBNP-Konzentration angepasst wurde, den herkömmlichen Therapieansätzen überlegen war (TROUGHTON et al., 2000; JOURDAIN et al., 2007).

2.4. Natriuretische Peptide in der Kleintiermedizin

Auch in der Kleintierkardiologie besteht das Potential mit Hilfe der NP herzkranken Patienten zu identifizieren oder den Schweregrad einer Herzerkrankung festzustellen. Zahlreiche Studien an Hunden und Katzen konnten zeigen, dass ANP, NT-proANP, BNP und NT-proBNP bei Patienten mit Herzerkrankungen in höheren Konzentrationen im Plasma oder Serum vorhanden waren als bei gesunden Kontrolltieren (VOLLMAR et al., 1991; HAGGSTROM et al., 1994); (SISSON, 2003; CONNOLLY et al., 2008; HORI et al., 2008); (OYAMA et al., 2007; OYAMA et al., 2008). Außerdem ergaben mehrere

Studien, dass die NP-Konzentrationen mit der Schwere einer Herzerkrankung kontinuierlich ansteigen (MACDONALD et al., 2003; DEFRANCESCO et al., 2007; CHETBOUL et al., 2009) und signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Krankheitsschweregraden bestehen (CHETBOUL et al., 2009; WESS et al., 2011).

Vergleichbar mit humanmedizinischen Ergebnissen, weisen auch tiermedizinische Studien darauf hin, dass NP zur Unterscheidung von respiratorischen Symptomen kardialer und nichtkardialer Ursache hilfreich sein könnten, wenn konventionelle Diagnostikmethoden nicht eindeutig sind. DeFrancesco und Mitarbeiter zeigten, dass die BNP-Konzentrationen bei Hunden mit Atemnot aufgrund einer dekompensierten Herzerkrankung deutlich höher sind als bei Hunden mit Husten oder Dyspnoe aufgrund einer extrakardialen Erkrankung (DEFRANCESCO et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten für NT-proBNP in zwei weiteren Studien gefunden werden. Um Hunde mit respiratorischen Symptomen von Hunden im kongestiven Herzversagen zu unterscheiden, schlugen Oyama und Mitarbeiter und Fine und Mitarbeiter einen NT-proBNP Cutoff-Wert von 1158 pmol/l bzw. 1400 pmol/l vor (FINE et al., 2008; OYAMA et al., 2009). Auch Boswood und Mitarbeiter zeigten, dass über die NT-proBNP-Konzentration Hunde mit respiratorischen Erkrankungen von solchen mit Herzerkrankungen unterschieden werden konnten. Allerdings war der vorgeschlagene Cutoff-Wert von 210 pmol/l wesentlich niedriger als bei den beiden zuvor genannten Autoren (BOSWOOD et al., 2008). Auch bei Katzen können NP zur Unterscheidung von kardialer und nicht-kardialer Dyspnoe eingesetzt werden (CONNOLLY et al., 2008; CONNOLLY et al., 2009a; FOX et al., 2009).

In einigen Studien wird zusätzlich auch von einer prognostischen Aussagekraft der NP berichtet (MACDONALD et al., 2003; CHETBOUL et al., 2009). Außerdem lieferte eine Pilotstudie an Hunden mit MKE Hinweise darauf, dass auch die Therapie von Herzerkrankungen anhand der NP-Konzentrationen gezielt angepasst werden könnte (ACHEN et al., 2009).

2.4.1. Natriuretische Peptide in verschiedenen Stadien der Mitralklappenendokardiose

Einige Studien untersuchten die Möglichkeit mithilfe der NP zwischen verschiedenen Krankheitsstadien der MKE zu unterscheiden. Häggström und

Mitarbeiter zeigten schon 1994, dass ANP bei CKCS mit MKE in NYHA-Klasse III und IV signifikant höhere Werte als herzgesunde CKCS haben. Keine Unterschiede konnten allerdings zwischen gesunden Hunden und den Klassen I und II gefunden werden (HAGGSTROM et al., 1994). Bei einer kleinen Gruppe von 19 Hunden (17 mit MKE, zwei mit DCM) stellten Asano und Mitarbeiter fest, dass die BNP-Konzentrationen mit zunehmender NYHA-Klasse kontinuierlich anstieg (ASANO et al., 1999). Bei einer Population von CKCS mit MKE, deren Schweregrad nach dem Verhältnis des RJ zum LA eingeteilt wurde, konnte allerdings erst ab einem hochgradigen Befund ein signifikanter Unterschied bei den BNP- und NT-proANP-Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (TARNOW et al., 2009). In einer weiteren Studie mit CKCS mit MKE waren die BNP-, ANP- und NT-proANP-Konzentrationen im CHF deutlich erhöht. Dabei waren die NT-proANP- und ANP-Werte auch schon im kompensierten Stadium bei Patienten mit vergrößerten Kammerdimensionen erhöht, die BNP-Werte dagegen erst im dekompenzierten Stadium (HAGGSTROM et al., 2000). Auch Moesgaard und Mitarbeiter zeigten, dass die NT-proBNP-Konzentration im Plasma erst bei Patienten mit einer Mitralregurgitation von > 50% und im CHF signifikant angestiegen war (MOESGAARD et al., 2010).

Oyama und Mitarbeiter fanden in einer Studie mit 119 Hunden mit MKE und 18 Hunden mit DCM heraus, dass mittels NT-proBNP gesunde Hunde von erkrankten Hunden unterschieden werden konnten und asymptotische Hunde mit Herzvergrößerung signifikant höhere Werte als die ohne Herzvergrößerung hatten (OYAMA et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren Studien gefunden, die eine signifikante Erhöhung der NT-proBNP-Werte bei Hunden mit MKE in ISACHC-Klasse Ib im Vergleich zu ISACHC-Klasse Ia zeigten (DROURR et al., 2008; CHETBOUL et al., 2009). Takemura und Mitarbeiter allerdings konnten bei einer Studienpopulation von 72 Hunden mit MKE und 36 Kontrolltieren keinen Unterschied zwischen den ISACHC-Klassen Ia und Ib finden und erst ab ISACHC-Klasse Ib einen signifikanten Unterschied in der NT-proBNP-Konzentration zur Kontrollgruppe feststellen (TAKEMURA et al., 2009).

2.4.2. Natriuretische Peptide als prognostische Parameter

Bisher sind die Möglichkeiten, das Risiko für Mortalität bei Hunden mit

Herzerkrankungen vorherzusagen, sehr limitiert. Daher untersuchten mehrere Studien die Möglichkeit, mithilfe von NP Herzversagen oder Mortalität im Vorhinein zu bestimmen. Greco et al. berichteten 2003, dass in einer Population von 23 Patienten im CHF aufgrund von unterschiedlichen Herzerkrankungen eine ANP-Konzentration von > 95 pg/ml mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit assoziiert war (GRECO et al., 2003). In einer weiteren Studie mit 25 MKE-Patienten konnte für jeden Anstieg der BNP-Konzentration um 10 pg/ml eine um 44 % erhöhte Mortalitätsrate über einen Zeitraum von 4 Monaten dargestellt werden (MACDONALD et al., 2003). NT-proBNP war zusammen mit LA/Ao in einer prospektiven Studie mit 72 Hunden mit asymptomatischer MKE prädiktiv für Dekompensation oder Versterben innerhalb von 12 Monaten nach der initialen Untersuchung (CHETBOUL et al., 2009). Auch Reynolds und Mitarbeiter berichteten, dass NT-proBNP und LA/Ao geeignet sind das Risiko der Entwicklung eines Lungenödems bei asymptomatischen Patienten mit MKE zu evaluieren (REYNOLDS et al., 2012). Moonarmart und Mitarbeiter beschrieben in einer aktuellen Studie, dass die NT-proBNP-Konzentration zusammen mit dem enddiastolischen Durchmesser des linken Ventrikels (EDD) bei Hunden mit MKE in allen Stadien mit der Mortalität korreliert. Hunde mit einer Konzentration von $> 738,5$ pmol/l hatten eine mittlere Überlebenszeit von 351 Tagen (MOONARMART et al., 2010). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte in einer ähnlichen Patientenpopulation, dass eine Kombination aus NT-proBNP und kardialem Troponin I von Vorteil sein könnte, um Aussagen hinsichtlich der Prognose zu treffen (HEZZELL et al., 2012). In einer weiteren Studie wurde gefunden, dass Patienten mit MKE in ISACHC-Klasse 2 und 3 mit einem NT-proBNP-Wert über 1500 pmol/l innerhalb von 6 Monaten verstarben. Für diesen Cutoff-Wert lag die Sensitivität bei 80 % und die Spezifität bei 73 % (SERRES et al., 2009). Außerdem wurde in dieser Studie eine bessere prognostische Aussagekraft für NT-proBNP als für Ultraschallparameter festgestellt (SERRES et al., 2009).

2.5. Abhängigkeit der Konzentration der natriuretischen Peptide von Geschlecht, Alter und Gewicht

Verschiedene Faktoren wie Geschlecht, Alter und Gewicht können die Konzentration der NP beeinflussen. Mehrere humanmedizinische Studien fanden

heraus, dass BNP, ANP und NT-proBNP-Konzentrationen bei Frauen signifikant höher waren als bei Männern (REDFIELD et al., 2002; SUTTON et al., 2003; FRAGOPOULOU et al., 2010), so dass vermutet wurde, dass der höhere Östrogenspiegel bei Frauen für diesen Unterschied verantwortlich ist (MAFFEI et al., 2001). Chang und Mitarbeiter stellten dagegen in einer aktuellen Studie fest, dass die BNP- und NT-proBNP-Werte mit der Konzentration von freiem Testosteron und nicht mit der von Östrogen assoziiert waren (CHANG et al., 2007). Weitere Ergebnisse zeigten außerdem, dass ANP-, NT-ANP- und BNP-Konzentrationen auch bei gesunden älteren Personen erhöht sind (JANSEN et al., 1990; WALLEN et al., 1993; DAVIS et al., 1996; REDFIELD et al., 2002). Der Mechanismus ist bis jetzt nicht geklärt. Es wird vermutet, dass eine mit dem Alter entstehende gestörte diastolische Funktion, ansteigender Blutdruck oder erniedrigte Ausscheidung über die Nieren als Ursachen in Frage kommen könnten (WALLEN et al., 1993). Übergewicht scheint dagegen mit niedrigeren BNP- und NT-proBNP-Konzentrationen assoziiert zu sein (HORWICH et al., 2001; WANG et al., 2004; KRAUSER et al., 2005). Es besteht die Hypothese, dass die fettfreien Gewebe des Körpers (lean mass) eine Substanz produzieren, möglicherweise Androgene, welche die Synthese oder Freisetzung von prä-proBNP aus den Kardiomyozyten unterdrücken (DAS et al., 2005).

In der Tiermedizin hingegen gibt es keine übereinstimmenden Beobachtungen, was die Abhängigkeit von NP von Geschlecht, Alter und Gewicht betrifft. So konnten Oyama und Mitarbeiter und DeFrancesco und Mitarbeiter keine Unterschiede der BNP und NT-proBNP-Konzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Patienten und verschiedenen Alters- und Gewichtsgruppen finden (DEFRANCESCO et al., 2007; OYAMA et al., 2008). Auch in einer weiteren Studie schienen die NT-proBNP-Werte weder mit dem Alter noch mit dem Gewicht zu korrelieren (KELLIHAN et al., 2009). Eriksson und Mitarbeiter untersuchten NT-proANP und BNP in einer Population von 17 gesunden CKCS und fanden heraus, dass die NT-proANP-Konzentration, im Gegensatz zu BNP, mit dem Alter anstieg und mit Zunahme des Körpergewichts abfiel (ERIKSSON et al., 2001). Auch in einer Studie mit Dobermännern wurde ein signifikanter NT-proBNP-Anstieg bei Hunden über acht Jahren gezeigt (WESS et al., 2011).

2.6. Abhängigkeit der natriuretischen Peptide von extrakardialen Erkrankungen

Verschiedene humanmedizinische Studien haben gezeigt, dass BNP- und NT-proBNP-Konzentrationen ansteigen, wenn die GFR oder die Kreatinin-Clearance abnimmt (MCCULLOUGH & SANDBERG, 2003; LUCHNER et al., 2005). Winters und Mitarbeiter berichteten, dass auch proANP bei Patienten mit chronischem Nierenversagen deutlich erhöht war (WINTERS et al., 1988). Auch in der Tiermedizin haben zwei Studien signifikant höhere NT-proBNP-Werte bei azotämischen Hunden dokumentiert (RAFFAN et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009). Die NT-proBNP-Konzentration war bei den azotämischen Hunden 2,4- bis 4,7-mal höher als bei der jeweils gesunden Kontrollgruppe. Dabei waren NT-proBNP-Konzentrationen bis zu Werten erhöht, die normalerweise als diagnostisch für Herzerkrankung oder Herzversagen gelten (RAFFAN et al., 2009). Auch bei Katzen im hochgradigen chronischen Nierenversagen waren die NT-proANP-Werte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (LALOR et al., 2009). Neben gestörter Nierenfunktion können auch zahlreiche andere extrakardiale Erkrankungen zu einer Erhöhung der NP im Blut führen. In der Humanmedizin fand man erhöhte NP-Konzentrationen bei Erkrankungen wie systemischer oder pulmonärer Hypertension, Lungenembolien, Sepsis oder Hyperthyreose (PHUA et al., 2005; RUDIGER et al., 2006). In veterinärmedizinischen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass systemische und/oder pulmonäre Hypertonie bei Hunden mit einer Erhöhung der NT-proBNP-Werte assoziiert waren (ATKINSON et al., 2009; OYAMA et al., 2009). Lee und Mitarbeiter verglichen Patienten im CHF mit subklinischer Herzerkrankung und mit nichtkardialen Erkrankungen aller Art mit einer gesunden Kontrollgruppe und fanden heraus, dass ein beträchtlicher Anteil der systemisch erkrankten Hunde eine BNP-Konzentration erreichten, die als diagnostisch für CHF gilt (LEE et al., 2011).

III. 1. PUBLIKATION

Von: onbehalfof+youngk+svm.vetmed.wisc.edu@manuscriptcentral.com
[<mailto:onbehalfof+youngk+svm.vetmed.wisc.edu@manuscriptcentral.com>] Im
Auftrag von youngk@svm.vetmed.wisc.edu
Gesendet: Dienstag, 19. Juni 2012 02:48
An: gwess@lmu.de
Betreff: Veterinary Clinical Pathology - Decision on Manuscript ID VCP-11-1798.R3

18-Jun-2012

Dear Dr. Wess:

I am pleased to inform you that your manuscript entitled "The diagnostic accuracy of NT-proBNP and proANP 31 - 67 in the investigation of different stages of myxomatous mitral valve disease" is accepted for publication in Veterinary Clinical Pathology pending editorial review. You may consider your manuscript as "in press". Your manuscript will be edited prior to publication and any additional reviewer comments can be addressed at that time.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Veterinary Clinical Pathology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Karen Young
Editor-in-Chief
Veterinary Clinical Pathology

The diagnostic accuracy of NT-proBNP and proANP 31 - 67 in the investigation of different stages of myxomatous mitral valve disease

JOHANNA WOLF ¹, NICOLA GERLACH ¹, KARIN WEBER ¹, ANDRÉ KLIMA ², GERHARD WESS ¹

¹ Clinic of Small Animal Medicine, LMU University, Munich, Germany

² Statistical Consulting Unit, LMU University, Munich, Germany

Address correspondence to:

Gerhard Wess, DVM, Dr. med. vet. habil., Dipl. ACVIM (Cardiology), Dipl. ECVIM-CA (Cardiology and Internal Medicine), Clinic of Small Animal Medicine, LMU University, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany

Tel: +498921801671

Fax: +49892180991671

Email: gwess@lmu.de

Running head: natriuretic peptides to diagnose myxomatous mitral valve disease

Keywords: chronic valvular disease, natriuretic peptides, gender, biomarker

Background: There is no agreement in current publications regarding the ability of natriuretic peptides (NPs) to detect patients with subclinical myxomatous mitral valve disease (MMVD) and to differentiate between asymptomatic stages.

Objectives: We sought to compare N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and pro-atrial natriuretic peptide 31 - 67 (proANP) concentrations between various stages of MMVD and to investigate the influence of age, weight and gender.

Animals: 559 examinations of 116 healthy individuals and 236 dogs with MMVD.

Methods: In this prospective study, dogs were classified into different disease stages using the modified Canine Heart failure International Expert Forum (CHIEF) system. NP concentrations were compared between groups.

Results: Using a cut-off value of 1207 pmol/l for NT-proBNP and 1578 fmol/ml for proANP, both NPs were able to differentiate dogs with MMVD with and without CHF (congestive heart failure) considerably well (NT-proBNP, sensitivity, 83%; specificity, 85%; proANP, sensitivity 83%; specificity 86%). Although there was a significant difference between CHIEF B1 and B2, both NPs were not able to reliably differentiate between asymptomatic dogs with and without cardiac enlargement. Intact female dogs (598 pmol/l and 1036 fmol/ml) had significantly higher values of both NPs than intact male dogs (315 pmol/l and 836 fmol/ml).

Conclusions: NPs in MMVD are useful to discriminate between patients with CHF and asymptomatic disease. Due to large overlap of NP-concentrations between the groups, NPs don't seem to be useful to differentiate stages B1 and

B2. Interpretation of NT-proBNP and proANP values should include consideration of gender-specific values .

Introduction

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) accounts for approximately 75% of heart diseases in dogs.¹ Prevalence of the disease is higher in small dogs (< 20 kg) than in large breed dogs and disease progression is generally slow, with increasing severity over a period of years.^{2,3}

Various methods to stage the severity of mitral valve disease are used in the current literature. Modified NYHA (New York Heart Association)⁴, ISACHC (International Small Animal Cardiac Health Council)⁵ and CHIEF⁶ are classification systems used for staging of heart disease by evaluating the severity of the patients clinical and radiographic signs. The CHIEF system is a newer approach to categorize patients more objectively on the basis of recent guidelines of the American College of Cardiology and the American Heart Association.⁷ In contrast to previous staging systems⁵, patients with past signs of congestive heart failure (CHF), but without current symptoms belong not to the same group as asymptomatic patients, which never showed signs of CHF. A similar staging system, which additionally divides asymptomatic dogs into two subgroups according to cardiac size, is recommended by the consensus panel for therapy of MMVD of the American College of Veterinary Internal Medicine.⁸ Traditionally, for diagnosis of MMVD and assessment of disease severity echocardiography and radiographs are used. To quantify the amount of mitral valve regurgitation several echocardiographic approaches based on 2-Dimensional (2-D) ultrasonography and Doppler-derived methods are available.^{3,9,10}

Both, B-type natriuretic peptide (BNP) and atrial natriuretic peptide (ANP) are released by myocardial tissue in response to volume or pressure overload and therefore increased ventricular and atrial wall stretch.^{11,12} In circulation, BNP and ANP increase natriuresis and diuresis and decrease systemic vascular resistance.¹³

ANP is encoded as a 126-amino acid precursor molecule, which is cleaved into its 98-amino acid fragment amino-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP) and ANP. NT-proANP is further cleaved into the three molecules proANP 1 - 30, proANP 31 - 67 and proANP 68 - 98¹⁴, which appear to have all physiologic functions similar to ANP.¹⁵ However, some authors don't describe any biological activity.¹⁶ Similarly to ANP, BNP is synthesized as proBNP and further cleaved into BNP and the biological inactive N-terminal end NT-proBNP.¹⁷

Several studies exist, which investigate concentrations of NPs in different stages of MMVD and there is general consent, that NPs are useful to detect patients with respiratory symptoms due to CHF.^{18,19} However, there is no agreement regarding the ability of NPs to discriminate patients without cardiac disease from patients with subclinical stages of MMVD and to differentiate between asymptomatic stages.²⁰⁻²⁴ The half-lives of NT-proBNP and NT-proANP fragments are significantly longer than those of BNP and ANP, which make them preferable as diagnostic markers.^{25,26} Furthermore, studies in humans suggest that proANP is more sensitive compared to ANP to detect mild increases in atrial filling pressures²⁷ and that proANP is the most sensitive marker among ANP, BNP, C-type NP and NT-proBNP in discriminating NYHA Class I individuals from healthy individuals.²⁸

In humans, NPs concentrations seem to be dependent on body mass index (BMI), age and androgen levels²⁹⁻³¹, but no consistent veterinary reports about age-, gender- and weight-related differences in healthy dogs exist.^{32-34,35}

The aim of the present study was to investigate the diagnostic accuracy of NT-proBNP and proANP in different stages of MMVD in a large study population,

using a modified CHIEF system. In addition, we sought to compare the diagnostic ability of NT-proBNP with proANP and to investigate the influence of age, body size and gender on NT-proBNP and proANP concentrations in a healthy population.

Material and method

Animals and examinations

This prospective study included client-owned dogs of various breeds with MMVD and a healthy control group. Dogs were prospectively enrolled at the Clinic of Small Animal Medicine, LMU University, Munich, Germany between February 2005 and November 2010. They were either presented for cardiac work-up or were healthy dogs, based on history and physical examination, owned by faculty, staff members, or students. Written owner consent was obtained. Every examination included a complete physical examination, blood pressure measurement and echocardiography. If respiratory symptoms were reported by the owners or were noticed during examination, chest radiographs were taken. All data regarding history, physical examination and diagnostic findings were recorded in a standardized datasheet. Blood samples were drawn from the cephalic or saphenous vein or were collected via jugular puncture into chilled tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and serum tubes. EDTA-samples for NT-proBNP and proANP analysis were immediately centrifuged at 3600 x g at 4°C for ten minutes, and the plasma was separated and frozen at -70°C to prevent enzymatic degradation of the analytes. Samples were analyzed in batches in our laboratory by a person trained by a laboratory specialist between December 2009 and January 2011. Serum was used for creatinine and urea measurements.

Plasma NT-proBNP and proANP were analyzed using commercially available

assays according to the manufacturers' instructions (VETSIGN Canine CardioSCREEN NT-proBNP Guildhay Ltd., Biomedica, Vienna, Austria; VETSIGN Canine CardioSCREEN proANP 31 – 67 Guildhay Ltd., Biomedica, Vienna, Austria). All samples were measured in duplicate and the mean of these two samples were used for data analysis. Both tests have been previously used and validated for diagnostic purposes in dogs.^{36,37} If the NT-proBNP concentrations were over the upper detection limit of the assay (3306 pmol/l), samples were diluted at the ratio of 1:10 with sterile 0.9% sodium chloride solution and analyzed again. For quality control commercial control samples with known NT-proBNP and proANP concentrations (Biomedica) were used. If the coefficient of variation between the two measurements of one sample was more than 10%, the sample was analyzed again. The person performing the assays was blinded to the dogs' CHIEF classification.

Echocardiographic and Doppler examinations

Echocardiographic examinations were performed by experienced cardiologists (Dipl. ACVIM or residents) and were obtained from non-sedated patients restrained in left and right lateral recumbency. To exclude any hereditary abnormalities, complete echocardiographic examination of all valves with color, continuous and pulsed wave Doppler was performed. Diameter of left atrium and aorta was measured in the right parasternal short axis at the level of the heart base and left atrium/aorta ratio (LA/Ao) was calculated.³⁸ The left atrium was considered enlarged when La/Ao was > 1.5 . To evaluate ventricular dimensions motion-mode (M-mode) measurements using the right parasternal longaxis view were used. Criteria of the diagnosis of MMVD were used as described elsewhere.³⁹ The left apical four-chamber view was used to assess size of mitral regurgitation with color Doppler. Images were analyzed frame-by-frame to

determine the area of the regurgitant jet (ARJ), which was related to left atrium area (LAA) (ARJ/LAA).¹⁰ If tricuspid or pulmonic valve insufficiency was present, peak velocity of the regurgitant jet was measured by continuous wave Doppler as previously reported, to search for evidence of pulmonary hypertension.⁴⁰

Disease staging

Dogs assigned to the healthy control group had no clinical or echocardiographic signs of heart disease.

All dogs with MMVD were classified according to the CHIEF system on the basis of their clinical symptoms and cardiac size (Table 1). With respect to recent recommendations⁸, asymptomatic dogs (CHIEF B) were further sub-classified into B1 (normal cardiac size) and B2 (enlarged heart). Cardiac enlargement was present, when left ventricular internal end-diastolic dimension (LVIDd) and/or LA/Ao were above the respective reference ranges.⁴¹

If a patient was seen more than once, disease stage was reevaluated at every recheck. Disease staging was done before the NP concentrations were analyzed.

Effect of Storage

In order to evaluate the effect of storage on the integrity of samples, a long term storage and a short term storage group for the controls and the CHIEF groups were created from the available samples. NP results of samples that were stored more than 3 years until analysis were added to the long term storage groups (samples from 2005, 2006 and 2007) and results of samples that were stored less than 1 year belonged to the short term storage groups (samples from 2010).

Therapy

Asymptomatic dogs received no therapy. Every patient in CHF received furosemide and pimobendan. In some patients an angiotensin-converting-enzyme inhibitor was added. If furosemide alone was not sufficient to treat signs of CHF, additional diuretics like hydrochlorothiazide or spironolactone were given.

Exclusion criteria

There are conditions, like many systemic diseases and hypertension, which might affect NPs concentrations.⁴²⁻⁴⁴ Therefore, dogs with significant systemic disease (such as renal failure) or any cardiac disease other than MMVD were excluded. Additionally, systolic blood pressure over 160 mm/Hg was an exclusion criterion.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using commercially available software (Statistical Package for the Social Sciences 18.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA; MedCalc for Windows, Version 11.5.0.0, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Data are described as mean [standard deviation]. Normal distribution of the data was evaluated by Kolmogorov-Smirnov analysis. If data were not normally distributed, a natural log transformation was used. To test a possible influence of age, weight, sex and neutering status on the NP concentrations in the healthy control group, a one-way analysis of variance with Bonferroni post-hoc correction was performed. To adjust for repeated measurements a linear mixed model with Bonferroni post-hoc correction was used to compare the NP concentrations between the control and the various MMVD groups. Receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis and interactive dot diagrams were used to determine the diagnostic ability of proANP and NT-proBNP to predict CHF, to discriminate CHIEF B1 dogs from B2 dogs, to distinguish the control group from patients in stage B1 and B2 and to define

optimal discrimination limits. The areas under the curve (AUC) were calculated. Optimal cut-off values were determined using ROC-curve analysis for different clinical questions. The software indicated the maximum of the Youden index: $J = \max[SE_i + SP_i - 1]$, where SE_i and SP_i are the sensitivity and specificity over all possible threshold values. This value corresponds with the point on the ROC curve farthest from the diagonal line. Only independent observations were included for ROC curve analysis and dot diagrams using the first examination of every patient. The long term and short term storage groups were compared using an unpaired T-Test. Significance was defined as $P < .05$

Results

A total of 559 examinations of 352 dogs were performed as part of this study between February 2005 and December 2010.

The control group consisted of 116 healthy dogs of various breeds (mean weight, 22.5 kg [17.6]; mean age, 5.7 years [3.9]). All patients in the control group were only examined once and only one blood sample was used from each patient. The group consisted of 30 cross breed dogs, 6 Labrador Retrievers, 6 Great Danes, 6 Cavalier King Charles spaniels (CKCS), 6 Dachshunds, 6 Australian Shepherds, 5 Boxers, 5 Golden Retrievers, 4 Jack Russel terriers, 4 Beagles, 3 Irish Wolfhounds, 3 Yorkshire terriers, 2 pugs, 2 Newfoundlands, 2 Flatcoated retrievers and each one of 26 other breeds.

Mean NT-proBNP in the control group was 455.3 pmol/l [384.3] and proANP was 945.5 fmol/ml [308.3]. Age and body size had no significant influence on NP levels. However, sex and neutering status had a significant influence on NT-proBNP and proANP concentrations. Intact female dogs had significantly higher NP values compared with intact male dogs ($p = 0.03$ and 0.01 , respectively), whereas NP values of male neutered dogs were not significantly different from female spayed dogs. Also no difference was found between intact and castrated dogs (Table 2).

In the MMVD group a total of 443 NT-proBNP and proANP measurements at different time points of 236 patients (mean weight, 13 kg [9.7], mean age, 10.5 years [2.9]) were obtained.

Breeds of the MMVD group included 75 cross breeds, 45 Dachshunds, 16 CKCS, 12 Poodles, 9 Jack Russell terriers, 6 Pekinese, 5 Yorkshire terriers, 4 Beagles, 3 Berger des Pyrenees, 3 Airedale terriers, 3 Border collies, 3 Chihuahuas, 3

German Spitz, 3 Maltese, 3 Miniature Pinschers, 3 Shi Tzu, each 2 of 8 other breeds and each one of 24 other breeds. The numbers of NP measurements within the different CHIEF classification groups are listed in Table 3.

Concentrations of both NPs increased with increasing disease severity. NT-proBNP values of all disease stages (B1-D) were significantly higher than NT-proBNP of the control group (Figure 1). ProANP concentration was not significantly different between the control group and B1 (Table 2, Figure 2). ProANP of stages B2 - D1 were significantly higher than control and B1 (Figure 2).

For both, NT-proBNP and proANP, the difference between stage B1 and B2 was significant ($p = 0.006$ and < 0.001 , respectively). Both NT-proBNP and proANP discriminated patients with acute heart failure (C2, C3, D) significantly from all asymptomatic stages (B1, B2) ($p < 0.001$).

ROC curve analyses were used to calculate cut-off values for different clinical scenarios:

1.) The best cut-off value to predict, if a dog with dyspnea, but without a murmur (control *versus* C2, C3 and D), has CHF or not, was for NT-proBNP > 1181 pmol/l (sensitivity, 83 %; specificity, 98 %, AUC, 0.95) and for proANP > 1366 fmol/ml (sensitivity, 91 %; specificity, 90 %, AUC, 0.96).

2.) To distinguish MMVD patients with congestive heart failure from MMVD patients without congestive heart failure, ROC curve analysis was used to calculate optimal cut-off values. A NT-proBNP cut-off value of 1207 pmol/l and a proANP cut-off of 1578 fmol/ml provided the best sensitivity (83% and 83%, respectively) and specificity (85% and 86%, respectively) to distinguish between dogs with acute heart failure due to MMVD (C2; C3 and D) and dogs with

MMVD (B1 and B2) but without heart failure (Figure 3). The area under the curve (AUC) was 0.89 and 0.9, respectively. Using the higher NT-proBNP cut-off value of > 1800 pmol/l recommended by the manufacturer increased the specificity to 91 %, but sensitivity was only 70 %.

Although there was a significant difference between B1 and B2, the calculated cut-off value for NT-proBNP (518 pmol/l) and proANP (1065 fmol/ml) could not reliably detect patients with cardiac enlargement, because the sensitivity (83 % and 64 %, respectively) and specificity (50 % and 55 %, respectively) were comparatively low and as there was a large overlap between the two groups. The AUC was 0.7 and 0.7, respectively (Figure 4).

A NT-proBNP cut-off of 545 pmol/l and a proANP cut-off of 1246 fmol/ml were not useful to differentiate dogs in stage B from controls. Again, sensitivity (60 % and 39 %, respectively) and specificity (75% and 87%) of the calculated cut-offs were comparatively low. The long term storage group consisted of 149 samples (controls: n = 31, CHIEF B1: n = 30, CHIEF B2: n = 29, CHIEF C1: n = 18, CHIEF C2: n = 24, CHIEF C3: n= 13, CHIEF D: n = 4). The short term storage group consisted of 99 samples (controls: n = 41, CHIEF B1: n = 16, CHIEF B2: n = 13, CHIEF C1: n = 18, CHIEF C2: n = 6, CHIEF C3: n = 5, CHIEF D: n = 0). No significant difference was found between the NT-proBNP and proANP values of the long term and short term storage groups. CHIEF D groups were not compared.

Discussion

Biomarkers might be beneficial in situations, when conventional imaging techniques reveal no accurate diagnosis or when echocardiography is not available or too expensive. The aim of this study was to evaluate how accurate NP could identify patients with cardiac-related dyspnea and if NPs are a useful diagnostic test to differentiate between various disease stages in a comparatively large study population of dogs with MMVD.

Similar to previous reports, the present study shows significantly higher concentrations of NT-proBNP and proANP in patients with CHF compared to the healthy control group, or asymptomatic dogs with MMVD.^{21,23,33,45}

In this study, a cardiac cause of the dyspnea can be ruled out using a NT-proBNP value of < 1181 pmol/l and a proANP value of < 1366 fmol/l in patients without a cardiac murmur presenting with dyspnea. Both NPs have a very high specificity (97% and 95%, respectively) to answer this question. However, clinically this question is rarely relevant, as small breed dogs without a murmur will not have CHF due to MMVD. It could be only useful to use a biomarker under this clinical circumstance, if the patient is difficult to auscultate.

More relevant is the question, whether a patient with a cardiac murmur and dyspnea has CHF or not.

The results of this study are, that using a NT-proBNP cut-off value of > 1207 pmol/l and a proANP value of > 1578 fmol/ml can differentiate dogs with MMVD and CHF from dogs with MMVD without CHF with a sensitivity of 83% and 83% and a specificity of 85% and 86%, respectively. These cut-offs are higher than the cut-off values discussed above to differentiate dogs without a murmur (and no MMVD), because cardiac enlargement can be present in asymptomatic dogs with MMVD (and this might cause an increase in NP concentration due to

cardiac volume overload (CHIEF stage B2). Although a different assay was used in the present study, our cut-off value is very similar to those of two other reports. Oyama et al reported a cut-off concentration of > 1158 pmol/l to detect heart failure due to any kind of cardiac disease¹⁸ and Fine et al suggested a cut-off of > 1400 pmol/l to differentiate dogs with decompensated MMVD and DCM from dogs with primary respiratory disease.⁴⁶ However, figure 3 shows that there is quite some overlap in NP concentrations between symptomatic and asymptomatic patients using the calculated cut-off value. This overlap was already demonstrated in veterinary and human studies.^{33,47} Using a higher cut-off value of > 1800 for NT-proBNP increased the specificity to 91 %, but sensitivity is only 71 % using this higher cut-off value. Therefore, under clinical circumstances chances are better that the test predicts correctly CHF, if higher NP concentrations are detected.

These results show that, when chest radiographs and echocardiography reveal no definite diagnosis of CHF additional testing of NPs could be a useful diagnostic tool. Furthermore, when a rapid (bed side) diagnostic test would be available, NT-proBNP might be helpful in the emergency assessment of dyspnea as shown in human medicine.⁴⁸ However, NP levels must be interpreted with care, because increased concentrations can occur in dogs with primary respiratory disease and pulmonary hypertension and therefore can lead to misdiagnosis of CHF in these patients.¹⁸

The present study is to the authors' knowledge the first, which used the CHIEF system for disease staging. NT-proBNP-concentrations of dogs in B1 and B2 and proANP concentrations of dogs in B2, were significantly higher compared to the healthy control group. Using a NT-proBNP cut-off value of > 545 pmol/l dogs in CHIEF B1 and B2 can be differentiated from the healthy population with a

sensitivity of 60 % and a specificity of only 75 %. A proANP cut-off value of > 1246 fmol/ml has a sensitivity of only 39 % and a specificity of 87 %.

The results of the present study confirm the findings of another study, which demonstrated a significant difference between dogs in ISACHC Ia and b and the healthy control group.²⁰ Class CHIEF B1 and ISACHC Ia are comparable, because they both refer to asymptomatic patients with no chamber enlargement. In contrast to our findings, there is one study, which showed that CKCS with mild and moderate MMVD had no significantly higher NT-proBNP and NT-proANP concentrations than the healthy control group.²¹ Also no difference between ISACHC stage Ia and a healthy control group was shown by a second study.²² The cause for these different results is not clear. However, in the present study, the study population was comparatively large, which may have increased the probability to detect a significant difference between groups.

Nevertheless, from a diagnostic standpoint it is obvious, that NP measurements are not useful to differentiate between healthy and asymptomatic patients with MMVD due to the low sensitivity and specificity of the calculated cut-offs.

Furthermore, dogs with MMVD can be normally easily identified by a heart murmur. Therefore, auscultation is a very reliable, most cost-efficient and non-invasive diagnostic tool for every veterinarian to diagnose MMVD. Using NPs to detect asymptomatic heart disease seem to be more useful in the occult stage of DCM.⁴⁹ Many of these dogs have no obvious murmurs, and therefore, these patients are difficult to identify and may benefit from NT-proBNP testing.⁴⁹

Furthermore, the hypothesis, that proANP is able detect early stages of MMVD more accurately, could not be confirmed.^{23,28,45}

Another clinical question that might be relevant is the prediction of cardiac enlargement in asymptomatic patients, as those patients might benefit from early

therapy. Both, NT-proBNP and proANP were significantly different between CHIEF B1 and B2. A NT-proBNP cut-off value of 518 pmol/l and a proANP value of 1065 fmol/ml could discriminate dogs in stage B1 from those in dogs B2 with a sensitivity of 83% and 64 %, respectively, but with a specificity of only 50 and 55 %, respectively.

A recent study reports a significant difference in NT-proBNP concentration between patients in ISACHC class Ia and Ib in a cohort of 72 asymptomatic dogs with MMVD.²⁰ Contrary to these results, NT-proBNP could not discriminate between ISACHC stage Ia and Ib in a second report with 44 patients.²² This discrepancy may be attributable to the number of patients examined. A smaller study may have failed to identify statistical significant differences. It is important to notice that stage ISACHC Ib includes the CHIEF stages B2 and C1. Therefore, a direct comparison to the results of the present study is not possible.

Our study shows that, although there was a statistically significant difference between CHIEF B1 and B2, the cut-offs cannot be used as a basis for clinical evaluations. The large overlap between the groups can be appreciated in Figure 4. Radiographs or echocardiography are certainly better diagnostic tests to differentiate between CHIEF stages B1 and B2.

The present study shows the potential of NPs to detect disease progression, as NPs concentrations increased with severity of disease. Serial testing of NP, in consideration of the variability of NPs⁵⁰, might be useful for monitoring disease progress and identifying patients with clinically significant heart disease.

However, this hypothesis has to be confirmed by further studies.

A further interesting and potentially clinically relevant result of our study was the statistically significant difference in NT-proBNP and proANP concentrations between intact male and intact female dogs. Previous studies, which did not

distinguish between intact and castrated dogs, could not demonstrate any difference in BNP and NT-proBNP concentrations.^{32,33} However, the findings of the present study are consistent with the results of several studies in humans, where BNP, ANP and NT-proBNP concentrations were significantly higher in women than in men.^{29,51,52}

The reason for these results is not completely clear. A recent study suggests that androgens may mediate the sex-related differences in BNP and NT-proBNP levels.³⁰

No differences in NP concentrations could be found between different body size and age groups, which is consistent with findings of other studies in dogs.^{32,33,50}

However, in one study, which examined only healthy CKCS, NT-proANP decreased with increasing weight and increased in older patients.³⁴ Furthermore, it was demonstrated recently that a population of overweight dogs had significantly lower NT-proANP concentration than controls with normal BMI.⁵³ Also, a study in Doberman Pinschers showed significantly increased NT-proBNP concentration in dogs > 8 years.⁴⁹ These results are similar to those in human medicine, where NP levels decrease with increasing BMI and rise in older population.^{29,31} These discrepancies might be explained by the fact that the patients in the present study were classified according their absolute weight and age. BMI and different life expectancy among various breeds was not taken into consideration.⁵⁴

Some of the samples were stored for 3 or more years until analysis. This might represent a limitation of the present study as to the authors' knowledge there are no studies regarding long term stability of NP in veterinary medicine. Only one study from human medicine investigated the 2-year stability of NT-proBNP stored at -20 °C and found no substantial loss of immunoreactivity.⁵⁵ Therefore, we compared data of samples from 2005 to 2007 (group 1) with results from 2010

(group 2) and found no statistically significant difference between long term and short term stored samples. These findings support the hypothesis that there was no significant degradation of NP's under storage conditions of -70°C , although future studies should investigate that question further.

Some of the apparently healthy dogs and some of the patients with mild MMVD had NT-proBNP and proANP concentrations in a range that is normally observed in patients with CHF. About half of the patients with increased NT-proBNP concentrations had concurrent high proANP values. All other dogs had either increased NT-proBNP levels or increased proANP alone. Whether these dogs had a subclinical undiagnosed disease or falsely elevated levels due to some kind of assay interference occurred⁵⁶ or if a wide biological range leading to overlap between diseased and non-diseased animals was the reason, is unknown. Except of testing urea and creatinine concentrations, no further screening for additional diseases was undertaken. Although this study examined a large population, the number of patients in class CHIEF D was very low, what reduced the statistical power. Furthermore, to define an optimal cut-off value to discriminate between patients with dyspnea and/or coughing due to CHF and patients with respiratory disease, a group with dyspnea related to primary respiratory disease and concurrent asymptomatic MMVD is needed. There was no such group in the present study, what might limit the use of the cut-off value. Also, mean age and weight of the control group was different from the MMVD population. Although we couldn't show any significant difference between age and weight groups this is a further limitation of the present study.

In summary, this study showed that NT-proBNP and proANP could differentiate dogs with CHF from patients with MMVD, but still without CHF. Cut-off values were 1207 pmol/l for NT-proBNP and 1578 fmol/ml for proANP, respectively.

Although there was statistically significant difference in both NT-proBNP and proANP concentrations between the healthy control group and dogs in CHIEF B and between patients in CHIEF B1 and B2, sensitivity and specificity of the cut-off values were low. This indicates that NT-proBNP and proANP might not be useful to detect asymptomatic dogs with MMVD and to differentiate CHIEF stages B1 and B2 in asymptomatic patients. Furthermore, the present study showed statistically different concentrations of both NPs between healthy intact female and intact male dogs. These data indicate that gender-specific values should be considered to interpret concentrations of NT-proBNP and proANP. Comparing both NPs, NT-proBNP performed slightly better than proANP. Taken together, NP may provide additional information in diagnosing CHF, but cannot replace radiographs or echocardiography.

References

1. Detweiler DK, Patterson DF. The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Ann N Y Acad Sci* 1965;127:481-516.
2. Thrusfield MV, Aitken CGG, Darker PGG. Observations on breed and sex in relation to canine heart valve incompetence. *Journal of Small Animal Practice* 1985;26:709-717.
3. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, et al. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med* 2008;22:120-128. [Research Support, Non-U.S. Gov't]
4. deMoraes HA, Schwartz DS. Pathophysiology of Heart Failure. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2005:914-940.
5. ISACHC. Recommendations for Diagnosis of Heart Disease and Treatment of Heart Failure in Small Animals. In: Fox PR, Sisson D, N.S. M, eds. *Textbook of Canine and Feline Cardiology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999:883-901.
6. Strickland KN. Pathophysiology and therapy of heart failure. In: Tilley LP, Smith FWK, Oyama MA, Sleeper MM, eds. *Manual of Canine and Feline Cardiology*. St. Louis: WB Saunders; 2008:288-314.
7. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 2001;38:2101-2113.
8. Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* 2009;23:1142-1150.
9. Gouni V, Serres FJ, Pouchelon JL, et al. Quantification of mitral valve regurgitation in dogs with degenerative mitral valve disease by use of the proximal isovelocity surface area method. *J Am Vet Med Assoc* 2007;231:399-406.
10. Muzzi RA, de Araujo RB, Muzzi LA, Pena JL, Silva EF. Regurgitant jet area by Doppler color flow mapping: quantitative assessment of mitral regurgitation severity in dogs. *J Vet Cardiol*

2003;5:33-38.

11. Roncon-Albuquerque R, Jr., Vasconcelos M, Lourenco AP, et al. Acute changes of biventricular gene expression in volume and right ventricular pressure overload. *Life Sci* 2006;78:2633-2642.
12. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, et al. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993;87:464-469.
13. Nishida Y, Morita H, Minamino N, et al. Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs. *Jpn J Physiol* 1990;40:531-540.
14. Winters CJ, Sallman AL, Baker BJ, et al. The N-terminus and a 4,000-MW peptide from the midportion of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone each circulate in humans and increase in congestive heart failure. *Circulation* 1989;80:438-449.
15. Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, et al. Three peptides from the atrial natriuretic factor prohormone amino terminus lower blood pressure and produce diuresis, natriuresis, and/or kaliuresis in humans. *Circulation* 1994;90:1129-1140.
16. Weir ML, Honrath U, Flynn TG, Sonnenberg H. Lack of biologic activity or specific binding of amino-terminal pro-ANP segments in the rat. *Regul Pept* 1994;53:111-122.
17. Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, et al. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J Biol Chem* 1997;272:20545-20554.
18. Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA, et al. 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;235:1319-1325.
19. 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;21:238-242.
20. Chetboul V, Serres F, Tissier R, et al. 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;23:984-994. [Research Support, Non-U.S. Gov't]

21. Tarnow I, Olsen LH, Kvarn C, et al. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Vet J* 2009;180:195-201.

22. Takemura N, Toda N, Miyagawa Y, et al. Evaluation of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) concentrations in dogs with mitral valve insufficiency. *J Vet Med Sci* 2009;71:925-929.

23. Haggstrom J, Hansson K, Kvarn C, et al. Relationship between different natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease. *J Vet Cardiol* 2000;2:7-16.

24. Moesgaard SG, Falk T, Teerlink T, et al. Brain-natriuretic peptide and cyclic guanosine monophosphate as biomarkers of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Vet J* 2010.

25. Ackerman BH, Wyeth RP, Vesely DL, et al. Pharmacokinetic characterization of the postdistribution phase of prohormone atrial natriuretic peptides amino acids 1-98, 31-67, and atrial natriuretic factor during and after rapid right ventricular pacing in dogs. *J Clin Pharmacol* 1992;32:415-421.

26. Thomas CJ, Woods RL. Haemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma half-life in conscious dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:369-375.

27. Habibullah AA, Villarreal D, Freeman RH, et al. Atrial natriuretic peptide fragments in dogs with experimental heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:130-135.

28. Daggubati S, Parks JR, Overton RM, et al. Adrenomedullin, endothelin, neuro peptide Y, atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators. *Cardiovasc Res* 1997;36:246-255.

29. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, et al. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:976-982.

30. Chang AY, Abdullah SM, Jain T, et al. Associations among androgens, estrogens, and natriuretic peptides in young women: observations from the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol*

2007;49:109-116.

31. Krauser DG, Lloyd-Jones DM, Chae CU, et al. Effect of body mass index on natriuretic peptide levels in patients with acute congestive heart failure: a ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) substudy. *Am Heart J* 2005;149:744-750.
32. DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA, et al. 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;21:243-250.
33. 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;232:1496-1503.
34. Eriksson AS, Jarvinen AK, Eklund KK, et al. Effect of age and body weight on neurohumoral variables in healthy Cavalier King Charles spaniels. *Am J Vet Res* 2001;62:1818-1824.
35. Leach S, Fine DM, Durham HE. Effect of gender status on NT-prohormone brain natriuretic peptide levels in dogs. [Abstract]. *J of Vet Intern Med* 2008;22:756-757.
36. Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, et al. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract* 2008;49:26-32.
37. Schellenberg S, Grenacher B, Kaufmann K, Reusch CE, Glaus TM. Analytical validation of commercial immunoassays for the measurement of cardiovascular peptides in the dog. *Vet J* 2008;178:85-90.
38. Hansson K, Haggstrom J, Kwart C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound* 2002;43:568-575.
39. Serres F, Chetboul V, Tissier R, et al. Chordae tendineae rupture in dogs with degenerative mitral valve disease: prevalence, survival, and prognostic factors (114 cases, 2001-2006). *J Vet Intern Med* 2007;21:258-264.
40. Johnson L. Diagnosis of pulmonary hypertension. *Clin Tech Small Anim Pract* 1999;14:231-236.

41. Cornell CC, Kittleson MD, Della Torre P, et al. Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med* 2004;18:311-321.
42. Raffan E, Loureiro J, Dukes-McEwan J, et al. The Cardiac Biomarker NT-proBNP Is Increased in Dogs with Azotemia. *J Vet Intern Med* 2009;23:1184-1189.
43. Lee JA, Herndon WE, Rishniw M. The effect of noncardiac disease on plasma brain natriuretic peptide concentration in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011;21:5-12.
44. 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:S9-21.
45. Asano K, Masuda K, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J Vet Med Sci* 1999;61:523-529.
46. 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;232:1674-1679.
47. Januzzi JL, van Kimmenade R, Lainchbury J, et al. 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* 2006;27:330-337.
48. Januzzi JL, Jr., Camargo CA, Anwaruddin S, et al. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. *Am J Cardiol* 2005;95:948-954.
49. 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;72:642-649.
50. 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:S93-97.
51. Sutton TM, Stewart RA, Gerber IL, et al. Plasma natriuretic peptide levels increase with symptoms and severity of mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2280-2287.
52. Fragopoulou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. N-terminal ProBNP distribution and correlations with biological characteristics in apparently healthy Greek population: ATTICA study. *Angiology* 2010;61:397-404.

-
53. Schwartz DS, Melo PRR, Mazini AM, et al. NT-proBNP in obese dogs [Abstract]
J of Vet Intern Med 2011;25:655-656.
54. Egenvall A, Bonnett BN, Olson P, Hedhammar A. Gender, age, breed and distribution of morbidity and mortality in insured dogs in Sweden during 1995 and 1996. Vet Rec 2000;146:519-525.
55. Cauliez B, Guignery J, Marinier S, Mariau I, Lavoigne A. Two-year stability of NT-proBNP in frozen samples using the Roche Elecsys system. Ann Clin Biochem 2008;45:318-319.
56. Solter PF, Oyama MA, Sisson DD. Canine heterophilic antibodies as a source of false-positive B-type natriuretic peptide sandwich ELISA results. Vet Clin Pathol 2008;37:86-95.

Table 1. CHIEF classification

	Defintion
Stage A	Dogs at risk for developing heart disease that have no identifiable cardiac structural disorder
Stage B	Dogs with structural heart disease, but that have never developed clinical signs caused by heart failure
Stage C1	Dogs that had signs of heart failure in the past, but have no current symptoms
Stage C2	Dogs with mild to moderate heart failure
Stage C3	Dogs with severe to life-threatening heart failure
Stage D	Dogs with end-stage MMVD and heart failure that is refractory to standard therapy

CHIEF, Canine Heart failure International Expert Forum; MMVD, Myxomatous mitral valve disease

Table 2. Effect of sex and spaying on NT-proBNP and proANP concentrations in gender groups.

Gender	n	NT-proBNP Mean	SD	Percentile 05	Percentile 95	Min	Max
female	31	596	83	427	766	76	1978
female spayed	32	444	81	280	609	33	2630
male	35	315	34	246	385	43	1035
male neutered	18	528	74	371	685	15	1181

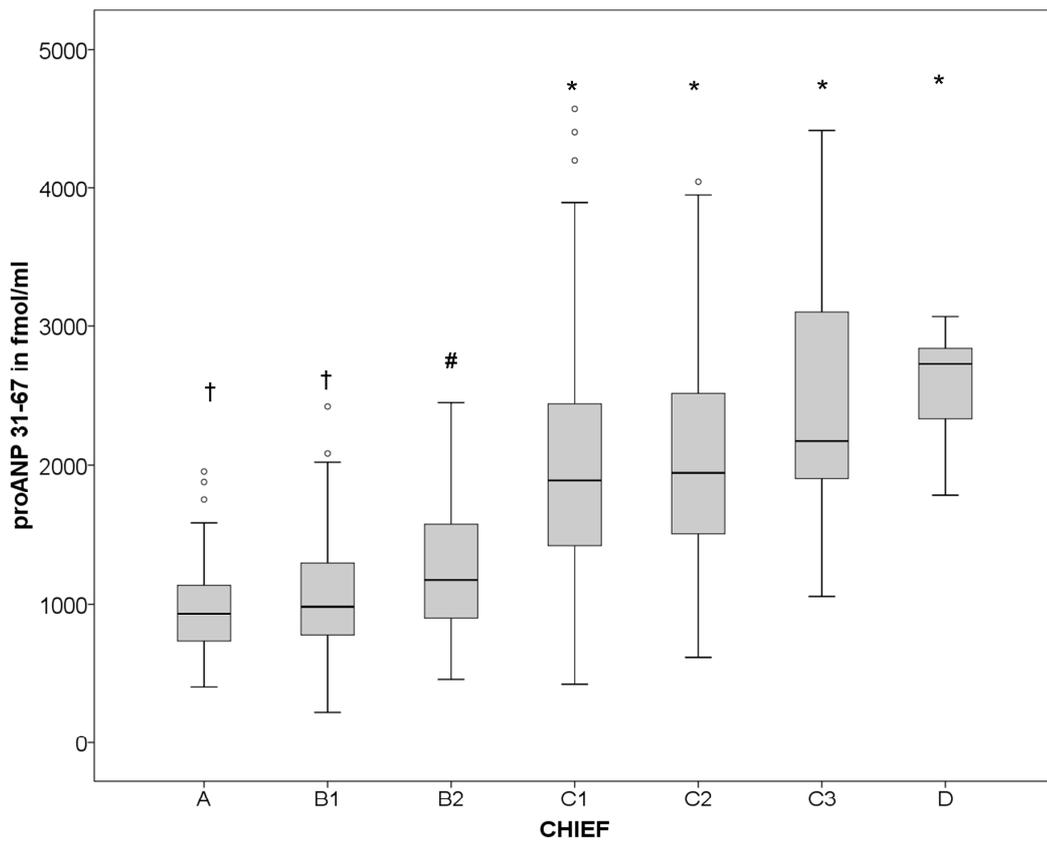
Gender	N	proANP Mean	SD	Percentile 05	Percentile 95	Min	Max
female	31	1036	61	465	1955	934	1184
female spayed	32	971	54	861	1081	549	1881
male	35	836	50	734	938	389	1583
male neutered	18	923	49	820	1026	585	1205

NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; proANP, pro atrial natriuretic peptide 31 - 67; SD, standard deviation; Min, Minimum; Max, Maximum

Table 3. Effect of MMV disease stage on Nt-proBNP and proANP concentrations in different disease stages.

	CHIEF	n	Mean	SD	Percentile 05	Percentile 95	Min	Max
NT-proBNP in pmol/l	‡ Contro l	11 6	458	36	387	529	15	2630
	‡ B1	11 9	711	59	594	827	47	3513
	‡ B2	95	987	102	785	1190	258	6322
	+ C1	11 4	2177	168	1844	2510	189	8562
	+ C2	75	2766	245	2278	3254	236	1005 6
	¥ C3	33	4630	507	3596	5663	105 2	1322 6
	* D	7	4920	946	2604	7236	160 5	8092
proANP in fmol/ml	† Contro l	11 6	945	29	889	1002	398	1955
	† B1	11 9	1048	38	973	1124	218	2422
	# B2	95	1254	48	1159	1349	451	2450
	* C1	11 4	2006	76	1855	2157	416	4571
	* C2	75	2081	89	1904	2258	615	4050
	* C3	33	2396	133	2126	2666	105 5	4410
	* D	7	2562	172	2142	2982	178 1	3067

NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; proANP, pro atrial natriuretic peptide 31 - 67; SD, standard deviation; Min, Minimum; Max, Maximum; CHF, congestive heart failure; MMVD, myxomatous mitral valve disease; ‡ statistically significant different to all other stages, + statistically significant different to controls, B1, B2, C3, ¥ statistically significant different to controls, B1, B2, C1-2; † statistically significant different to B2, C1-3, D, # statistically significant different to controls, B1, C1-3, D, *statistically significant different to controls, B1, B2

Figure 2.

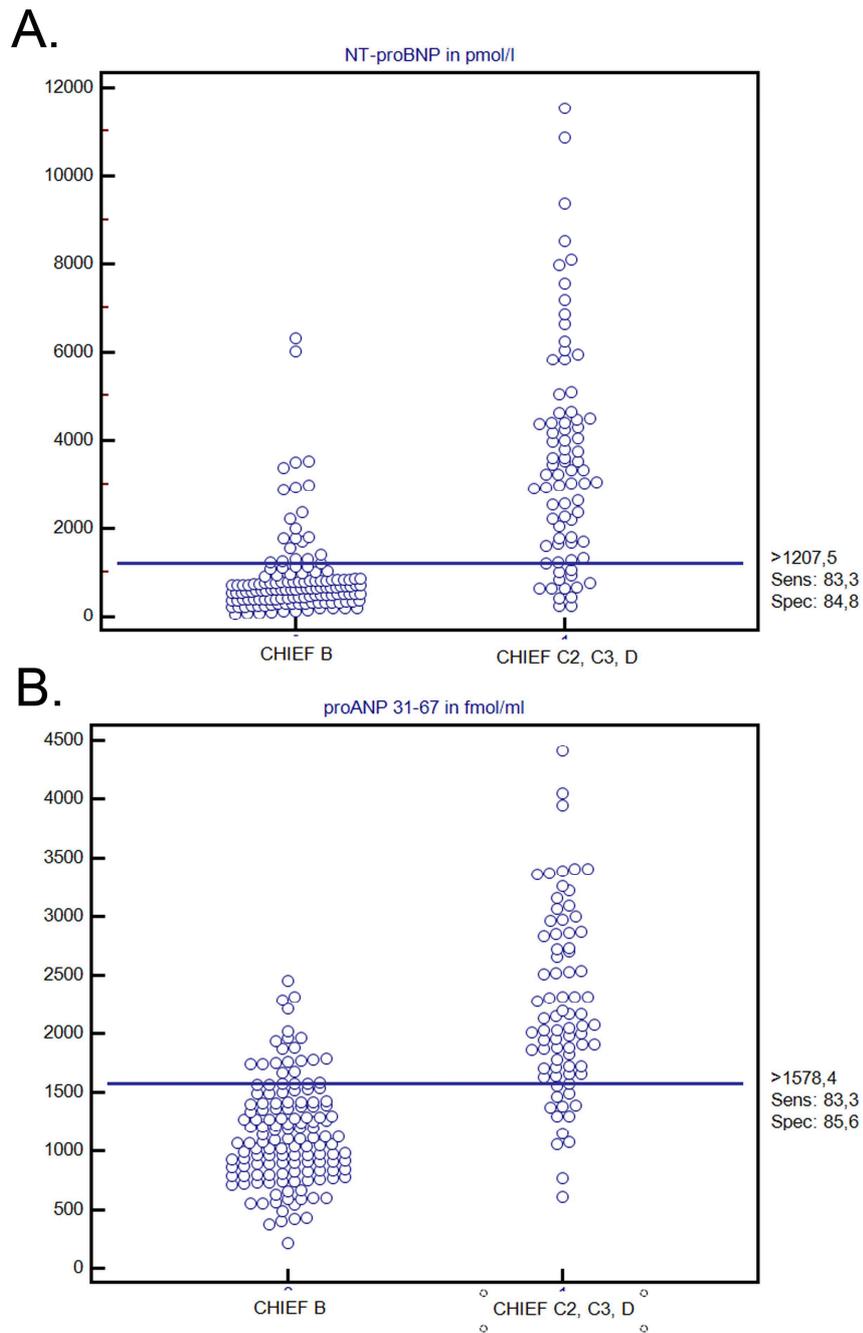
Box plots illustrating the concentration of proANP according to CHIEF classification. The whiskers indicate the range of values, the box represents the inter quartile range (IQR) and the line within the box indicates the median. Outliers are indicated by individual points. Controls: n = 116; B1: n = 119; B2: n = 95; C1: = 75; C3: n = 33; D: n = 7

† statistically significant different to B2, C1-3, D

statistically significant different to controls, B1, C1-3, D

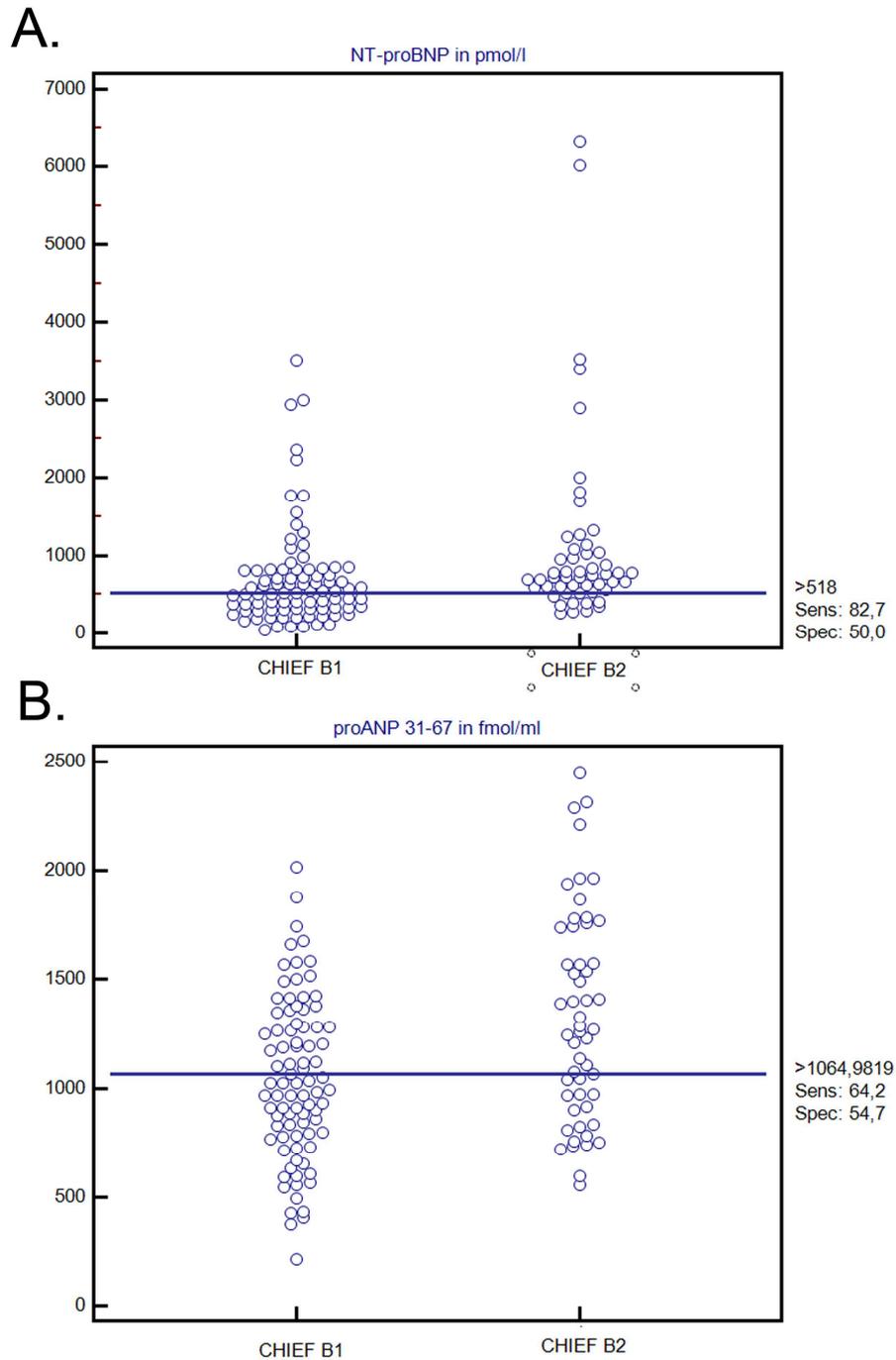
*statistically significant different to controls, B1, B2

Figure 3.



Interactive dot diagrams displaying sensitivity and specificity of using NT-proBNP (3A) and proANP (3B) concentration to distinguish asymptomatic dogs (CHIEF B, n = 138) from dogs in acute congestive heart failure (CHIEF C2, C3, D, n = 78). The diagnostic cut-off values of 1207 pmol/l (3A) and 1578 fmol/ml (3B) is shown as a horizontal line; dots above the line in the CHIEF B group indicate false-positive test results, and dots below the line in the heart failure group represent false-negative test results

Figure 4.



Interactive dot diagrams displaying sensitivity and specificity of using NT-proBNP (4A) and proANP (4B) concentration to distinguish dogs in heart failure class B1 ($n = 86$) from dogs in heart failure class B2 ($n = 52$). The diagnostic cut-off values of 518 pmol/l (4A) and 1065 fmol/ml (4B) is shown as a horizontal line. Dots above the line in the CHIEF B1 group indicate false-positive test results, and dots below the line in the CHIEF B2 group represent false-negative test results.

List of abbreviations

NPs	natriuretic peptides
MMVD	myxomatous mitral valve disease
NT-proBNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
proANP	pro-atrial natriuretic peptide 31 - 67
CHIEF	Canine Heart failure International Expert Forum (CHIEF)
CHF	Congestive heart failure
NYHA	New York Heart Association
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
2-D	2 Dimensional
BNP	B-type natriuretic peptide
ANP	atrial natriuretic peptide
NT-proANP	Amino-terminal pro-atrial natriuretic peptide
BMI	body mass index
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
LA/Ao	left atrium/aorta ratio
M-Mode	motion mode
ARJ	area of regurgitant jet
LAA	left atrium area
LVIDd	left ventricular internal end-diastolic dimension
ROC	receiver operating characteristic
AUC	Area under the curve
CKCS	Cavalier King Charles spaniel

IV. 2. PUBLIKATION

Journal of Veterinary Cardiology (2012) 14, 399–408



www.elsevier.com/locate/jvc

Lowered N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in response to treatment predict survival in dogs with symptomatic mitral valve disease

Johanna Wolf, MRCVS^a, Nicola Gerlach, DVM^a, Karin Weber, DVM^a, André Klima, Dip Stat^b, Gerhard Wess, DVM, Dr. habil^{a,*}

^a *Clinic of Small Animal Medicine, LMU University, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany*

^b *Statistical Consulting Unit, LMU University, Munich, Germany*

Received 2 September 2011; received in revised form 29 April 2012; accepted 2 May 2012

KEYWORDS

Chronic valvular disease;
Natriuretic peptides;
Prognosis;
Congestive heart failure

Abstract Objectives: In humans with congestive heart failure (CHF), better outcome is correlated with lower natriuretic peptide (NP) levels after starting treatment and greater percentage reduction of NP levels. Therefore, the aim of this study was to determine the relationship between absolute and relative changes in N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and pro-atrial natriuretic peptide 31–67 (proANP 31–67) and overall cardiac survival in patients with symptomatic myxomatous mitral valve disease (MMVD). Furthermore, we sought to compare clinical and echocardiographic status of 12-month survivors and non-survivors.

Animals, materials and methods: 26 dogs with CHF due to MMVD. Initial NP levels, as well as absolute and percentage changes of follow-up NP levels (between 7 and 30 days after treatment start) and heart failure (HF) class were tested as potential predictors of overall cardiac survivorship. Additionally, various echocardiographic parameters, creatinine concentrations and furosemide doses were compared between 12-month survivors and non-survivors.

Results: Dogs with follow-up NT-proBNP level <965 pmol/l had a significantly longer overall cardiac survival than patients with NT-proBNP level >965 pmol/l ($P = 0.03$). Dogs in a higher HF class had a significantly ($P = 0.03$) higher probability of shorter survival independent of their NP levels. When dogs were grouped by 12-month survival, only follow-up NT-proBNP levels were significantly different between groups.

* Corresponding author.

E-mail address: gwess@lmu.de (G. Wess).

Conclusions: HF class at presentation and NT-proBNP levels after initiating treatment are predictive of mortality in patients with symptomatic MMVD. ProANP 31–67 levels, percentage reduction in NPs levels, creatinine or urea concentration, echocardiographic parameters and furosemide dose did not predict outcome.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations

ANP	atrial natriuretic peptide
BNP	B-type natriuretic peptide
CHF	congestive heart failure
CHIEF	Canine Heart failure International Expert Forum
CKCS	Cavalier King Charles spaniel
HF	heart failure
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
LA/Ao	left atrium/aorta ratio
LVIDd	left ventricular internal end-diastolic dimension
MMVD	myxomatous mitral valve disease
NP	natriuretic peptides
NT	
-proANP	amino-terminal pro-atrial natriuretic peptide
NT	
-proBNP	N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
proANP	
31–67	pro-atrial natriuretic peptide 31–67
ROC	receiver-operating curve

Introduction

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) is the most common heart disease in dogs.¹ Evidence of the disease is detected in approximately 30% of dogs aged 13 years or older.² The disease is characterized by a chronic progression, with the condition worsening from mild to severe over years.^{3,4} Risk factors for a rapid progression include age, degree of mitral regurgitation and severity of valvular changes.^{4–7}

Prognostic indicators after the onset of congestive heart failure (CHF) are the required dose of furosemide, exercise intolerance, left atrium/aorta ratio (LA/Ao), serum creatinine concentration and systolic function.^{4,8} There is also evidence that the Cavalier King Charles spaniel (CKCS) breed is associated with a better prognosis compared to a group consisting of other

breeds.⁸ It has also been suggested that patients developing complications like atrial fibrillation, rupture of major chordae tendineae and pulmonary hypertension have a worse clinical outcome.⁹

Cardiac production and release of B-type natriuretic peptide (BNP) and atrial natriuretic peptide (ANP) are primarily mediated through stretch of the myocardial tissue and cause vasodilation, natriuresis and diuresis.^{10,11} Both peptides are released in the form of pro-hormones, which are cleaved to B-type natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide and their N-terminal ends, NT-proBNP and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide (NT-proANP).^{12,13} NT-proANP is further cleaved into three products (proANP 1–30, 31–67, 68–98), which all have similar effects as ANP.¹³

Several studies in veterinary medicine have shown that natriuretic peptides (NPs) increase with severity of heart disease and that NPs can be used to discriminate dogs with dyspnea due to CHF from dogs with respiratory symptoms without heart disease.^{14–16} There is also evidence that NPs may be useful as a prognostic biomarker. McDonald et al. reported that in a cohort of 25 dogs with MMVD for every 10 pg/ml increase in BNP mortality over 4 months' time increased by 44 percent.¹⁷ Serres et al. demonstrated that NT-proBNP could be used in combination with the clinical status to predict outcome in a population of dogs with symptomatic MMVD.¹⁸ Another study, which involved 23 dogs with MMVD and dilative cardiomyopathy of different stages suggested a significantly greater survival time in dogs with lower ANP concentration.¹⁹ NT-proBNP and left ventricular end-diastolic diameter, but not proANP 31–67 predicted all cause mortality in a cohort of dogs with symptomatic and asymptomatic MMVD.²⁰ However, these studies did not investigate, if serial NP measurements may add further information. In human medicine several studies reported that patients with greater percentage reduction in BNP and NT-proBNP or lower follow-up levels after treatment of CHF had longer overall event-free survival.^{21–25} The percentage reduction in NP levels and absolute levels after treatment for CHF seemed to be better predictors of outcomes than the levels at admission.^{23,25}

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the ability of NP concentrations to

predict survival in dogs with MMVD in CHF. First, by evaluating NT-proBNP and proANP 31–67 concentrations at the beginning of CHF, and second, to use absolute and relative changes of NP levels at follow-up examinations between 7 and 30 days, to predict overall cardiac survival in dogs with MMVD. In addition, we sought to compare clinical status, echocardiographic parameters and creatinine and urea values between 12-month survivors and non-survivors.

Animals, materials and methods

Animals

This prospective study included client-owned dogs with MMVD, which presented for respiratory symptoms (frequent coughing, or dyspnea) due to CHF at the Cardiology Service of the Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany between January 2007 and June 2010. Only dogs that were in CHF for the first time at presentation and did not previously receive CHF treatment were included in the study. Written owner consent to participate in the study was obtained prior to enrollment. Full history was ascertained by interview with the owner. Each examination included a thorough clinical examination, thoracic radiographs and echocardiography. Chest radiographs were taken from each patient and cardiomegaly with enlarged left atrium, interstitial to alveolar pattern and dilated pulmonary veins consistent with cardiac pulmonary edema had to be present. Heart failure class was determined according to the Canine Heart failure International Expert Forum (CHIEF) system.²⁶ This classification system includes stages ranging from A to D. Class A refers to patients at risk for heart disease and class B to patients with structural heart disease, but no signs of CHF. Class C includes animals with past or current signs of CHF. Patients in C1 have no current signs of CHF, patients in C2 have mild to moderate HF and patients in C3 have severe to life-threatening HF. Class D denotes patients with refractory heart failure. If severe symptoms were present, patients were stabilized in an oxygen cage with furosemide given intravenously as bolus or as continuous rate infusion before a complete echocardiographic examination was performed. All patients then received standardized therapy consisting of furosemide and pimobendan. Additional diuretics were given as needed. Blood for NT-proBNP, proANP 31–67, urea and creatinine testing was drawn within 24 h of admission.

Echocardiography and standard Doppler examination

All dogs were examined without sedation in right and left lateral recumbency. Measurements of the left atrium and aorta were obtained by the 2D method using the right parasternal short axis view at the level of the heart base, followed by calculation of the LA/Ao ratio.²⁷ To evaluate ventricular dimensions, motion-mode (M-mode) measurements using the right parasternal long axis view were used.²⁸ A mean of three consecutive measurements was used for each variable. Left ventricular internal end-diastolic dimension (LVIDd) was indexed to body weight^{1/3}.²⁹ To exclude any congenital abnormalities complete examination of all valves with color, continuous and pulsed wave Doppler was performed. Diagnosis of MMVD was performed as previously described.¹⁸

Exclusion criteria

Dogs with evidence of significant systemic disease or concomitant congenital heart disease were not included. Patients, which died before their follow-up examination were excluded from the study.

Follow-up

Follow-up examinations were performed within 7–30 days after initial presentation. Physical examination and complete echocardiography was performed and blood was drawn for reevaluation of NT-proBNP, proANP 31–67, urea and creatinine values at the first follow-up examination. Additional follow-up examinations were performed every 3 months including echocardiographic examination, but these examinations were only used for this study to determine the outcome of the patient. End point was cardiac death of the patient. If the patients were still alive at the time of data analysis or if they hadn't been rechecked within 3 months, outcome was determined in every case by calling the patient's owner. Dogs lost at follow up or that died of non-cardiac diseases were censored for the statistical analysis.

Blood collection and assays

Blood samples were taken from the cephalic or saphenous vein or were collected via jugular puncture into chilled tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and serum tubes. EDTA-samples for NT-proBNP and ProANP 31–67 analysis were centrifuged at $3600 \times g$ at 4 °C for 10 min, and the plasma was separated and frozen

at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis in our laboratory. Serum was used for creatinine and urea measurements. Plasma NT-proBNP and proANP 31–67 were analyzed using commercially available assays according to the manufacturers' instructions.^{cd} All samples were measured as duplicates and the mean of these two samples were used for data analysis. Both tests have been previously used and validated for diagnostic purposes in dogs.^{14,30} If NT-proBNP concentrations were over the upper detection limit of the assay (3306 pmol/l), samples were diluted at the ratio of 1:10 with sterile 0.9% sodium chloride solution and analyzed again.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by commercially available computer software.^{ef} Data are reported as median [interquartile range]. Normality was tested by the Kolmogorov–Smirnov test. As the data were not normally distributed, the nonparametric Mann–Whitney–*U* test was used to compare groups based on 12-month survival pairwise. Furthermore, NP concentrations between dogs in CHIEF class C2 and C3 were compared. In the first step, receiver-operating curves (ROC) were computed on all 26 dogs to assess the optimal cut-off values for NP-concentrations to distinguish patients according to their 12-month survival. Emphasis was given to select cut off values that provided a good sensitivity and an acceptable specificity at the same time. In the next step all patients were grouped according to the aforementioned cut-off values (and independent of their 12-month survival), i.e. if they were above or below the calculated cut-off values, in order to draw survival curves using the Kaplan–Meier method. Overall survival times were compared for these groups separated by cut-offs generated for NP and HF class by the Log rank test. Starting date was the day of the patient's first presentation for CHF, end point was cardiac death. Censored observations occur in the survival curves in patients for whom the critical event (death due to CHF) has not yet occurred. A level of significance (α) of 5% was defined.

^c VETSIGN Canine CardioSCREEN Nt-proBNP, Biomedica, Vienna, Austria.

^d VETSIGN Canine CardioSCREEN proANP 31–67, Biomedica, Vienna, Austria.

^e Statistical Package for the Social Sciences 18.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA.

^f MedCalc for Windows, Version 11.5.0.0, MedCalc Software, Mariakerke, Belgium.

Results

A total of 62 dogs fulfilled the inclusion criteria of the study. 36 patients had to be excluded from statistical analysis: 23 patients were excluded because of client in compliance, 12 patients died before their second examination and 1 patient was euthanized for non-cardiac reasons. The final study population consisted of 26 older (10.5 [2] years), predominantly male ($n = 17/26$, 65%) and small-breed dogs (8 cross breed, 5 Dachshunds, 3 Poodles, 2 Jack Russell terriers, 1 Bavarian Mountain Scent Hound, 1 Beagle, 1 Berger des Pyrenees, 1CKCS, 1 Lhasa Apso, 1 Miniature Pinscher, 1 Parson Jack Russell terrier and 1 Pekinese). At initial presentation (day 1), 14/26 dogs belonged to CHIEF class C2, 12/26 to CHIEF class C3. All patients were treated with furosemide and pimobendan. Two dogs in class C3 received additional diuretics (hydrochlorothiazide or spironolactone). Four dogs were still alive at the end of the study. For six patients no follow-up echocardiography was available and for one dog no initial creatinine and urea concentration and no follow-up proANP 31–67 and urea value was available.

Patients were divided into 2 groups according to their 12-month-survival with the intention to calculate cut-off values for the NPs and to compare data from 12-month survivors and non-survivors (Table 1). 15 dogs didn't survive 12 month and 11 dogs did. The only significant difference between both groups was found to be NT-proBNP concentration on follow-up examination (day 7–30). Echocardiographic parameters, NT-proBNP values on day 1, creatinine, urea and proANP 31–67 concentration on both examination points, percentage changes of NP and furosemide dose were not significantly different between both groups. 27% (3/11) of patients in the survivor group and 60% (9/15) of the non-survivors were in HF class C3. ROC-curve analyses of NP concentrations were generated that would calculate optimal cut-off values to differentiate 12-month survivors from non-survivors (Table 2). The selected cut-off values, Kaplan–Meier curves for overall cardiac survival were studied for patients below or above the calculated cut-off values (and independent of their 12-month survival). Dogs with a NT-proBNP concentration <3047 pmol/l on day 1 did not survive significantly ($P = 0.2$) longer than dogs with a concentration >3047 pmol/l (Fig. 1A). Dogs with follow-up NT-proBNP level <965 pmol/l survived significantly longer than patients with NT-proBNP level >965 pmol/l ($P = 0.03$) (Fig. 1B). No difference regarding survival was found for proANP 31–37 concentrations on both examinations ($P = 0.1$ for day 1 and $P = 0.08$ for the follow-up

Table 1 Various parameters from 12-month survivors and non-survivors.

	Survivors (<i>n</i> = 11)			Non survivors (<i>n</i> = 15)			<i>P</i> -value
	<i>N</i>	Median	IQR	<i>N</i>	Median	IQR	
Age in years	11	10.0	2.0	15	11.0	2.0	0.2
Weight in kg	11	9.5	5.6	15	10.0	11.6	0.3
Furosemide in mg/kg/day day 1	11	12.0	4.0	15	12.0	3.0	0.6
Furosemide in mg/kg/day follow-up	11	6.0	4.0	15	6.0	3.0	0.5
NT-proBNP in pmol/l day 1	11	2940.8	2838.0	15	3057.6	2552.3	0.4
NT-proBNP in pmol/l follow-up	11	928.6	2230.5	15	2589.0	2476.0	0.04
proANP 31–67 in fmol/ml day 1	11	1872.0	489.7	15	2070.8	696.7	0.3
proANP 31–67 in fmol/ml follow-up	11	1761.0	788.6	14	1890.1	1102.4	0.3
Creatinine in g/dl day 1	10	60.0	44.1	15	71.0	40.7	0.6
Creatinine in g/dl follow-up	11	96.0	43.0	14	84.0	24.0	0.5
Urea in mmol/l day 1	10	7.8	9.2	15	8.4	5.8	0.4
Urea in mmol/l follow-up	11	13.2	5.6	14	9.9	9.9	0.4
LA/Ao day 1	11	2.2	1.0	15	2.3	0.6	1.0
LA/Ao follow-up	9	2.0	0.5	11	2.1	0.4	0.1
LVIDd/BW ^{1/3} day 1	11	1.8	0.5	15	1.8	0.2	0.8
LVIDd/BW ^{1/3} follow-up	9	1.7	0.5	11	1.9	0.4	0.06
Change of NT-proBNP in %	11	−62.6	92.6	15	−21.1	103.1	0.2
Change of proANP 31–67 in %	11	−0.5	32.3	14	−4.9	47.6	0.9
Change of LA/Ao in %	9	−1.4	33.9	11	−12.4	25.4	0.7
	<i>N</i>	<i>N</i> C2	<i>N</i> C3	<i>N</i>	<i>N</i> C2	<i>N</i> C3	
Number of patients in CHIEF class C2 and C3	11	8	3	15	6	9	

n, number of dogs; IQR, interquartile range; NT-proBNP, Amino-terminal pro brain natriuretic peptide; proANP 31–67, pro atrial natriuretic peptide; LA/Ao, left atrium to aorta ratio; LVIDd, left ventricular internal end-diastolic dimension; BW, body weight; CHIEF, Canine Heart failure International Expert Forum.

examination, respectively) (Fig. 2). Patients with greater than 60% NT-proBNP reduction with treatment had no higher probability to survive than those with <60% reduction in NT-proBNP ($P = 0.8$). Also, no difference was found in survival probability using the percent change of proANP 31–67 between initial and follow-up examination ($P = 0.8$) (Fig. 3). Kaplan–Meier survival curves to predict overall survival for dogs in CHIEF C2 and C3 are shown in Fig. 4. Dogs in CHIEF C2 had a significantly ($P = 0.03$) longer survival than dogs in class C3. Comparing NP concentrations between dogs in CHIEF class C2 and C3 at first presentation revealed no statistically significant difference for both NP ($P = 0.2$).

Discussion

The present study shows, that the measurement of NT-proBNP concentration 7–30 days after initiating therapy of CHF and clinical status at the first presentation for CHF were the best predictors of overall cardiac survival in dogs with MMVD. Several studies in veterinary medicine have demonstrated that higher circulating levels of NPs are important predictors of a negative outcome in patients presenting with CHF. Greco et al. suggested in a pilot

study that increased ANP concentration is a predictor of shorter survival in dogs with CHF.¹⁹ MacDonald et al. concluded that mortality in dogs with symptomatic MMVD could be predicted from increased BNP levels.¹⁷ Serres et al. showed, using a multivariate analysis that NT-proBNP was an independent predictor of death within 6 months in patients with symptomatic MMVD.¹⁸ Moonarmart et al. reported that NT-proBNP was a marker of increased all cause mortality in patients with asymptomatic and symptomatic MMVD.²⁰ However, the present study is, to the authors' knowledge, the first study in veterinary medicine, which specifically investigated and compared the prognostic ability of NT-proBNP and proANP 31–67 at two different examination dates. At the day of presentation all patients had to be in CHF for the first time. Therapy was standardized to one treatment option (pimobendan and furosemide) in order to exclude the possible effect of different medication on survival time.

The present, prospective study documents that clinical status at the date of first presentation and NT-proBNP levels after treatment for CHF provided the best prognostic information in dogs with CHF due to MMVD. Dogs in CHIEF C2 (mild to moderate heart failure) at the first examination day lived significantly longer than dogs in CHIEF C3 (severe

Table 2 NT-proBNP and proANP 31–67 cut-off values to differentiate 12-month survivors from non-survivors.

	Cut-off value	Sensitivity (%)	Specificity (%)
NT-proBNP day 1 (mmol/l)	3047	53	64
NT-proBNP follow-up (mmol/l)	965	87	64
proANP 31–67 day 1 (fmol/ml)	1956	68	64
proANP 31–67 follow-up (fmol/ml)	1867	57	73
Change NT-proBNP (%)	–60	80	55
Change proANP 31–67 (%)	3	71	45

NT-proBNP, Amino-terminal pro brain natriuretic peptide; proANP 31–67, pro atrial natriuretic peptide.

to life-threatening heart failure) independent of their NT-proBNP levels. These findings are similar to those of Serres et al., who reported a significantly longer survival for patients with MMVD in International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC) class II compared to ISACHC class III.¹⁸ However, it is interesting to note that in two other studies heart failure class was not a predictor of outcome in multivariable analysis.^{4,8} The present study shows, that a NT-proBNP concentration <965 pmol/l, 7–30 days after starting CHF therapy was associated with a significantly better outcome. In contrast, NT-proBNP levels on examination day 1 provided no statistically significant information regarding overall cardiac survival. However, these results have to be interpreted with care, because the statistical power of the present report was low due to the low numbers of enrolled patients.

The findings of the present study are consistent with several reports in humans, which compared association between BNP and NT-proBNP levels in patients hospitalized for CHF at admission and discharge with overall event-free survival. They demonstrated that BNP and NT-proBNP levels after treatment correlated better with clinical outcome than levels at admission independent of other variables.^{21–24} Furthermore, these studies showed that also a greater percent reduction in BNP or NT-proBNP levels was associated with better event-free survival, but it was not possible to confirm these results in the present investigation. For both NT-proBNP and proANP 31–67 no difference in survival could be shown. This discrepancy may be attributable to the low number of patients examined in the present report.

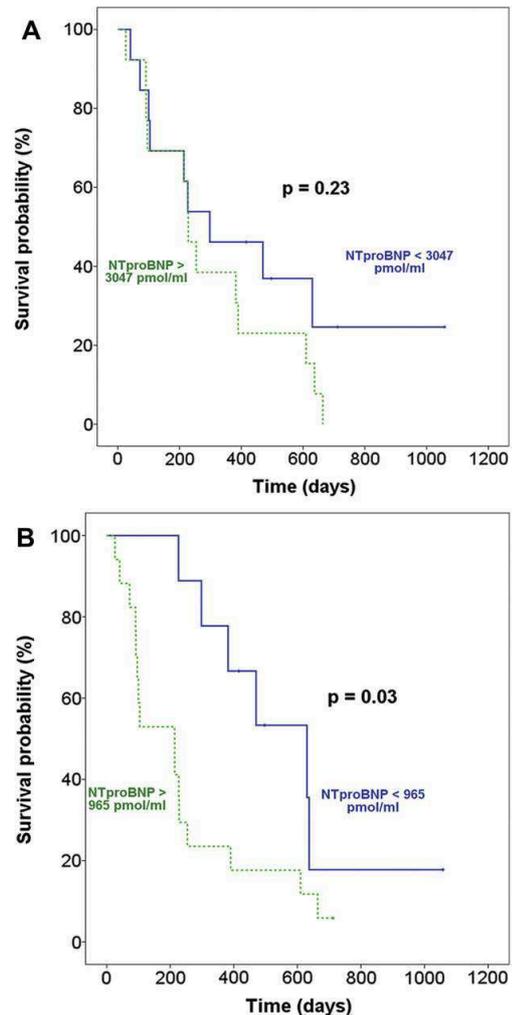


Figure 1 Kaplan–Meier survival curves according to NT-proBNP levels at first presentation (day 1) and follow-up. A: survival curves according to day 1 NT-proBNP value <3047 pmol/l (solid line) and >3047 pmol/l (dashed line), *P*-value: 0.23. B: survival curves according to follow-up NT-proBNP value <965 pmol/l (solid line) and >965 pmol/l (dashed line), *P*-value: 0.03.

Normally, the decision of changing therapy in patients with CHF is mainly based on subjective evaluation of symptoms and of radiographic and blood work results. Our results suggest that NT-proBNP levels might be used successfully to guide treatment of patients with CHF by defining a certain threshold to which levels should decrease during therapy. There are several reports in humans, which indicate that NP-guided treatment for heart failure

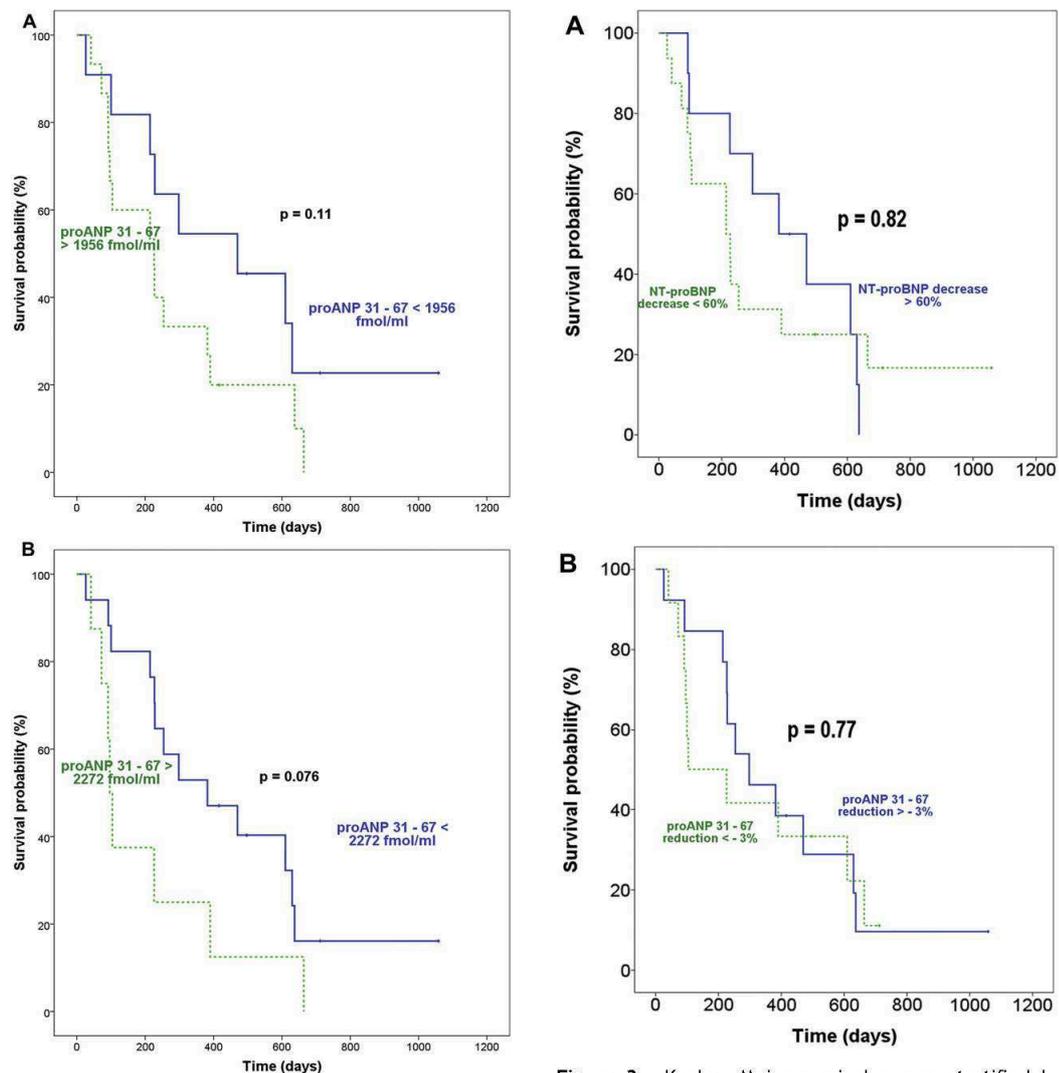


Figure 2 Kaplan–Meier survival curves according to proANP 31–67 levels at first presentation (day 1) and follow-up. A: survival curves according to day 1 proANP 31–67 value <1956 pmol/l (solid line) and >1956 pmol/l (dashed line), P -value: 0.11. B: survival curves according to follow-up proANP 31–67 value <2272 pmol/l (solid line) and >2272 pmol/l (dashed line), P -value: 0.076.

might be superior to clinically guided treatment.^{31,32} On the other hand, there is evidence that in humans higher initial BNP levels do not decrease to lower levels as often as lower initial BNP levels do.²¹ This finding would limit the use of an absolute BNP level as a target. In veterinary medicine, there is one pilot study, which suggested correlation

Figure 3 Kaplan–Meier survival curves stratified by NT-proBNP and proANP 31–67 percent reduction. A: survival curves according to NT-proBNP reduction >60% (solid line) and <60% (dashed line), P -value: 0.82. B: survival curves according to proANP 31–67 change >–3% (solid line) and <–3% (dashed line), P -value: 0.77.

between changes in NT-proBNP levels and clinical decisions in dogs with symptomatic MMVD.⁸ However, future studies are required to investigate whether NP levels are useful to evaluate success of therapy in veterinary medicine.

⁸ Achen SE, Gordon SG, Roland RM. Serial evaluation of NT-proBNP in dogs with CHF predicts clinical score and the presence or absence of radiographic pulmonary edema [abstract]. *J Vet Intern Med* 2009;23:687.

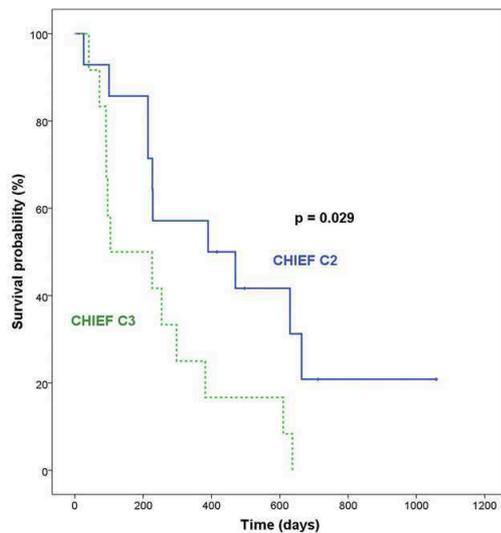


Figure 4 Kaplan–Meier survival curves according to CHIEF class 2 (solid line) and class 3 (dashed line); P-value: 0.029.

The prognostic performance of proANP 31–67 observed in the present study seemed to be inferior to NT-proBNP. This result is consistent with reports from veterinary and human medicine, which demonstrated that BNP and NT-proBNP, but not ANP, NT-proANP and proANP 31–67 were independent risk factors for mortality in heart failure.^{20,33,34} The reasons for these findings are not clear.

Interestingly, no difference in age, creatinine and urea concentration, furosemide dose or echocardiographic parameters on both examination days was found between 12-month survivors and non-survivors. In contrast, Haggstrom et al. reported an association between survival and furosemide dosage, creatinine and LA/Ao.⁸ Also Serres et al. found significant differences in several echocardiographic and Doppler parameters when comparing 6 month survivors and non survivors.¹⁸ Again, the reason for the differences of the present study to those studies might be explained by the small study population of the present report. Furthermore, only patients, which survived until their recheck examination were included in this study. Data of patients, which died immediately after their initial examination, may have altered the results. However, these findings are consistent with reports in humans, which showed that BNP and NT-proBNP levels are more relevant for survival than echocardiographic or clinical parameters.^{23,35}

The present study has several limitations. Firstly, due to the strict inclusion criteria the study

population was small, which reduces statistical power. Also, the date of follow-up examination was not standardized. The recheck appointment had to be scheduled within 30 days after start of treatment, but we cannot exclude the possibility that NT-proBNP and proANP 31–67 may have provided different information on different examination dates. Furthermore, the time of taking the first blood sample could not be standardized, because some patients were too dyspneic to draw blood immediately at time of admission. As a result, in some patients blood samples were taken up to 24 h after initiating therapy for CHF, which may have produced lower concentrations of NPs. Another important limitation is the possible influence of potential biological variation of NP on the results of the present study. The variability of the concentrations of NP in CHF has not been studied in veterinary medicine yet, but it might be significant according to several studies in human medicine.^{36,37} A Cox regression analysis would have been ideal to evaluate the additional influence of variables other than NP on survival. However, the study population was too small to perform this statistical test. Furthermore, it is important to notice that the proposed cut-off values apply only to the assay used in the present study.

Conclusions

The present study suggests that in patients with MMVD high NT-proBNP levels after starting treatment for CHF and a high heart failure class at time of treatment start are risk factors for mortality. Those results may help to provide more specific information for clients regarding prognosis for their pet and may detect patients at risk, which might benefit from closer monitoring. The proposed NT-proBNP cut-off after treatment start of 965 pmol/l as well as the question of whether NT-proBNP testing might be an effective way to improve management of patients with CHF has to be evaluated in larger studies.

Conflict of interest

NT-proBNP and proANP kits were provided free of charge by Idexx Laboratories. The tests were conducted at the hospital at the University of Munich.

References

1. Detweiler DK, Patterson DF. The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Ann N Y Acad Sci* 1965;127: 481–516.

2. Abott J. Acquired valvular disease. In: Tilley LP, Smith FWK, Oyama MA, Sleeper MM, editors. *Manual of canine and feline cardiology*. Philadelphia: WB Saunders; 2008. p. 110–138.
3. Kvarn C, Haggstrom J, Pedersen HD, Hansson K, Eriksson A, Jarvinen AK, Tidholm A, Bsenko K, Ahlgren E, Ilves M, Ablad B, Falk T, Bjerkfås E, Gundler S, Lord P, Wegeland G, Adolfsson E, Corfitzen J. Efficacy of enalapril for prevention of congestive heart failure in dogs with myxomatous valve disease and asymptomatic mitral regurgitation. *J Vet Intern Med* 2002;16:80–88.
4. Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Haggstrom J, Tarducci A. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med* 2008;22:120–128.
5. Haggstrom J, Hansson K, Kvarn C, Swenson L. Chronic valvular disease in the cavalier King Charles spaniel in Sweden. *Vet Rec* 1992;131:549–553.
6. Pedersen HD, Lorentzen KA, Kristensen BO. Echocardiographic mitral valve prolapse in cavalier King Charles spaniels: epidemiology and prognostic significance for regurgitation. *Vet Rec* 1999;144:315–320.
7. Olsen LH, Martinussen T, Pedersen HD. Early echocardiographic predictors of myxomatous mitral valve disease in dachshunds. *Vet Rec* 2003;152:293–297.
8. Haggstrom J, Boswood A, O'Grady M, Jons O, Smith S, Swift S, Borgarelli M, Gavaghan B, Kresken JG, Patteson M, Ablad B, Bussadori CM, Glaus T, Kovacevic A, Rapp M, Santilli RA, Tidholm A, Eriksson A, Belanger MC, Deinert M, Little CJ, Kvarn C, French A, Ronn-Landbo M, Wess G, Eggertsdottir AV, O'Sullivan ML, Schneider M, Lombard CW, Dukes-McEwan J, Willis R, Louvet A, DiFruscia R. Effect of pimobendan or benazepril hydrochloride on survival times in dogs with congestive heart failure caused by naturally occurring myxomatous mitral valve disease: the QUEST study. *J Vet Intern Med* 2008;22:1124–1135.
9. Haggstrom JKC, Pedersen HD. Acquired valvular disease. In: Ettinger SJFE, editor. *Textbook of veterinary internal medicine*. St Louis: Elsevier; 2005. p. 1022–1039.
10. Magga J, Vuolteenaho O, Tokola H, Marttila M, Ruskoaho H. B-type natriuretic peptide: a myocyte-specific marker for characterizing load-induced alterations in cardiac gene expression. *Ann Med* 1998;30(Suppl. 1):39–45.
11. Nishida Y, Morita H, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hosomi H. Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs. *Jpn J Physiol* 1990;40:531–540.
12. 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;272:20545–20554.
13. Winters CJ, Sallman AL, Baker BJ, Meadows J, Rico DM, Vesely DL. The N-terminus and a 4000-MW peptide from the midportion of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone each circulate in humans and increase in congestive heart failure. *Circulation* 1989;80:438–449.
14. 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.
15. Fine DM, Declue AE, Reiner 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;232:1674–1679.
16. 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;232:1496–1503.
17. 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;17:172–177.
18. 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;11:103–121.
19. Greco DS, Biller B, Van Liew CH. Measurement of plasma atrial natriuretic peptide as an indicator of prognosis in dogs with cardiac disease. *Can Vet J* 2003;44:293–297.
20. 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.
21. Dhaliwal AS, Deswal A, Pritchett A, Aguilar D, Kar B, Soucek J, Bozkurt B. Reduction in BNP levels with treatment of decompensated heart failure and future clinical events. *J Card Fail* 2009;15:293–299.
22. Cheng V, Kazanagra R, Garcia A, Lenert L, Krishnaswamy P, Gardetto N, Clopton P, Maisel A. A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:386–391.
23. Logeart D, Thabut G, Jourdain P, Chavelas C, Beyne P, Beauvais F, Bouvier E, Solal AC. Predischarge B-type natriuretic peptide assay for identifying patients at high risk of re-admission after decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:635–641.
24. Bettencourt P, Azevedo A, Pimenta J, Frieos F, Ferreira S, Ferreira A. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide predicts outcome after hospital discharge in heart failure patients. *Circulation* 2004;110:2168–2174.
25. Cohen-Solal A, Logeart D, Huang B, Cai D, Nieminen MS, Mebazaa A. Lowered B-type natriuretic peptide in response to levosimendan or dobutamine treatment is associated with improved survival in patients with severe acutely decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2343–2348.
26. Häggström J. Heart disease versus heart failure: staging of cardiac disease (proceedings). In: *British small animal veterinary congress*; 2009.
27. Hansson K, Haggstrom J, Kvarn C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound* 2002;43:568–575.
28. Goncalves AC, Orton EC, Boon JA, Salman MD. Linear, logarithmic, and polynomial models of M-mode echocardiographic measurements in dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:994–999.
29. Cornell CC, Kittleson MD, Della Torre P, Haggstrom J, Lombard CW, Pedersen HD, Vollmar A, Wey A. Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med* 2004;18:311–321.

30. Schellenberg S, Grenacher B, Kaufmann K, Reusch CE, Glaus TM. Analytical validation of commercial immunoassays for the measurement of cardiovascular peptides in the dog. *Vet J* 2008;178:85–90.
31. 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;355:1126–1130.
32. Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juilliere Y. Plasma brain natriuretic peptide-guided therapy to improve outcome in heart failure: the STARS-BNP multicenter study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1733–1739.
33. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Mabuchi N, Hayashi M, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Horie H, Sugimoto Y, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide level as a biochemical marker of morbidity and mortality in patients with asymptomatic or minimally symptomatic left ventricular dysfunction. Comparison with plasma angiotensin II and endothelin-1. *Eur Heart J* 1999;20:1799–1807.
34. Stanek B, Frey B, Hulsmann M, Berger R, Sturm B, Strametz-Juranek J, Bergler-Klein J, Moser P, Bojic A, Hartter E, Pacher R. Prognostic evaluation of neurohumoral plasma levels before and during beta-blocker therapy in advanced left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:436–442.
35. Gardner RS, Ozalp F, Murday AJ, Robb SD, McDonagh TA. N-terminal pro-brain natriuretic peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure. *Eur Heart J* 2003;24:1735–1743.
36. O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, O'Loughlin C, Lange S, Conlon C, Phelan D, Cunningham S, McDonald K. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J Card Fail* 2007;13:50–55.
37. Bruins S, Fokkema MR, Romer JW, Dejongste MJ, van der Dijs FP, van den Ouweland JM, Muskiet FA. High intra-individual variation of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with stable chronic heart failure. *Clin Chem* 2004;50:2052–2058.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

V. DISKUSSION

1. Natriuretische Peptide in verschiedenen Stadien der Mitralklappenendokardiose

Biomarker in der Kardiologie können in Situationen hilfreich sein, in denen konventionelle bildgebende Diagnostikmethoden keine eindeutigen Ergebnisse liefern oder eine echokardiographische Untersuchung nicht verfügbar oder zu kostenintensiv ist. Im Rahmen dieser Studie sollten folgende Fragen mithilfe von NP beantwortet werden:

- 1.) Kann festgestellt werden, ob die Dyspnoe eines Patienten kardial bedingt ist?
- 2.) Lassen sich herzgesunde von asymptomatischen herzkranken Patienten differenzieren?
- 3.) Ist es möglich, asymptomatische Patienten mit vergrößerten Kammerdimensionen zu identifizieren?

In Publikation 1 wurden diese Fragestellungen innerhalb der bisher größten untersuchten Studienpopulation evaluiert.

1.1. NT-proBNP und proANP im dekompenzierten Stadium der Mitralklappenendokardiose

Wie in vorangegangenen Berichten, wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass Patienten im Herzversagen statistisch signifikant höhere NT-proBNP- und proANP-Konzentrationen im Vergleich zu asymptomatischen Patienten mit MKE haben (ASANO et al., 1999; HAGGSTROM et al., 2000; OYAMA et al., 2008; TARNOW et al., 2009).

In dieser Studie konnte bei Patienten mit Atemnot, aber ohne Herzgeräusch eine kardiale Ursache der respiratorischen Symptome ausgeschlossen werden, wenn die NT-proBNP-Konzentration < 1181 pmol/l und die proANP-Konzentration < 1366 fmol/ml beträgt. Beide Cutoff-Werte wiesen eine sehr hohe Spezifität (97 % bzw. 95 %) auf. Allerdings ist dieses Szenario klinisch wenig relevant, da Patienten im CHF aufgrund einer MKE in der Regel ein deutliches Herzgeräusch aufweisen. Die Bestimmung der NP in dieser Situation wäre nur nützlich, wenn der Patient schwierig zu auskultieren ist.

Von wesentlich größerer Relevanz ist die Frage, ob ein Patient mit Herzgeräusch und Atemnot im Herzversagen ist oder nicht. In der vorliegenden Studie konnten ab einem Cutoff-Wert von 1207 pmol/l für NT-proBNP und von 1578 fmol/ml für proANP Hunde mit MKE und CHF von Hunden mit MKE ohne CHF mit einer Sensitivität von 83 % und einer Spezifität von 85 % bzw. 86 % unterschieden werden. Diese Werte sind höher als die oben diskutierten Cutoff-Werte zur Unterscheidung von herzgesunden Tieren, da eine Vergrößerung der Herzkammern schon bei asymptomatischen Patienten (CHIEF Stadium B2) die Konzentration der NP erhöhen kann. Obwohl in der vorliegenden Studie ein anderer Assay verwendet wurde, ist der ermittelte NT-proBNP-Cutoff-Wert von > 1207 pmol/l ähnlich den Werten in anderen Studien. So beschrieben Oyama und Mitarbeiter, dass ab einer NT-proBNP-Konzentration von > 1188 pmol/l Herzversagen aufgrund jeder Art von Herzerkrankung diagnostiziert werden kann (OYAMA et al., 2009). Fine und Mitarbeiter schlugen einen Cutoff-Wert von > 1400 pmol/l vor, um Hunde mit dekompensierter MKE und DCM von Hunden mit primären respiratorischen Erkrankungen zu unterscheiden (FINE et al., 2008). Bei Verwendung der in dieser Studie errechneten Cutoff-Werte zeigte sich allerdings eine Überlappung der NP-Werte zwischen den symptomatischen und asymptomatischen Patienten. Diese Überschneidung wurde bereits in human- und veterinärmedizinischen Studien demonstriert. Januzzi und Mitarbeiter zeigten, dass bei 17% von 1256 Patienten mit Dyspnoe die NT-proBNP-Konzentrationen in einem diagnostisch nicht eindeutigen Bereich lagen (JANUZZI et al., 2006; OYAMA et al., 2008). Auch Oyama und Mitarbeiter berichteten, dass in einer Population von Hunden mit MKE und DCM, NT-proBNP-Werte zwischen 820 und 1725 pmol/l nicht geeignet waren, asymptomatische Patienten von solchen im CHF zu unterscheiden (OYAMA et al., 2008). In der vorliegenden Studie erhöhte sich Spezifität durch einen höher angesetzten NT-proBNP Cutoff von > 1800 pmol/l auf 91 %, allerdings sank gleichzeitig die Sensitivität auf 71 %. Für die Klinik bedeutet dies, dass die Wahrscheinlichkeit, CHF korrekt zu diagnostizieren, bei höheren NP-Konzentrationen zunimmt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die zusätzliche Bestimmung von NT-proBNP von klinischer Bedeutung sein könnte, wenn Ultraschall- und Röntgenuntersuchungen keine eindeutige Diagnose für CHF liefern. Außerdem könnten NP wie in der Humanmedizin zur Diagnose von CHF bei Notfallpatienten mit Dyspnoe

verwendet werden, wenn ein Schnelltest verfügbar wäre. Allerdings sollten NP-Werte mit Vorsicht interpretiert werden, da erhöhte Konzentrationen auch bei Patienten mit primären respiratorischen Erkrankungen aufgrund von pulmonärer Hypertonie auftreten und folglich zur Fehldiagnose CHF führen können (OYAMA et al., 2009; KELLIHAN et al., 2011). Weiterhin fehlte in der vorliegenden Studie eine Gruppe mit asymptomatischer MKE und gleichzeitig vorliegenden respiratorischen Symptomen aufgrund einer primären Atemwegserkrankung. Dies limitiert den Nutzen des berechneten Cutoff-Werts, um Patienten im CHF von Patienten mit asymptomatischer MKE und gleichzeitig primärer respiratorischer Erkrankung zu unterscheiden.

1.2. NT-proBNP und proANP im asymptomatischen Stadium der Mitralklappenendokardiose im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

Die vorliegende Studie ist nach dem Wissen der Autorin die erste, welche die CHIEF-Klassifikation anwendet. Die NT-proBNP-Konzentrationen bei Hunden in Stadium B1 und B2 und die proANP-Konzentrationen bei Hunden in Stadium B2 waren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich. Trotz des signifikanten Unterschieds waren die Sensitivität und Spezifität allerdings relativ gering. Bei einem NT-proBNP-Cutoff-Wert von > 545 pmol/l konnten Patienten in CHIEF-Klasse B von der gesunden Kontrollgruppe nur mit einer Sensitivität von 60 % und einer Spezifität von 75 % unterschieden werden. Der proANP-Cutoff-Wert von > 1246 fmol/ml lieferte eine Sensitivität von 39 % und eine Spezifität von 87 %.

Somit wurden die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe bestätigt, die ebenfalls einen signifikanten Unterschied innerhalb der NT-proBNP-Konzentration zwischen Hunden in Stadium ISACHC I und der gesunden Kontrollgruppe feststellten (CHETBOUL et al., 2009). Die CHIEF-Klasse B1 und ISACHC-Klasse Ia sind miteinander vergleichbar, da beide asymptomatische Patienten ohne vergrößerte Kammerdimensionen repräsentieren. Im Gegensatz zu den genannten Ergebnissen und denen der vorliegenden Studie steht eine Untersuchung, bei der CKCS mit geringgradiger und mittelgradiger MKE keine signifikant höheren NT-proBNP und proANP-Konzentrationen im Plasma aufwies als die gesunde Kontrollgruppe (TARNOW et al., 2009). In einer weiteren Studie konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen Patienten in Klasse ISACHC Ia und

gesunden Hunden gefunden werden (TAKEMURA et al., 2009). Die Ursache für diese unterschiedlichen Resultate ist nicht klar. Allerdings war in der vorliegenden Studie die Studienpopulation vergleichsweise groß, was die Wahrscheinlichkeit erhöht hat, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu entdecken.

Von einem diagnostischen Standpunkt ist es jedoch offensichtlich, dass NP zur Unterscheidung zwischen herzgesunden und asymptomatischen MKE-Patienten aufgrund der niedrigen Sensitivität und Spezifität der ermittelten Cutoff-Werte nur von geringem Nutzen sind. Außerdem können Hunde mit MKE normalerweise leicht anhand eines Herzgeräuschs identifiziert werden. Daher stellt die Auskultation eine sehr zuverlässige, kostengünstige und nicht-invasive diagnostische Möglichkeit dar, die von jedem Tierarzt durchführbar ist. Dagegen könnte die Ermittlung der NP-Konzentrationen zur Diagnose des okkulten Stadiums der DCM hilfreich sein. Da viele der betroffenen Hunde kein Herzgeräusch aufweisen, sind diese Patienten schwer zu identifizieren und würden von einem NT-proBNP-Test profitieren (WESS et al., 2011).

NT-proBNP, aber nicht proANP war bei Hunden mit asymptomatischer MKE und normalen Kammerdimensionen (CHIEF B1) im Vergleich zur herzgesunden Kontrollgruppe signifikant höher. Daher konnte die Hypothese, dass proANP sensitiver als NT-proBNP ist, um frühe Stadien der MKE zu identifizieren, nicht gestützt werden (DAGGUBATI et al., 1997; ASANO et al., 1999; HAGGSTROM et al., 2000)).

1.3. NT-proBNP und proANP in CHIEF-Klasse B1 und B2

Von höherer klinischer Relevanz ist die Fragestellung, ob sich asymptotische Patienten mit Herzvergrößerung (B2) von denen ohne, vergrößerte Kammerdimensionen (B1) unterscheiden lassen, da Patienten in CHIEF-Klasse B2 von einer frühen Therapie profitieren könnten. In dieser Studie waren die Konzentrationen beider NP signifikant unterschiedlich zwischen den Stadien B1 und B2. Der errechnete Cutoff-Wert, um Hunde in CHIEF-Klasse B1 von Hunden in Klasse B2 zu unterscheiden, lag für NT-proBNP bei 518 pmol/l nur bei einer Sensitivität von 83 % und einer Spezifität von 50 % und für proANP bei 1065 fmol/ml bei einer Sensitivität von 64 % und einer Spezifität von 55 %.

Ein signifikanter Unterschied in der NT-proBNP-Konzentration zwischen den

ISACHC-Klassen Ia und Ib wurde in einer aktuellen Studie gefunden, die eine Population von 72 asymptomatischen Hunden mit MKE untersuchte (CHETBOUL et al., 2009). In einer weiteren Studie mit 44 Patienten konnte dagegen mithilfe von NT-proBNP nicht zwischen ISACHC-Klasse Ia und Ib unterschieden werden (TAKEMURA et al., 2009). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser beiden Studien könnte von der Anzahl der untersuchten Patienten abhängen, da in kleinen Patientenpopulationen ein statistisch signifikanter Unterschied möglicherweise nicht identifiziert werden kann. Es ist zu berücksichtigen, dass das Stadium ISACHC Ib die CHIEF-Stadien B2 und auch C1 einschließt und deshalb ein direkter Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich ist.

Auch zur Identifikation von asymptomatischen Patienten mit vergrößerten Kammerdimensionen scheinen NP-Werte trotz des statistisch signifikanten Unterschieds nicht geeignet zu sein. Die ermittelten Cutoff-Werte können zur Differenzierung nicht verwendet werden, da auch hier die Überschneidung der NP-Konzentrationen zwischen beiden Gruppen zu groß ist. Röntgen und Echokardiographie stellen für die Unterscheidung zwischen CHIEF Stadium B1 und B2 die besseren diagnostischen Möglichkeiten dar.

Als klinisch sinnvoll könnte sich die Bestimmung von NP bei Patienten mit asymptomatischer MKE erweisen, um das Fortschreiten der Erkrankung zu erkennen und zu verfolgen, da die NP-Konzentrationen in der vorliegenden Studie mit dem Schweregrad der Erkrankung stetig anstiegen. Diese Hypothese sollte allerdings durch weitere Studien überprüft werden. Außerdem sollte dabei die natürliche Variabilität der NP-Konzentrationen berücksichtigt werden (KELLIHAN et al., 2009).

1.4. Erhöhte natriuretische Peptid-Konzentrationen bei herzgesunden Hunden

Einige der offensichtlich herzgesunden oder nur mild erkrankten Hunde hatten erhöhte NT-proBNP- und proANP-Werte, die normalerweise bei Patienten im Herzversagen auftreten. Als Ursachen für diese erhöhten NT-proBNP- und proANP-Werte kämen eine Assay-Interferenz oder eine undiagnostizierte klinische Erkrankung in Frage. In der Humanmedizin ist eine Interferenz durch heterophile Antikörper eine bekannte Ursache für falsch-positive Sandwich-

ELISAs (PRIMUS et al., 1988; DESPRES & GRANT, 1998). Heterophile Antikörper im Plasma von anderen Säugetieren wurden bis jetzt kaum beschrieben. Allerdings konnten Solter und Mitarbeiter kürzlich zeigen, dass kanine heterophile Antikörper imstande sind, falsch-positive Resultate bei einem kaninen BNP-Sandwich-ELISA hervorzurufen (SOLTER et al., 2008). Klinisch gesunde Patienten wurden bis auf Harnstoff- und Kreatininmessungen nicht auf potentiell bestehende subklinische Krankheiten untersucht. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die bei manchen gesunden Hunden unerwartet hohen Werte durch nicht erkannte Erkrankungen hervorgerufen wurden. Ungefähr die Hälfte der Patienten mit hohen NT-proBNP-Werten hatten auch gleichzeitig erhöhte proANP-Konzentrationen. Die andere Hälfte hatten entweder nur hohe NT-proBNP-Werte oder nur erhöhte proANP Werte. Die gleichzeitige Erhöhung von NT-proBNP und proANP deutet eher auf eine subklinische Erkrankung als Ursache hin, während die einzelne Erhöhung von NT-proBNP oder proANP für eine Assay-Interferenz sprechen würde.

1.5. Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Konzentration der natriuretischen Peptide

Einige der Proben, welche für die vorliegende Studie analysiert wurden, wurden länger als drei Jahre bei -80°C gelagert. Dies stellt möglicherweise eine Limitation dar, da es nach dem Wissen der Autorin momentan keine veterinärmedizinischen Studien gibt über die Langzeitstabilität der NP. Eine humanmedizinische Studie evaluierte die Zweijahresstabilität von NT-proBNP bei einer Lagerungstemperatur von -20°C . Dabei konnte kein signifikanter Abfall der NT-proBNP-Konzentration beobachtet werden (CAULIEZ et al., 2008). Ein Vergleich der Konzentrationen der eigenen Proben aus den Jahren 2005, 2006 und 2007 mit den Ergebnissen der Proben aus dem Jahr 2010 ergab allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass kein signifikanter Abbau der NP unter Lagerungsbedingungen bei -80°C stattfindet. Allerdings sind weitere Studien nötig, um diese Fragestellung zu evaluieren.

2. Natriuretische Peptide in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und Gewicht

Ein weiteres interessantes und potentiell klinisch relevantes Resultat in Publikation 1 war der statistisch signifikante Unterschied der NT-proBNP- und proANP-Konzentrationen zwischen männlich intakten und weiblich intakten Tieren in der herzgesunden Kontrollgruppe. Weibliche, nicht kastrierte Patienten wiesen deutliche höhere Plasma-Konzentrationen als intakte Rüden auf. Frühere Studien, die allerdings nicht zwischen intakten und kastrierten Tieren unterschieden, konnten keinen Unterschied zwischen den BNP- und NT-proBNP-Konzentrationen bei weiblichen und männlichen Hunden feststellen (DEFRANCESCO et al., 2007; OYAMA et al., 2008). Eine aktuelle Studie, die NT-proBNP-Werte bei neun (sechs männlichen und drei weiblichen) Hunden vor und nach der Kastration untersuchte, zeigte eine signifikante Erhöhung der NT-proBNP-Konzentration bei den Rüden nach der Kastration. Bei den weiblichen Tieren konnte kein Unterschied zwischen den Werten vor und nach der Operation festgestellt werden. Allerdings fiel weder prä- noch postoperativ in dieser Studie ein Unterschied zwischen den weiblichen und männlichen Tieren auf (LEACH et al., 2008). Die Diskrepanz zu den vorliegenden Ergebnissen kann durch die sehr niedrige Fallzahl der letztgenannten Studie erklärt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen jedoch mit denen von zahlreichen humanmedizinischen Studien überein, in welchen die BNP-, ANP- und NT-proBNP Konzentrationen bei Frauen signifikant höher waren als bei Männern (REDFIELD et al., 2002; SUTTON et al., 2003; FRAGOPOULOU et al., 2010). Diese Resultate können momentan noch nicht ganz zufriedenstellend erklärt werden. In einer humanmedizinischen Studie schien die BNP-Konzentration zumindest teilweise mit der Östrogen-Konzentration im Blut assoziiert zu sein, da die BNP-Werte bei Frauen, die eine Hormon-Ersatz-Therapie erhielten, deutlich höher lagen als bei untherapierten Frauen (REDFIELD et al., 2002). In einer weiteren Studie stiegen bei postmenopausalen Frauen die BNP-Werte nach 3-monatiger Östradiol-Gabe deutlich an (MAFFEI et al., 2001). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen schlägt eine neuere Studie vor, dass möglicherweise Androgene und nicht Östrogene die geschlechtsabhängigen Unterschiede zwischen den BNP- und NT-proBNP-Werten mediiieren (CHANG et al., 2007). In dieser Studie wurde keine Assoziation von BNP und NT-proBNP mit dem

Östrogen-Status gefunden, dafür aber eine positive Korrelation mit der sex-hormone binding globuline (SHBG)-Konzentration und eine negative Korrelation mit freiem Testosteron. Diese Beobachtungen werden durch eine Untersuchung an Rattenatrien bestätigt, in der Testosteron die Freisetzung von ANP hemmte (DENG & KAUFMAN, 1993). Die zuvor bemerkte Korrelation der NP mit Östrogen erklären Chang und Mitarbeiter mit dem Anstieg des SHBG durch höhere Östrogenkonzentrationen, wodurch es zu niedrigen Konzentrationen an freiem Testosteron kommt (CHANG et al., 2007).

Zwischen den Gewichts- und Altersgruppen konnte kein Unterschied der NP-Konzentrationen festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von anderen Studien (DEFRANCESCO et al., 2007; OYAMA et al., 2008; KELLIHAN et al., 2009). Allerdings konnte in einer Untersuchung an gesunden CKCS demonstriert werden, dass die Plasma-NT-proANP-Werte der Patienten mit zunehmendem Gewicht sanken und mit fortschreitendem Alter anstiegen (ERIKSSON et al., 2001). Auch wurden in einer aktuellen Studie niedrigere NT-proANP-Werte in einer Population von übergewichtigen Hunden im Vergleich zu einer normalgewichtigen Kontrollgruppe nachgewiesen (SCHWARTZ et al., 2011). Eine Studie mit Dobermännern zeigte signifikant erhöhte NT-proBNP-Konzentrationen bei Hunden, die älter als acht Jahre waren (WESS et al., 2011). Auch humanmedizinischen Studien berichteten, dass NP-Konzentrationen mit erhöhtem body mass index (BMI) sinken und bei älteren Menschen ansteigen (REDFIELD et al., 2002; KRAUSER et al., 2005). Die Unterschiede zwischen diesen Studien und der vorliegenden könnten eventuell durch die Tatsache erklärt werden, dass die Patienten in dieser Untersuchung nach ihrem absoluten Alter und Gewicht eingeteilt worden sind. In den Studien, die Alters- und Gewichtsunterschiede feststellten, wurden jeweils nur eine Rasse, nämlich CKCS (ERIKSSON et al., 2001) oder Dobermänner (WESS et al., 2011), untersucht oder die Patienten nach BMI gruppiert (SCHWARTZ et al., 2011). In der vorliegenden Studie sind demnach von die Rasse zu Rasse unterschiedliche Lebenserwartung (EGENVALL et al., 2000) und BMI nicht berücksichtigt worden.

3. Natriuretische Peptide als prognostische Parameter

In Publikation 2 wurde gezeigt, dass der klinische Status bei Erstvorstellung und die NT-proBNP-Konzentration sieben bis 30 Tage nach Therapiebeginn die besten prognostischen Parameter für die kardiale Gesamtüberlebenszeit bei Patienten im Herzversagen aufgrund einer MKE sind.

Einige veterinärmedizinische Studien haben bereits deutlich gemacht, dass die Plasma-Konzentrationen von NP prognostische Aussagekraft bei Patienten im CHF haben. Greco und Mitarbeiter stellten in einer Pilotstudie fest, dass erhöhte ANP-Konzentrationen mit einer geringeren Überlebenszeit bei Hunden assoziiert sind (GRECO et al., 2003). MacDonald und Mitarbeiter kamen zu dem Schluss, dass die Mortalität bei Hunden mit symptomatischer MKE auch über erhöhte BNP-Werte vorhergesagt werden kann (MACDONALD et al., 2003). In einer multivariaten Analyse zeigten Serres und Mitarbeiter, dass anhand eines NT-proBNP-Wert von > 1500 pmol/l die sechsmonatige Überlebenszeit von Patienten mit MKE in ISACHC-Klasse II und III unabhängig von anderen Variablen prognostiziert werden kann (SERRES et al., 2009). Moonarmart und Mitarbeiter berichteten, dass NT-proBNP als Marker für erhöhte Mortalität bei Patienten mit symptomatischer und asymptomatischer MKE geeignet sein könnte (MOONARMART et al., 2010).

Die vorliegende Studie hat jedoch erstmals in der Veterinärmedizin die prognostische Aussagekraft von NT-proBNP und proANP an zwei verschiedenen Untersuchungstagen untersucht und verglichen. Am Tag der Erstvorstellung waren alle Patienten das erste Mal im Herzversagen. Außerdem wurde die Therapie auf eine Behandlungsstrategie (Furosemid und Pimobendan) standardisiert, um auszuschließen, dass unterschiedliche Medikamente einen Einfluss auf die Überlebenszeit haben.

Patienten im Stadium CHIEF C2 (mildes bis moderates Herzversagen) am ersten Untersuchungstag lebten signifikant länger als Patienten in C3 (schweres bis lebensbedrohliches Herzversagen). Dieser Befund schien unabhängig von der NT-proBNP-Konzentration zu sein, da ein Vergleich der NT-proBNP-Werte zwischen Patienten in C2 und C3 keinen signifikanten Unterschied zeigte. Über ein signifikant längeres Überleben bei Patienten mit MKE in ISACHC-Klasse II im Vergleich zu Patienten in ISACHC-Klasse III berichten auch Serres und Mitarbeiter (SERRES et al., 2009). In zwei weiteren Studien konnten in

multivariablen Analysen anhand der Schwere der klinischen Symptome allerdings keine Aussagen hinsichtlich des Überlebens getroffen werden (BORGARELLI et al., 2008; HAGGSTROM et al., 2008).

Eine NT-proBNP-Konzentration < 965 pmol/l ermittelt im Zeitraum von sieben bis dreißig Tagen nach Therapiestart war mit einer signifikant höheren Überlebenschance assoziiert. Im Gegensatz dazu konnte die NT-proBNP-Konzentration am ersten Untersuchungstag keine Informationen hinsichtlich des Überlebens bieten. Diese Ergebnisse müssen allerdings mit Vorsicht interpretiert werden, da die statistische Aussagekraft aufgrund der kleinen Patientenpopulation niedrig ist.

Es ist unklar, warum die prognostische Aussagekraft von proANP in dieser Studie niedriger war als die von NT-proBNP. Allerdings stimmt dieses Ergebnis mit Berichten aus der Human- und Veterinärmedizin überein, welche zeigten, dass BNP und NT-proBNP, aber nicht ANP, NT-proANP und proANP unabhängige Risikofaktoren für die Mortalität im Herzversagen darstellen (TSUTAMOTO et al., 1999; STANEK et al., 2001; MOONARMART et al., 2010).

Die Resultate der vorliegenden Studie stimmen mit denen zahlreicher humanmedizinischer Berichte über Patienten im CHF überein. Aus diesen Studien geht hervor, dass die BNP- und NT-proBNP-Werte unabhängig von anderen Variablen nach Therapiebeginn für CHF besser mit dem klinischen Outcome korrelierten als die Werte am Tag der Erstvorstellung (CHENG et al., 2001; BETTENCOURT et al., 2004; LOGEART et al., 2004; DHALIWAL et al., 2009). Zusätzlich zeigten diese Studien, dass eine höhere prozentuale Reduktion dieser Werte ebenfalls mit einer besseren Überlebenszeit assoziiert war. In der vorliegenden Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen der prozentualen Änderung der NP-Konzentrationen und der Überlebenszeit gefunden werden. Diese Diskrepanz zu den humanmedizinischen Studien liegt wahrscheinlich an der kleinen Studienpopulation der vorliegenden Studie. Es ist möglich, dass statistisch signifikante Unterschiede aus diesem Grund nicht entdeckt wurden.

Normalerweise wird die Entscheidung, wann und wie die Therapie bei Patienten im CHF geändert wird, aufgrund von subjektiver Evaluation der klinischen und radiologischen Symptome sowie der Beurteilung von Blutergebnissen getroffen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die NT-proBNP-

Bestimmung eventuell erfolgreich genutzt werden könnte, um die Behandlung von Patienten im CHF anzupassen. So könnte man einen bestimmten Wert festlegen, auf den die NT-proBNP-Konzentrationen während der Therapie sinken sollen. Es gibt bereits einige humanmedizinische Studien, die darauf hindeuten, dass eine durch NP geleitete Therapie erfolgreicher sein könnte als Therapiemaßnahmen, die sich allein an klinischen Symptomen orientieren (TROUGHTON et al., 2000; JOURDAIN et al., 2007). Andererseits gibt es Hinweise, dass beim Menschen hohe initiale BNP-Werte eher konstant hoch bleiben und nicht auf niedrigere Werte sinken, wie es initial niedrigere Werte tun (DHALIWAL et al., 2009). Dies würde den Nutzen von absoluten Werten als Ziel limitieren. In der Veterinärmedizin existiert eine Pilotstudie, die eine Korrelation zwischen den Änderungen der NT-proBNP-Werte und den Entscheidungen aufgrund klinischer Symptome der behandelnden Ärzte bei Hunden mit symptomatischer MKE zeigen konnte (ACHEN et al., 2009). Hierzu sind allerdings weitere Studien notwendig, um zu untersuchen, ob NP verwendet werden können, um den Therapieerfolg in der Veterinärmedizin zu evaluieren.

Zwischen den beiden Überlebensgruppen wurde kein Unterschied in Bezug auf Alter, Kreatinin- und Harnstoff-Konzentration, Furosemiddosis oder echokardiographische Parameter zu beiden Untersuchungszeitpunkten gefunden. Im Gegensatz dazu berichteten Häggström und Mitarbeiter eine Assoziation zwischen Überleben und Furosemiddosis, Kreatininkonzentration und LA/Ao (HAGGSTROM et al., 2008). Auch Serres und Mitarbeiter fanden signifikante Unterschiede zwischen einigen echokardiographischen Parametern beim Vergleich von Patienten, die 6 Monate überlebten und Patienten, die 6 Monate nicht überlebten. Der Grund für diese Unterschiede zwischen der vorliegenden Studie und den oben genannten könnte wieder an der kleinen Studienpopulation liegen. Außerdem wurden nur Patienten, die ihren zweiten Untersuchungstag erlebten in die Studie eingeschlossen. Die Werte der Patienten, die nach ihrem ersten Untersuchungstag starben, hätten eventuell die Ergebnisse verändert. Andererseits stimmen die vorliegenden Resultate mit Studien aus der Humanmedizin überein, welche zeigten, dass die BNP- und NT-proBNP-Konzentrationen aussagekräftiger für das Überleben waren als echokardiographische oder klinische Parameter (GARDNER et al., 2003; LOGEART et al., 2004).

Für die Evaluation der prognostischen Aussagekraft der NP war die Studienpopulation aufgrund der strengen Einschlusskriterien sehr klein, was die statistische Aussagekraft reduziert. Außerdem war der Zeitpunkt der Nachuntersuchung nicht standardisiert. Die zweite Untersuchung musste zwar innerhalb von 30 Tagen nach Erstvorstellung stattfinden, aber es ist nicht auszuschließen, dass die NT-proBNP- und proANP-Konzentrationen an verschiedenen Tagen unterschiedliche Informationen lieferten. Außerdem konnte der Zeitpunkt der ersten Blutabnahme nicht standardisiert werden, da manche Patienten zu instabil waren, um sofort nach Einlieferung Blut zu nehmen. Daher wurden bei diesen Patienten Blutproben erst bis zu 24 h nach Beginn der Therapie genommen, was wahrscheinlich niedrigere NP-Konzentrationen zur Folge hatte. Eine weitere wichtige Limitation ist der potentielle Einfluss von biologischen Schwankungen der NP-Werte auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Die Variabilität der NP im CHF wurde bis jetzt in der Veterinärmedizin nicht untersucht, ist aber nach einigen humanmedizinischen Studien möglicherweise signifikant (BRUINS et al., 2004; O'HANLON et al., 2007).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Mitralklappenendokardiose (MKE) macht ungefähr 75 % der Herzerkrankungen beim Hund aus (DETWEILER & PATTERSON, 1965). Kardiale Biomarker, wie das aminoterminal pro-B-Typ natriuretische Peptid (NT-proBNP) und das pro-atriale natriuretische Peptid 31 – 67 (proANP) könnten bei der Diagnosestellung und Schweregradeinteilung hilfreich sein, wenn eine Untersuchung mittels Ultraschall nicht verfügbar ist. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass natriuretische Peptide (NP) auch hinsichtlich der Prognosestellung bei Patienten im Herzversagen von Nutzen sein könnten (SERRES et al., 2009).

Ziel der vorliegenden Studie war es, die NT-proBNP- und proANP-Konzentrationen zwischen verschiedenen Stadien der MKE und einer herzgesunden Kontrollgruppe zu vergleichen und den Einfluss von Gewicht, Alter und Geschlecht auf die Konzentration der NP zu untersuchen. Außerdem sollte die prognostische Aussagekraft der NP bei Patienten im dekompensierten Stadium der MKE untersucht werden.

Es wurden 559 Blutproben aus den Jahren 2005 bis 2010 von 116 gesunden Hunden und 236 Patienten mit MKE in verschiedenen Stadien untersucht. Alle Patienten wurden echokardiographisch und bei respiratorischer Symptomatik zusätzlich röntgenologisch untersucht und anhand eines modifizierten Systems des Canine Heart failure International Expert Forum (CHIEF) in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Von jedem Patienten wurde Blut genommen und die NT-proBNP und proANP-Konzentrationen im Plasma bestimmt. Außerdem wurde bei 27 Hunden im CHF mittels Kaplan-Meier-Kurven die prognostische Aussagekraft der initialen NP-Werte bei Erstvorstellung im akuten Herzversagen (Tag 1) mit den NP-Werten einer Nachuntersuchung sieben bis dreißig Tage nach Beginn mit einer standardisierten Therapie verglichen. Weiterhin wurden die Patienten nach ihrer Überlebenszeit in zwei Gruppen (12-months-survivors und non-survivors) eingeteilt und Ultraschallparameter, Entwässerungsdosis und Kreatinin- und Harnstoff-Konzentrationen zwischen diesen Gruppen verglichen.

Die Konzentrationen von NT-proBNP und proANP stiegen mit zunehmender Schwere der Erkrankung an. Mit einem Cutoff-Wert von 1207 pmol/l für NT-proBNP und 1578 fmol/ml für proANP konnten Hunde mit MKE im CHF

(Stadium C + D) von asymptomatischen MKE-Patienten (Stadium B) mit einer Sensitivität von 83 % und einer Spezifität von 85 bzw. 86 % unterschieden werden. Zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Patienten im Stadium B und zwischen Patienten mit (B2) und ohne Kammervergrößerungen (B1) konnte nicht zuverlässig differenziert werden. Für NT-proBNP und proANP wurde bei den gesunden Kontrolltieren ein signifikanter Unterschied zwischen den intakten weiblichen (598 pmol/l bzw. 1026 fmol/ml) und den intakten männlichen Tieren (315 pmol/l bzw. 836 fmol/ml) festgestellt. Keine Korrelation konnte zwischen den NP-Werten und Alter und Gewicht gefunden werden. Patienten in CHIEF-Klasse C3 an Tag 1 und mit einem NT-proBNP-Wert > 965 pmol/l am Nachuntersuchungstag hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit zu versterben als Patienten in Klasse C2 und einem NT-proBNP-Wert unter 965 pmol/l. Zwischen der survivor und non-survivor-Gruppe bestand bezüglich Furosemiddosis, proANP-, Kreatinin- und Harnstoff-Konzentration und Echoparameter kein statistisch signifikanter Unterschied.

Es konnte gezeigt werden, dass mithilfe der NP Patienten im Herzversagen erkannt werden könnten. Allerdings schienen NP-Werte nicht geeignet um eine subklinische Herzerkrankung zu entdecken und Patienten in Stadium B1 von Patienten in Stadium B2 zu unterscheiden. Außerdem ließen sich anhand der Schwere der Symptome bei Erstvorstellung im CHF und der NT-proBNP-Wert nach Therapie-Beginn Aussagen über die Mortalität treffen. Wie in humanmedizinischen Studien war der NT-proBNP-Wert nach Therapiebeginn aussagekräftiger als die Konzentration bei der Erstvorstellung (CHENG et al., 2001). ProANP-Werte, prozentuale Änderung der NP-Werte zwischen den Untersuchungstagen, Kreatininkonzentration, echokardiographische Parameter und Furosemiddosis hatten in dieser Studie keine prognostische Aussagekraft. Diese Ergebnisse zeigen, dass NP Ultraschalluntersuchungen nicht ersetzen können, um Patienten mit MKE zu identifizieren und den Schweregrad genau zu bestimmen. Mithilfe der NP-Werte ließen sich bessere Aussagen zur Prognose zu treffen und Patienten identifizieren, die möglicherweise von häufigeren Kontrolluntersuchungen oder einer Therapieanpassung profitieren könnten. Weiterhin gibt diese Studie Hinweise darauf, dass die Interpretation von NT-proBNP- und proANP-Werten unter Berücksichtigung des Geschlechts erfolgen sollte.

VII. SUMMARY

Myxomatous mitral valve disease (MMVD) accounts for approximately 75 % of heart disease in dogs (DETWEILER & PATTERSON, 1965). Cardiac biomarkers like N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and pro-atrial natriuretic peptide 31 – 67 (proANP) could be very helpful for diagnosis and staging of this disease, if echocardiography is not available. Furthermore, there is evidence that natriuretic peptides (NP) may be useful as a prognostic biomarker in patients in congestive heart failure (CHF) (SERRES et al., 2009).

Aim of the present study was to compare NT-proBNP and proANP concentrations between different stages of MMVD and a healthy control group and to evaluate the influence of weight, gender and age on NP concentrations. Additionally, prognostic information of NP regarding survival in patients with decompensated MMVD should be studied.

559 samples of 116 healthy individuals and 236 patients in different stages of MMVD were examined between 2005 and 2010. Every examination included echocardiography and, if respiratory symptoms were present, chest radiographs. All dogs were classified according to a modified Canine Heart failure International Expert Forum (CHIEF) system and blood samples for NT-proBNP and proANP analysis were taken from every patient. In 27 patients in CHF association between initial (day 1) NP levels, levels between 7 to 30 days after treatment start and survival was determined using Kaplan-Meier curves. Therapy was standardized for all 27 patients. Also, patients were divided into a 12-months survivors and non-survivors and various variables like ultrasound parameters, furosemide-dosage or creatinine concentration were compared between these groups.

Concentrations of both NP increased with increasing disease severity. Cut-off values of 1207 pmol/l for NT-proBNP and 1578 fmol/ml for proANP were able to differentiate dogs with MMVD and CHF from asymptomatic patients with a sensitivity of 83 % and a specificity of 85 and 86 %, respectively. Both NPs were not able to discriminate reliably between the healthy control group and patients in CHIEF B and between patients with (B2) and without (B1) cardiac enlargement. Intact female dogs (598 pmol/l and 1036 fmol/ml) had significantly higher values

of both NT-proBNP and proANP than intact male dogs (315 pmol/l and 836 fmol/ml). No correlation was found between both NP and age and weight. Dogs in CHIEF C3 on day 1 and a follow-up NT-proBNP level > 965 pmol/l survived significantly shorter than dogs in C2 and a NT-proBNP concentration < 965 pmol/l. Only follow-up NT-proBNP levels, but not furosemide-dose, creatinine and proANP concentrations or echocardiographic parameters were significantly different between 12-month survivor and non-survivor dogs.

The present study showed that NP in MMVD are useful to discriminate patients with CHF from patients with asymptomatic disease. However, due to large overlap of NP concentrations between the groups, NP don't seem useful to detect subclinical disease and to differentiate between stages B1 and B2. Furthermore, in patients with symptomatic MMVD, heart failure class at initial presentation and NT-proBNP levels after treatment start are predictors for mortality. Similar to studies in human medicine, NT-proBNP values after treatment start were better predictors than the concentrations at initial presentation (CHENG et al., 2001; CHENG et al., 2001). ProANP levels, percentage reduction in NP levels, creatinine and urea concentration, echocardiographic parameters and furosemide dose did not predict outcome.

These results show that NP can't replace echocardiography to identify patients with MMVD and to determine disease stage. However, they may be useful to provide more specific information regarding prognosis and may detect patients, which might benefit from closer monitoring or adjusting therapy. Also this study indicates that interpretation of NT-proBNP and proANP values should include consideration of gender-specific values.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

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

Asano K, Masuda K, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 523-9.

Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene B, Luis-Fuentes V, Stepien R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1142-50.

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.

Aupperle H, Thielebein J, Kiefer B, Marz I, Dinges G, Schoon HA. An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. *Vet J* 2009; 180: 88-94.

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

Bayes-Genis A, Pascual-Figal D, Fabregat J, Domingo M, Planas F, Casas T, Ordonez-Llanos J, Valdes M, Cinca J. Serial NT-proBNP monitoring and outcomes in outpatients with decompensation of heart failure. *Int J Cardiol* 2007; 120: 338-43.

Beardow AW, Buchanan JW. Chronic mitral valve disease in cavalier King

Charles spaniels: 95 cases (1987-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 1023-9.

Bettencourt P, Azevedo A, Pimenta J, Frioies F, Ferreira S, Ferreira A. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide predicts outcome after hospital discharge in heart failure patients. *Circulation* 2004; 110: 2168-74.

Black A, French AT, Dukes-McEwan J, Corcoran BM. Ultrastructural morphologic evaluation of the phenotype of valvular interstitial cells in dogs with myxomatous degeneration of the mitral valve. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1408-14.

Bonagura JD, Schober KE. Can ventricular function be assessed by echocardiography in chronic canine mitral valve disease? *J Small Anim Pract* 2009; 50 Suppl 1: 12-24.

Boon J. Acquired heart disease: Mitral insufficiency. In: *Manual of veterinary echocardiography*. Boon J, ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co 1998: 261-86.

Borgarelli M, Zini E, D'Agnolo G, Tarducci A, Santilli RA, Chiavegato D, Tursi M, Prunotto M, Haggstrom J. Comparison of primary mitral valve disease in German Shepherd dogs and in small breeds. *J Vet Cardiol* 2004; 6: 27-34.

Borgarelli M, Savarino P, Crosara S, Santilli RA, Chiavegato D, Poggi M, Bellino C, La Rosa G, Zanatta R, Haggstrom J, Tarducci A. Survival characteristics and prognostic variables of dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 120-8.

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.

Bruins S, Fokkema MR, Romer JW, Dejongste MJ, van der Dijs FP, van den

Ouweland JM, Muskiet FA. High intraindividual variation of B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with stable chronic heart failure. *Clin Chem* 2004; 50: 2052-8.

Brunner-La Rocca HP, Kaye DM, Woods RL, Hastings J, Esler MD. Effects of intravenous brain natriuretic peptide on regional sympathetic activity in patients with chronic heart failure as compared with healthy control subjects. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1221-7.

Buck T, Plicht B, Erbel R. [Current recommendations on echocardiographic evaluation of the severity of mitral regurgitation: standardization and practical application using a scoring system]. *Herz* 2006; 31: 30-7.

Carabello BA. Mitral valve regurgitation. *Curr Probl Cardiol* 1998; 23: 202-41.

Cauliez B, Guignery J, Marinier S, Mariau I, Lavoinnie A. Two-year stability of NT-proBNP in frozen samples using the Roche Elecsys system. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 318-9.

Chang AY, Abdullah SM, Jain T, Stanek HG, Das SR, McGuire DK, Auchus RJ, de Lemos JA. Associations among androgens, estrogens, and natriuretic peptides in young women: observations from the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 109-16.

Chen CG, Thomas JD, Anconina J, Harrigan P, Mueller L, Picard MH, Levine RA, Weyman AE. Impact of impinging wall jet on color Doppler quantification of mitral regurgitation. *Circulation* 1991; 84: 712-20.

Cheng V, Kazanagra R, Garcia A, Lenert L, Krishnaswamy P, Gardetto N, Clopton P, Maisel A. A rapid bedside test for B-type peptide predicts treatment outcomes in patients admitted for decompensated heart failure: a pilot study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 386-91.

Chetboul V, Lefebvre HP, Sampedrano CC, Gouni V, Saponaro V, Serres F, Concordet D, Nicolle AP, Pouchelon JL. Comparative adverse cardiac effects of pimobendan and benazepril monotherapy in dogs with mild degenerative mitral valve disease: a prospective, controlled, blinded, and randomized study. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 742-53.

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.

Clarkson PB, Wheeldon NM, MacFadyen RJ, Pringle SD, MacDonald TM. Effects of brain natriuretic peptide on exercise hemodynamics and neurohormones in isolated diastolic heart failure. *Circulation* 1996; 93: 2037-42.

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, Brodbelt DC, Copeland H, Collins S, Fuentes VL. Assessment of the diagnostic accuracy of circulating cardiac troponin I concentration to distinguish between cats with cardiac and non-cardiac causes of respiratory distress. *J Vet Cardiol* 2009a; 11: 71-8.

Connolly JM, Bakay MA, Fulmer JT, Gorman RC, Gorman JH, 3rd, Oyama MA, Levy RJ. Fenfluramine disrupts the mitral valve interstitial cell response to serotonin. *Am J Pathol* 2009b; 175: 988-97.

Daggubati S, Parks JR, Overton RM, Cintron G, Schocken DD, Vesely DL. Adrenomedullin, endothelin, neuropeptide Y, atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 246-55.

Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 2357-68.

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.

Davis KM, Fish LC, Minaker KL, Elahi D. Atrial natriuretic peptide levels in the elderly: differentiating normal aging changes from disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996; 51: M95-101.

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.

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, Emdin M, Giannessi D. C-type natriuretic peptide and heart failure. *Pharmacol Res* 2006; 54: 326-33.

Deng Y, Kaufman S. The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. *Life Sci* 1993; 53: 689-96.

Despres N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998; 44: 440-54.

Detaint D, Messika-Zeitoun D, Avierinos JF, Scott C, Chen H, Burnett JC, Jr., Enriquez-Sarano M. B-type natriuretic peptide in organic mitral regurgitation: determinants and impact on outcome. *Circulation* 2005; 111: 2391-7.

Detweiler DK, Patterson DF. The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Ann N Y Acad Sci* 1965; 127: 481-516.

Dhaliwal AS, Deswal A, Pritchett A, Aguilar D, Kar B, Soucek J, Bozkurt B. Reduction in BNP levels with treatment of decompensated heart failure and future clinical events. *J Card Fail* 2009; 15: 293-9.

Disatian S, Ehrhart EJ, 3rd, Zimmerman S, Orton EC. Interstitial cells from dogs with naturally occurring myxomatous mitral valve disease undergo phenotype transformation. *J Heart Valve Dis* 2008; 17: 402-11; discussion 12.

Drourr LT, Gordon SG, Roland RM, Saunders AB, Achen SE, Miller MW. NT-pro-BNP Concentration in Preclinical (ISACHC 1a & 1b) Chronic Degenerative Atrioventricular Valve Disease [abstract]. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 759.

Egenvall A, Bonnett BN, Olson P, Hedhammar A. Gender, age, breed and distribution of morbidity and mortality in insured dogs in Sweden during 1995 and 1996. *Vet Rec* 2000; 146: 519-25.

Enriquez-Sarano M, Tajik AJ, Bailey KR, Seward JB. Color flow imaging compared with quantitative Doppler assessment of severity of mitral regurgitation: influence of eccentricity of jet and mechanism of regurgitation. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21: 1211-9.

Enriquez-Sarano M, Seward JB, Bailey KR, Tajik AJ. Effective regurgitant orifice area: a noninvasive Doppler development of an old hemodynamic concept. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 443-51.

Eriksson AS, Jarvinen AK, Eklund KK, Vuolteenaho OJ, Toivari MH, Nieminen MS. Effect of age and body weight on neurohumoral variables in healthy Cavalier King Charles spaniels. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1818-24.

Ettinger SJ SP. The recognition of cardiac disease and congestive heart failure. In:

Canine Cardiology. Ettinger SJ DP, ed. Philadelphia: WB Saunders 1970: 5.

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.

Fox PR, Oyama MA, Reynolds C, Rush JE, DeFrancesco TC, Keene BW, Atkins CE, Macdonald KA, Schober KE, Bonagura JD, Stepien RL, Kelliham 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: S51-61.

Fragopoulou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Nomikos T, Evangelopoulos A, Katsagoni C, Skoumas J, Antonopoulou S, Stefanadis C. N-terminal ProBNP distribution and correlations with biological characteristics in apparently healthy Greek population: ATTICA study. *Angiology* 2010; 61: 397-404.

Gardner RS, Ozalp F, Murday AJ, Robb SD, McDonagh TA. N-terminal pro-brain natriuretic peptide. A new gold standard in predicting mortality in patients with advanced heart failure. *Eur Heart J* 2003; 24: 1735-43.

Goetze JP, Gore A, Moller CH, Steinbruechel DA, Rehfeld JF, Nielsen LB. Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *FASEB J* 2004; 18: 1928-30.

Gouni V, Serres FJ, Pouchelon JL, Tissier R, Lefebvre HP, Nicolle AP, Sampedrano CC, Chetboul V. Quantification of mitral valve regurgitation in dogs with degenerative mitral valve disease by use of the proximal isovelocity surface area method. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 399-406.

Greco DS, Biller B, Van Liew CH. Measurement of plasma atrial natriuretic peptide as an indicator of prognosis in dogs with cardiac disease. *Can Vet J* 2003;

44: 293-7.

Gustafsson BI, Tommeras K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligard E, Fossmark R, Bakke I, Syversen U, Waldum H. Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation* 2005; 111: 1517-22.

Habibullah AA, Villarreal D, Freeman RH, Dietz JR, Vesley DL, Simmons JC. Atrial natriuretic peptide fragments in dogs with experimental heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 130-5.

Hadian M, Corcoran BM, Han RI, Grossmann JG, Bradshaw JP. Collagen organization in canine myxomatous mitral valve disease: an x-ray diffraction study. *Biophys J* 2007; 93: 2472-6.

Haggstrom J, Hansson K, Kwart C, Swenson L. Chronic valvular disease in the cavalier King Charles spaniel in Sweden. *Vet Rec* 1992; 131: 549-53.

Haggstrom J, Hansson K, Karlberg BE, Kwart 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.

Haggstrom J, Hansson K, Kwart C, Pedersen HD, Vuolteenaho O, Olsson K. Relationship between different natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease. *J Vet Cardiol* 2000; 2: 7-16.

Haggstrom J, Kwart C, Pedersen HD. Acquired valvular disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger SJ FE, eds, ed. St Louis: Elsevier 2005: 1022-39.

Haggstrom J, Boswood A, O'Grady M, Jons O, Smith S, Swift S, Borgarelli M, Gavaghan B, Kresken JG, Patteson M, Ablad B, Bussadori CM, Glaus T, Kovacevic A, Rapp M, Santilli RA, Tidholm A, Eriksson A, Belanger MC,

Deinert M, Little CJ, Kwart C, French A, Ronn-Landbo M, Wess G, Eggertsdottir AV, O'Sullivan ML, Schneider M, Lombard CW, Dukes-McEwan J, Willis R, Louvet A, DiFruscia R. Effect of pimobendan or benazepril hydrochloride on survival times in dogs with congestive heart failure caused by naturally occurring myxomatous mitral valve disease: the QUEST study. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1124-35.

Haggstrom J. Heart Disease versus Heart Failure: Staging of Cardiac Disease (Proceedings). British Small Animal Veterinary Congress 2009;

Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 257-60.

Han RI, Black A, Culshaw GJ, French AT, Else RW, Corcoran BM. Distribution of myofibroblasts, smooth muscle-like cells, macrophages, and mast cells in mitral valve leaflets of dogs with myxomatous mitral valve disease. *Am J Vet Res* 2008; 69: 763-9.

Hansson K, Haggstrom J, Kwart C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 568-75.

Helmcke F, Nanda NC, Hsiung MC, Soto B, Adey CK, Goyal RG, Gatewood RP, Jr. Color Doppler assessment of mitral regurgitation with orthogonal planes. *Circulation* 1987; 75: 175-83.

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.

Hori Y, Yamano S, Iwanaga K, Kano T, Tanabe M, Uechi M, Kanai K, Nakao R, Hoshi F, Higuchi S. Evaluation of plasma C-terminal atrial natriuretic peptide in healthy cats and cats with heart disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 135-9.

Horio T, Tokudome T, Maki T, Yoshihara F, Suga S, Nishikimi T, Kojima M, Kawano Y, Kangawa K. Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Endocrinology* 2003; 144: 2279-84.

Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 789-95.

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SC, Jr. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 2101-13.

Igaki T, Itoh H, Suga SI, Hama N, Ogawa Y, Komatsu Y, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Nakao K. Effects of intravenously administered C-type natriuretic peptide in humans: comparison with atrial natriuretic peptide. *Hypertens Res* 1998; 21: 7-13.

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.

ISACHC. Recommendations for Diagnosis of Heart Disease and Treatment of Heart Failure in Small Animals. In: *Textbook of Canine and Feline Cardiology*. Fox PR, Sisson D, N.S. M, eds. Philadelphia: W.B. Saunders 1999: 883-901.

Jansen TL, Tan AC, Smits P, de Boo T, Benraad TJ, Thien T. Hemodynamic effects of atrial natriuretic factor in young and elderly subjects. *Clin Pharmacol*

Ther 1990; 48: 179-88.

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* 2006; 27: 330-7.

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.

Jian B, Xu J, Connolly J, Savani RC, Narula N, Liang B, Levy RJ. Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol* 2002; 161: 2111-21.

Jourdain P, Jondeau G, Funck F, Gueffet P, Le Helloco A, Donal E, Aupetit JF, Aumont MC, Galinier M, Eicher JC, Cohen-Solal A, Juilliere 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.

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: S93-7.

Kellihan HB, Mackie BA, Stepien RL. NT-proBNP, NT-proANP and cTnI concentrations in dogs with pre-capillary pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol* 2011; 13: 171-82.

Kittleson MD. Myxomatous Atrioventricular Valvular Degeneration. In: *Small Animal Cardiovascular Medicine*. M.D. K, RD K, eds.: Mosby, Inc. 1998: 95 -

117.

Kizilbash AM, Willett DL, Brickner ME, Heinle SK, Grayburn PA. Effects of afterload reduction on vena contracta width in mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 427-31.

Knowlen GG, Kittleson MD, Nachreiner RF, Eyster GE. Comparison of plasma aldosterone concentration among clinical status groups of dogs with chronic heart failure. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 183: 991-6.

Kogure K. Pathology of chronic mitral valvular disease in the dog. *Nippon Juigaku Zasshi* 1980; 42: 323-35.

Krauser DG, Lloyd-Jones DM, Chae CU, Cameron R, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen A, Tung R, Januzzi JL, Jr. Effect of body mass index on natriuretic peptide levels in patients with acute congestive heart failure: a ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) substudy. *Am Heart J* 2005; 149: 744-50.

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: S71-9.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18: 1440-63.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John Sutton M, Stewart W. Recommendations for chamber quantification. *Eur J*

Echocardiogr 2006; 7: 79-108.

Leach S, Fine DM, Durham HE. Effect of gender status on NT-prohormone brain natriuretic peptide levels in dogs. [Abstract]. J of Vet Intern Med 2008; 22: 756-7.

Lee JA, Herndon WE, Rishniw M. The effect of noncardiac disease on plasma brain natriuretic peptide concentration in dogs. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2011; 21: 5-12.

Lesniak-Sobelga A, Olszowska M, Pienazek P, Podolec P, Tracz W. Vena contracta width as a simple method of assessing mitral valve regurgitation. Comparison with Doppler quantitative methods. J Heart Valve Dis 2004; 13: 608-14.

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

Ljungvall I, Hoglund K, Tidholm A, Olsen LH, Borgarelli M, Venge P, Haggstrom J. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. J Vet Intern Med 2010; 24: 153-9.

Logeart D, Thabut G, Jourdain P, Chavelas C, Beyne P, Beauvais F, Bouvier E, Solal AC. Pre-discharge B-type natriuretic peptide assay for identifying patients at high risk of re-admission after decompensated heart failure. J Am Coll Cardiol 2004; 43: 635-41.

Lord P, Hansson K, Kvart C, Haggstrom J. Rate of change of heart size before congestive heart failure in dogs with mitral regurgitation. J Small Anim Pract 2010; 51: 210-8.

Luchner A, Hengstenberg C, Lowel H, Riegger GA, Schunkert H, Holmer S.

Effect of compensated renal dysfunction on approved heart failure markers: direct comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP. *Hypertension* 2005; 46: 118-23.

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.

Madsen MB, Olsen LH, Haggstrom J, Hoglund K, Ljungvall I, Falk T, Wess G, Stephenson H, Dukes-McEwan J, Chetboul V, Gouni V, Proschowsky HF, Cirera S, Karlskov-Mortensen P, Fredholm M. Identification of 2 loci associated with development of myxomatous mitral valve disease in Cavalier King Charles Spaniels. *J Hered* 2011; 102 Suppl 1: S62-7.

Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Kinoshita M. High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1587-93.

Maffei S, Del Ry S, Prontera C, Clerico A. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Clin Sci (Lond)* 2001; 101: 447-53.

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. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 2002; 347: 161-7.

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

Mascherbauer J, Rosenhek R, Bittner B, Binder J, Simon P, Maurer G, Schima H,

Baumgartner H. Doppler echocardiographic assessment of valvular regurgitation severity by measurement of the vena contracta: an in vitro validation study. *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18: 999-1006.

McCullough PA, Sandberg KR. B-type natriuretic peptide and renal disease. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 355-8.

Moesgaard SG, Pedersen LG, Teerlink T, Haggstrom J, Pedersen HD. Neurohormonal and circulatory effects of short-term treatment with enalapril and quinapril in dogs with asymptomatic mitral regurgitation. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 712-9.

Moesgaard SG, Falk T, Teerlink T, Guethmundsdottir HH, Sigurethardottir S, Rasmussen CE, Olsen LH. Brain-natriuretic peptide and cyclic guanosine monophosphate as biomarkers of myxomatous mitral valve disease in dogs. *Vet J* 2010;

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.

Mow T, Pedersen HD. Increased endothelin-receptor density in myxomatous canine mitral valve leaflets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 254-60.

Mueller C, Scholer A, Laule-Kilian K, Martina B, Schindler C, Buser P, Pfisterer M, Perruchoud AP. Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *N Engl J Med* 2004; 350: 647-54.

Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995; 96: 1280-7.

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

O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, O'Loughlin C, Lange S, Conlon C, Phelan D, Cunningham S, McDonald K. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J Card Fail* 2007; 13: 50-5.

Obayashi K, Miyagawa-Tomita S, Matsumoto H, Koyama H, Nakanishi T, Hirose H. Effects of transforming growth factor-beta3 and matrix metalloproteinase-3 on the pathogenesis of chronic mitral valvular disease in dogs. *Am J Vet Res* 2011; 72: 194-202.

Olsen LH, Fredholm M, Pedersen HD. Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 448-56.

Olsen LH, Martinussen T, Pedersen HD. Early echocardiographic predictors of myxomatous mitral valve disease in dachshunds. *Vet Rec* 2003; 152: 293-7.

Oyama MA. Advances in echocardiography. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 1083-104, v.

Oyama MA, Chittur SV. Genomic expression patterns of mitral valve tissues from dogs with degenerative mitral valve disease. *Am J Vet Res* 2006; 67: 1307-18.

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.

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, Levy RJ. Insights into Serotonin Signaling Mechanisms Associated with Canine Degenerative Mitral Valve Disease. *J Vet Intern Med* 2009;

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.

Pape LA, Price JM, Alpert JS, Ockene IS, Weiner BH. Relation of left atrial size to pulmonary capillary wedge pressure in severe mitral regurgitation. *Cardiology* 1991; 78: 297-303.

Pedersen HD, Kristensen B, Norby B, Lorentzen KA. Echocardiographic study of mitral valve prolapse in dachshunds. *Zentralbl Veterinarmed A* 1996; 43: 103-10.

Pedersen HD, Lorentzen KA, Kristensen BO. Echocardiographic mitral valve prolapse in cavalier King Charles spaniels: epidemiology and prognostic significance for regurgitation. *Vet Rec* 1999; 144: 315-20.

Phua J, Lim TK, Lee KH. B-type natriuretic peptide: issues for the intensivist and pulmonologist. *Crit Care Med* 2005; 33: 2094-13.

Pomerance A, Whitney JC. Heart valve changes common to man and dog: a comparative study. *Cardiovasc Res* 1970; 4: 61-6.

Porter JG, Arfsten A, Palisi T, Scarborough RM, Lewicki JA, Seilhamer JJ. Cloning of a cDNA encoding porcine brain natriuretic peptide. *J Biol Chem* 1989; 264: 6689-92.

Primus FJ, Kelley EA, Hansen HJ, Goldenberg DM. "Sandwich"-type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. *Clin Chem* 1988; 34: 261-4.

Rabkin E, Aikawa M, Stone JR, Fukumoto Y, Libby P, Schoen FJ. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation* 2001; 104: 2525-32.

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.

Reynolds CA, Brown DC, Rush JE, Fox PR, Nguyenba TP, Lehmkuhl LB, Gordon SG, Kellihan HB, Stepien RL, Lefbom BK, Meier CK, Oyama MA. Prediction of first onset of congestive heart failure in dogs with degenerative mitral valve disease: the PREDICT cohort study. *J Vet Cardiol* 2012; 14: 193-202.

Richards AM, McDonald D, Fitzpatrick MA, Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Jans S, Grant S, Yandle T. Atrial natriuretic hormone has biological effects in man at physiological plasma concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 1134-9.

Rishniw M, Erb HN. Evaluation of four 2-dimensional echocardiographic methods of assessing left atrial size in dogs. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 429-35.

Rudiger A, Gasser S, Fischler M, Hornemann T, von Eckardstein A, Maggiorini M. Comparable increase of B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure. *Crit Care Med* 2006; 34: 2140-4.

Saito Y, Nakao K, Arai H, Nishimura K, Okumura K, Obata K, Takemura G, Fujiwara H, Sugawara A, Yamada T, et al. Augmented expression of atrial natriuretic polypeptide gene in ventricle of human failing heart. *J Clin Invest* 1989; 83: 298-305.

Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2: 358-67.

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: S81-6.

Schober KE, Baade H. Comparability of left ventricular M-mode echocardiography in dogs performed in long-axis and short-axis. *Vet Radiol Ultrasound* 2000; 41: 543-9.

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.

Schwartz DS, Melo PRR, Mazini AM, de Oliviera VMC, Goldfeder GT, Azedo MR. NT-proBNP in obese dogs [Abstract]

J of Vet Intern Med 2011; 25: 655-6.

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.

Serfass P, Chetboul V, Sampedrano CC, Nicolle A, Benalloul T, Laforge H, Gau C, Hebert C, Pouchelon JL, Tissier R. Retrospective study of 942 small-sized dogs: Prevalence of left apical systolic heart murmur and left-sided heart failure, critical effects of breed and sex. *J Vet Cardiol* 2006; 8: 11-8.

Serres F, Chetboul V, Tissier R, Sampedrano CC, Gouni V, Nicolle AP, Pouchelon JL. Chordae tendineae rupture in dogs with degenerative mitral valve disease: prevalence, survival, and prognostic factors (114 cases, 2001-2006). *J Vet Intern Med* 2007; 21: 258-64.

Serres F, Chetboul V, Tissier R, Poujol L, Gouni V, Carlos Sampedrano C, Pouchelon JL. Comparison of 3 ultrasound methods for quantifying left ventricular systolic function: correlation with disease severity and prognostic value in dogs with mitral valve disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 566-77.

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.

Simpson IA, Shiota T, Gharib M, Sahn DJ. Current status of flow convergence for clinical applications: is it a leaning tower of "PISA"? *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 504-9.

Sisson DD. Plasma levels of ANP, BNP, epinephrine, norepinephrine, serum aldosterone, and plasma renin activity in healthy cats and cats with myocardial disease [abstract]. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 438.

Solter PF, Oyama MA, Sisson DD. Canine heterophilic antibodies as a source of

false-positive B-type natriuretic peptide sandwich ELISA results. *Vet Clin Pathol* 2008; 37: 86-95.

Stanek B, Frey B, Hulsmann M, Berger R, Sturm B, Strametz-Juranek J, Bergler-Klein J, Moser P, Bojic A, Hartter E, Pacher R. Prognostic evaluation of neurohumoral plasma levels before and during beta-blocker therapy in advanced left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 436-42.

Strickland KN. Pathophysiology and therapy of heart failure. In: *Manual of Canine and Feline Cardiology*. Tilley LP, Smith FWK, Oyama MA, Sleeper MM, eds. St. Louis: WB Saunders 2008: 288-314.

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

Sutton TM, Stewart RA, Gerber IL, West TM, Richards AM, Yandle TG, Kerr AJ. Plasma natriuretic peptide levels increase with symptoms and severity of mitral regurgitation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2280-7.

Swenson L, Haggstrom J, Kwart C, Juneja RK. Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208: 2009-12.

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.

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.

Tarnow I, Olsen LH, Kwart C, Hoglund K, Moesgaard SG, Kamstrup TS,

Pedersen HD, Haggstrom J. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Vet J* 2009; 180: 195-201.

Thomas L, Foster E, Hoffman JI, Schiller NB. The Mitral Regurgitation Index: an echocardiographic guide to severity. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 2016-22.

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.

Thrusfield MV, Aitken CGG, Darker PGG. Observations on breed and sex in relation to canine heart valve incompetence. *Journal of Small Animal Practice* 1985; 26: 709-17.

Tokushima T, Reid CL, Hata A, Gardin JM. Simple method for estimating regurgitant volume with use of a single radius for measuring proximal isovelocity surface area: an in vitro study of simulated mitral regurgitation. *J Am Soc Echocardiogr* 2001; 14: 104-13.

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.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Mabuchi N, Hayashi M, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Horie H, Sugimoto Y, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide level as a biochemical marker of morbidity and mortality in patients with asymptomatic or minimally symptomatic left ventricular dysfunction. Comparison with plasma angiotensin II and endothelin-1. *Eur Heart J* 1999; 20: 1799-807.

Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 261-8.

Vesely DL, Norris JS, Walters JM, Jespersen RR, Baeyens DA. Atrial natriuretic prohormone peptides 1-30, 31-67, and 79-98 vasodilate the aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 1540-8.

Vesely DL. Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F167-77.

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.

Wallen T, Landahl S, Hedner T, Hedner J, Hall C. Atrial peptides, ANP(1-98) and ANP(99-126) in health and disease in an elderly population. *Eur Heart J* 1993; 14: 1508-13.

Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PW, Vasan RS. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2004; 109: 594-600.

Weidmann P, Hasler L, Gnadinger 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 Invest* 1986; 77: 734-42.

Weir ML, Honrath U, Flynn TG, Sonnenberg H. Lack of biologic activity or specific binding of amino-terminal pro-ANP segments in the rat. *Regul Pept* 1994; 53: 111-22.

Wess G, Maurer J, Simak J, Hartmann K. Use of Simpson's Method of Disc to Detect Early Echocardiographic Changes in Doberman Pinschers with Dilated Cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 1069-76.

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.

Winters CJ, Sallman AL, Meadows J, Rico DM, Vesely DL. Two new hormones: prohormone atrial natriuretic peptides 1-30 and 31-67 circulate in man. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 150: 231-6.

Winters CJ, Sallman AL, Baker BJ, Meadows J, Rico DM, Vesely DL. The N-terminus and a 4,000-MW peptide from the midportion of the N-terminus of the atrial natriuretic factor prohormone each circulate in humans and increase in congestive heart failure. *Circulation* 1989; 80: 438-49.

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.

Zoghbi WA, Enriquez-Sarano M, Foster E, Grayburn PA, Kraft CD, Levine RA, Nihoyannopoulos P, Otto CM, Quinones MA, Rakowski H, Stewart WJ, Waggoner A, Weissman NJ. Recommendations for evaluation of the severity of native valvular regurgitation with two-dimensional and Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2003; 16: 777-802.

IX. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Privatdozent Dr. Gerhard Wess, meinem Doktorvater und Betreuer, für seine geduldige Unterstützung und Motivierung, vor allem beim Anfertigen der Publikationen. Und natürlich für die exzellente wissenschaftliche und praktische Ausbildung in der Kardiologie.

Vielen Dank meinen Eltern und meiner Schwester, die während der gesamten Zeit immer für mich da waren und mich seelisch-moralisch unterstützt haben.

Und natürlich möchte ich dem besten Team der Welt danken. Danke an unsere Residents (jetzt Diplomates) Lisa und Julia, die sich immer Zeit genommen haben und bereitwillig ihr Wissen geteilt haben. Danke an meine Doktorandenkolleginnen Anja, Nina, Alex, Elli, Claudia, Carola und Nadine, wir haben immer zusammen gehalten und hatten trotz einiger harter Arbeitstage jede Menge Spaß.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der MTK, die mir so bereitwillig ihre Hunde als Studienteilnehmer zur Verfügung gestellt haben:

Und zuletzt danke an Anjas Oma, die mit ihrer etwas anderen kulinarischen Verpflegung für den Erhalt meines Seelenheils während mancher Krisen beigetragen hat.