

Klinik für Kleintierchirurgie
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. Pierre M. Montavon)

Arbeit unter der Leitung von Dr. med. vet. Diplomate ECVS Daniel Koch

Zeitlicher Verlauf von Vascular Endothelial Growth Factor und Erythropoietin nach kurzer physischer
Belastung und bei meso- und brachycephalen Hunden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Judith Wenk

Tierärztin von Ebnet-Kappel / SG

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. Pierre M. Montavon, Referent
Prof. Dr. Max Gassmann, Korreferent

Zürich 2004

1.	Einleitung	6
2.	Literaturübersicht	7
2.1	Das brachycephale Syndrom beim Hund	7
2.1.1	Prädisposition	7
2.1.2	Anatomie und Physiologie der Atemwege im Kopfbereich	9
2.1.3	Pathophysiologische Mechanismen	10
2.1.3.1	Effekte auf die oberen Atemwege	10
2.1.3.2	Inspiratorischer Stridor	11
2.1.3.3	Effekte auf die unteren Atemwege und andere Strukturen	11
2.1.3.4	Kompensationsmechanismen	12
2.1.3.5	Dolicho- und mesocephale Hunderassen mit Brachycephalensyndrom	12
2.1.4	Klinik	13
2.1.5	Klinische Untersuchung und Diagnose	13
2.1.6	Therapien	14
2.2	Hypoxie	15
2.2.1	Physiologische Reaktionen auf eine Hypoxie	15
2.2.2	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)	16
2.2.3	Erythropoietin	17
2.3	Hypothesen	19
3.	Material und Methodik	20
3.1	Tiere	20
3.2	Methodik	21
3.2.1	Belastungsprobe, Blutentnahmen, Verarbeitung der Blutproben	21
3.2.2	Bestimmung der VEGF-Werte	22
3.2.3	Bestimmung der EPO-Werte	22
3.3	Statistische Methoden	23
4.	Resultate	24
4.1	Klinische Beurteilung der Hunde	24
4.2	VEGF-Werte	25
4.2.1	VEGF-Werte der mesocephalen Hunde (MC)	25
4.2.2	VEGF-Werte der brachycephalen Hunde (BC)	28
4.2.3	Vergleich des VEGF-Levels der MC-Gruppe und der BC-Gruppe	28
4.3	EPO-Werte	30
4.3.1	EPO-Werte der mesocephale Hunde (MC)	30
4.3.2	EPO-Werte der brachycephalen Hunde (BC)	30
4.3.3	Vergleich des EPO-Levels der MC-Gruppe und der BC-Gruppe	31
5.	Diskussion	32
5.1	Diskussion der Methodik	32
5.2	Diskussion der Resultate	34
5.2.1	VEGF	34
5.2.2	EPO	35
5.2.3	Diskussion der Laborwerte	35
5.3	Schlussfolgerungen	36
6.	Literaturverzeichnis	37
7.	Danksagung	42

Meinen lieben Eltern

Zusammenfassung

Brachycephale Hunde zeigen oft Symptome des Brachycephalensyndromes. Aufgrund einer Fehlentwicklung des Hirn- und Gesichtsschädels verkleinert sich der kraniofaziale Winkel. Die Folge sind enge Nasenlöcher, ein langes Gaumensegel, ein eingeeengter Nasopharynx sowie Oedematisierung und Hypertrophie der Schleimhäute, Tonsillen und Larynxtaschen. Die Verengung der oberen Atemwege führt während der Inspiration zu einem erhöhten Unterdruck, der die Kollapstendenz der Weichteile verstärkt. Die Symptome werden durch einen Circulus vitiosus aufrecht erhalten und können sich progressiv verstärken, so dass sie je nach Ausmass der Obstruktion zu Dyspnoe bei Anstrengung, Stressintoleranz und Erstickungstod führen können. Der Körper reagiert auf eine Hypoxie mit verschiedenen Kompensationsmechanismen. Auf molekularer Ebene wird eine Kaskade von Stoffen freigesetzt, die den Sauerstoffgehalt im Blut und im Gewebe aufrecht erhalten sollen. Das Signal bei Hypoxie geht vom Hypoxie induzierbaren Faktor-1 (HIF-1) aus, der die Freisetzung von Transferrin, Endothelin-1, vaskulärem endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) und Erythropoietin (EPO) induziert. VEGF ist ein Faktor mit spezifischer Wirkung auf Endothelzellen und wird benötigt für die normale embryonale Entwicklung von Gefässen, für die Bildung von Kapillaren und das Wachstum von Tumoren. EPO wird bei arteriellem Sauerstoffmangel in den Nieren gebildet und wird zur Erythropoiese benötigt.

Das Ziel der Arbeit war die Sauerstoffversorgung bei brachycephalen Hunden unter Belastung objektiv zu beurteilen aufgrund der Quantifizierung von VEGF und EPO im Blutserum. Es wurden acht mesocephale (MC) und acht brachycephale (BC) Hunde während einem kurzen Trab belastet. Vor und nach Belastung wurden Blutproben entnommen, zur Messung der VEGF- und EPO-Serumkonzentrationen. Die VEGF-Basalwerte unterschieden sich weder innerhalb derselben Gruppen noch zwischen den verschiedenen Gruppen signifikant voneinander. Der Anstieg der VEGF-Werte nach 4 Stunden war bei der BC-Gruppe hochsignifikant. Bei der MC-Gruppe war zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Bei den EPO-Werten waren nur die Basalwerte unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen, wobei erstaunlicherweise die Basalwerte der MC-Gruppe signifikant höher lagen als die der BC-Gruppe.

Mit der Bestimmung von VEGF vor und 4 Stunden nach kurzzeitiger Belastung konnte ein Ansatz geschaffen werden, mit dem einfach und unter Praxisbedingungen objektiv die Sauerstoffsättigung bei brachycephalen Hunden unter Belastung und der Erfolg operativer Korrekturen beurteilt werden könnte. Im gleichem Sinne könnte der Test auch für Patienten mit anderen chronischen Atemwegserkrankungen eingesetzt werden.

Summary

Brachycephalic dogs often suffer from the brachycephalic syndrom. A dysplasia of the brain and face skull leads to a too small craniofacial angle. This results in narrow nostrils, a prolonged soft palate, a narrowed nasopharynx, edematous and hypertrophic mucus membranes, tonsilles and everted lateral saccules of the larynx. The narrowing of the upper airways increases the negativ inspiration pressure, which enforces the tendency of the soft tissue to collapse. A circulus vitiosus increases the symptoms progressivly. Depending on the degree of obstruction the dogs show dyspnea during effort, intolerance to stress and heat and death through suffocation. There are different mechanisms of the body to react to hypoxia. On the molecular level a cascade of enzymes regulates the oxygen saturation of blood and tissue. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) induces the release from transferrin, endothelin-1, vascular endothelial growth factor and erythropoietin (EPO). VEGF is a factor with specific effect to endothelial cells and is needed for the normal embryonal development of vessels and the growing of capillaries and tumors. EPO is produced in the kidneys as a result of hypoxia and is needed for the erythropoesis.

The goal of this study was to estimate the tissue oxygen saturation of brachycephalic dogs objectively with the measurement of blood serum VEGF and EPO. Eight mesaticephalic (MC) and eight brachycephalic (BC) dogs were undergone a short tort. Serum VEGF and EPO levels were measured before and after the physical exercise. Basal VEGF levels did neither differ significantly between the same group nor between the different groups. In the brachycephalic group the increase from the basal level to the 4 hours level was significantly different from the 0 hour level and from the mesaticephalic group. Basal EPO values were higher in the MC group than in the BC group.

With the measurement of the VEGF values before and 4 hours after a short physical examination we have an instrument to estimate the oxygen saturation and the success of surgically correction objectively in brachycephalic dogs. The test is practicable and may be also usable for patients with other chronic diseases of the airways.

1. Einleitung

Brachycephale Hunde können aufgrund ihrer besonderen Kopfform am sogenannten Brachycephalensyndrom (BCS) leiden. Das BCS entsteht nach übereinstimmenden Literaturangaben (Knecht 1979; Harvey 1982b; Aron und Crowe 1985; Wykes 1991; Hobson 1995; Lorinson *et al.* 1997; Montavon 2000) durch eine Stenose in den oberen Atemwegen. Die charakteristische Kopfform von brachycephalen Hunden ist das Resultat einer Fehlentwicklung der knöchernen Strukturen der Schädelbasis, einer lokalen Chondrodysplasie. Die frühe Ankylosierung der Schädelbasis führt zu einer Verkürzung der Schädellängsachse, was zu einer gehemmten Entwicklung und einer Rotation des Hirnschädels führt. Dies führt zu einer Einengung des gesamten Gesichtsschädels. Diese Veränderung wird dokumentiert durch den engeren kraniofazialen Winkel bei brachycephalen Hunden und wird als die primäre Ursache des BCS gesehen (Regodon *et al.* 1993; Montavon 2000). Die aus dem unterentwickelten Gesichtsschädel resultierenden Veränderungen sind vor allem enge Nasenlöcher und ein zu langes Gaumensegel. Durch die Verengung wird der Patient zu verstärkter Atemarbeit gezwungen, um seinen Sauerstoffbedarf zu decken. Die verstärkte Atemarbeit äussert sich in einem verstärkten Unterdruck in den oberen Atemwegen. Diese können dadurch weiter kollabieren und sich mit der Zeit plastisch deformieren. Es entstehen so die sekundären Veränderungen beim BCS, wie evertierte Larynxtaschen, entzündete Tonsillen, Hyperplasie der Rachenschleimhaut oder Larynxkollaps. Diese verschlimmern das BCS und erschweren die kompensatorischen Mechanismen des Respirationstraktes. Schlussendlich kann der Patient bei geringer Belastung in Atemnot gelangen, was sich klinisch von Leistungsintoleranz bis zu Erstickungsanfällen äussern kann.

Die Beurteilungen der oberen Atemwege bei brachycephalen Hunden und die Leistungseinschränkung sind aus verschiedenen Gründen interessant. Die Pathophysiologie des BCS ist bis heute nicht restlos geklärt. Interessanterweise gibt es auch Berichte über das BCS bei Hunden mit mesocephaler Kopfform (Wilson *et al.* 1960; Montavon 2000) und Reihenuntersuchungen bei Norwich-Terriern (Rosaspina 2003), welche nahe legen, dass die Pathogenese nicht allein mit der Verkürzung des Gesichtsschädels zu tun haben muss. Die Beurteilung der oberen Atemwege geschieht mittels klinischer und radiologischer Untersuchung. Dabei wird die Anatomie beurteilt. Ein Parameter zur Erfassung der Atemwegsbeeinträchtigung fehlt. Prognosestellungen sind nur eingeschränkt möglich und Therapieerfolge sind nicht zuverlässig zu messen. Schlussendlich verlangen nicht zuletzt die Rasseclubs griffige Methoden und objektive Daten, um die Züchtungsrichtungen festlegen zu können.

Im Rahmen eines Gesamtprojektes über das BCS werden verschiedene Methoden zur Aufklärung der Pathogenese, zur objektiven Beurteilung der oberen Atemwege und des klinischen Zustandes der Hunde untersucht. Dazu gehören auch klinisch anwendbare, einfache, indirekte Techniken zur Objektivierung der Hypoxie bei brachycephalen Hunden unter Belastung. Die zelluläre Antwort auf Hypoxie ist vielfältig und kann unter anderem durch Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Erythropoietin (EPO) gemessen werden (Gassmann 2001).

Ziele der vorliegenden Arbeit waren deshalb:

1. Entwicklung einer einfachen Methode, mit welcher eine kurzzeitige Hypoxie diagnostiziert werden kann
2. Etablierung von molekularen Kriterien zur Unterscheidung von Hunden mit und ohne Brachycephalensyndrom

2. Literaturübersicht

2.1 Das brachycephale Syndrom beim Hund

Das Brachycephalensyndrom beim Hund ist ein Krankheitsbild, dem primär und sekundär anatomische und daraus folgende funktionelle Abnormalitäten der oberen Atemwege zugrunde liegen. Die Fehlentwicklung des Gesichtsschädels und der daraus resultierende verkleinerte kraniofaziale Winkel führen zu klinischen Erscheinungen wie stenotische Nasenlöcher, ein zu langes Gaumensegel, entzündete Tonsillen, ödematisierte Schleimhäute, evertierte Larynxtaschen, eine verengte Stimmritze, Larynxkollaps (Orsher 1993) und Trachealkollaps (Aron und Crowe 1985). Die Symptome reichen von schnarchenden Atemgeräuschen bis hin zur lebensbedrohlichen Hypoxie, die durch schwere Dyspnoe bedingt ist (Orsher 1993).

2.1.1 Prädisposition

Die Brachycephalie ist Ausdruck einer lokalen Chondrodysplasie, die zu einer zu frühen Ankylosierung der Schädelbasis und somit zu einer gehemmten Entwicklung und Rotation des Hirnschädels führt. In der Folge wird nun auch die Entwicklung des Gesichtsschädels gestört. Das Resultat ist eine Verengung des kraniofazialen Winkels und eine Verkürzung des gesamten Gesichtsschädels. Die gesamten Erscheinungen wie ein rundlicher Schädel, ein kurzes Gesicht, enge Nasenlöcher, hervorgerufen durch eine zu kurze, verdickte und nach medial verlagerte Knorpelplatte, ein zu langes Gaumensegel und ein eingeeengter Nasopharynx sind Folgen dieser Fehlentwicklung (Regodon *et al.* 1993; Montavon 2000). Tierzüchter haben diese Veränderungen als sogenannte Domestikationsmutation bewusst erhalten und als Rassemerkmal weiter gezüchtet (Dahme 1988; Evans 1993).

Allgemein werden die Kopftypen von Hunden in brachy-, meso- und dolichocephal eingeteilt, was aber von verschiedenen Autoren unterschiedlich interpretiert wird. Eine Möglichkeit ist die Messung des kraniofazialen Winkels zwischen der Schädelbasis und dem Gesichtsschädel (Verlängerung der Achse entlang dem harten Gaumen). Brachycephale Hunde zeigen einen Kraniofazialwinkel von 19° und weniger, während mesocephale Rassen einen Winkel von 19 bis 21° und dolichocephale Rassen einen Winkel von 25 bis 26° haben (Regodon *et al.* 1993; Montavon 2000). Eine andere Möglichkeit ist die Einteilung aufgrund des Verhältnisses von Schädellänge zu Schädelbreite. Die Schädellänge gibt die Entfernung von der Protuberantia occipitalis externa bis zum Alveolarrand des Os incisivum, Prosthion, an. Als Schädelbreite wird die Entfernung von einem Jochbogen zum andern gemessen. Hiernach ergibt sich bei dolicho- und mesocephalen Rassen einen Index von 1.44 bis 1.93 und für brachycephale Rassen einen Index von 1.01 bis 1.33. Benützt man diese Einteilung, so gehört zum Beispiel auch der Boxer mit einem Verhältnis von 1.27 zur brachycephalen Rasse (Evans 1993).

Deutsche Autoren (Nickel *et al.* 1984; Brehm *et al.* 1985) basieren die Einteilung auf dem Verhältnis von Hirnschädellänge zu Nasenschädellänge, wobei die Grenze zwischen dem Os nasale und dem Os temporale gesetzt wird (Evans 1993). Dabei haben dolicho- und mesocephale Rassen einen Längen-Längen-Index von 0.80 bis 0.98 und brachycephale Rassen 1.60 bis 3.44. Dieser Einteilung nach gehört der Boxer mit einem Index von 1.25 nicht zu den brachycephalen Hunden. Bei all diesen

verschiedenen Methoden können allerdings die Indizes innerhalb der selben Rasse stark schwanken (Brehm *et al.* 1985) (Abbildung 1).

Somit gehören je nach Einteilungsmethode folgende Vertreter zu den brachycephalen Hunderassen: Chihuahua, Französische Bulldogge, King Charles Spaniel, Malteser, Pekingese, Rehpinscher, Shi Tzu und Yorkshire Terrier und Boxer. Diese Rassen können infolge ihrer Kopfform nicht nur an Atemwegsproblemen leiden, sondern zeigen auch Prädisposition zu Hydrocephalus, Fazialislähmung, Hautirritationen, Fehlstellungen der Zähne oder vergrößertem 3. und 4. Hirnventrikel und Fallotscher Tetralogie (Toombs und Hardy 1981; Willemse 1991; Hardie *et al.* 1998; Verhaert 2001). Bulldoggen, aber in kleinerem Ausmass auch andere brachycephale Rassen, zeigen eine besondere Prädisposition zu einer hypoplastischen Trachea. Das Verhältnis von Tracheainnendurchmesser zu Thoraxtiefe im laterolateralen Röntgenbild ist bei Bulldoggen signifikant kleiner als bei brachycephalen Nichtbulldoggen und bei diesen signifikant kleiner als bei nichtbrachycephalen Hunden (Coolman *et al.* 1998).

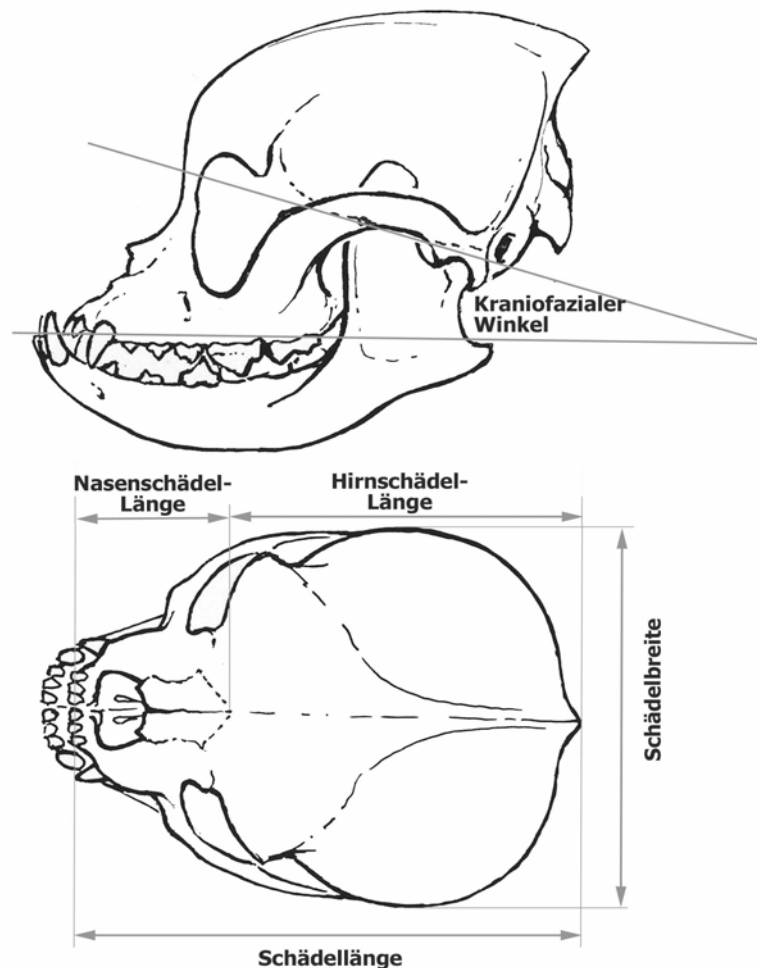


Abbildung 1: Darstellung des kraniofazialen Winkels, der Hirnschädel-, Nasenschädel-, Gesamtschädel- und Schädelbreite am Beispiel eines brachycephalen Hundes.

2.1.2 Anatomie und Physiologie der Atemwege im Kopfbereich

Die eingeatmete Luft durch die Nasenlöcher gelangt zuerst in die Nasenhöhle, die kaudal bis zu den Choanen reicht. Die Nasenhöhle ist mit Nasen- bzw. Siebbeinmuscheln angefüllt, so dass die dazwischen liegenden Gänge relativ eng sind. Nur der kaudale und dorsale Teil der Nasenhöhle sind verknöchert. Der rostrale Teil besteht aus Knorpel, eine wichtige Voraussetzung für die Beweglichkeit der Nasenspitze. In der rostralen Hälfte liegen die dorsale und ventrale Nasenmuschel. Letztere wird gegen das Siebbein hin breiter und geht nach rostral in die Plica alaris über, die mit blasiger Auftreibung endet. Bei manchen brachycephalen Hunden wird diese so gross, dass sie die Atmung behindern können. Dort, wo die Plica alaris auf den Boden des Nasenvorhofes trifft, mündet der Ductus nasolacrimalis. Der Ausführungsgang der Glandula nasalis lateralis mündet kaudal der Öffnung des Tränenganges an der Lateralwand dorsal der Plica alaris und ist verantwortlich für die Befeuchtung des Nasenspiegels.

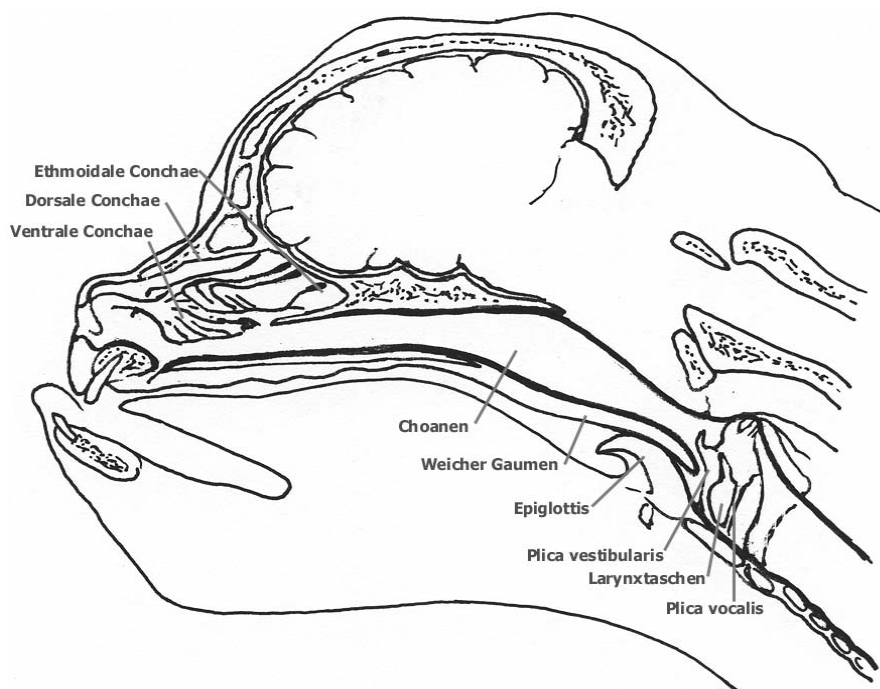


Abbildung 2: Schädel-Längsschnitt eines brachycephalen Hundes

Die kaudale Hälfte der Nasenhöhle ist mit den Conchae ethmoidales, den Siebbeinmuscheln gefüllt, die mit Riechschleimhaut bedeckt sind. Die ventrale Conchae ist kurz und dick, entsteht aus der Maxilla und spaltet sich in viele nach oben und unten eingerollte Lamellen, den Endoturbinalia. Diese vergrößern die Oberfläche der stark vaskularisierten Riechschleimhaut, was den ausgeprägten Geruchssinn der Hunde erklärt.

Die einströmende Luft wird geteilt und fließt teils durch die dorsalen, medialen und ventralen Nasengänge, Meatus, die zum Septum nasi hin mit dem gemeinsamen Nasengang, Meatus communis, kommunizieren. Der dorsale Nasengang führt zum Grund der Nasenhöhle und führt die Luft zur Riechschleimhaut. Der mittlere Nasengang enthält die Zugänge zum Sinussystem. Der

Hauptluftweg wird vom ventralen Nasengang gebildet und führt zum Nasopharynx, wo sich der Luftweg von der Nase und von der Mundhöhle treffen.

Die Aufgaben der Nasenhöhle sind also die Erfüllung der Riechfunktion, Befeuchtung der Einatemungsluft durch Verdunstung von Tränenflüssigkeit und serösen Nasensekreten, Erwärmung an der gefässreichen Schleimhaut und Reinigung durch Kontakt mit Sekret der Schleimhautdrüsen. Das Flimmerepithel befördert die Staubpartikel mit Flimmerschlägen Richtung Pharynx, wo sie abgeschluckt werden.

Nasen- und Maulhöhle werden vom Palatum getrennt. Der Übergang von hartem zu weichem Gaumen befindet sich bei dolicho- und mesocephalen Rassen kaudal des letzten Molars, bei brachycephalen Rassen weiter kaudal. Der weiche Gaumen reicht normalerweise genau bis zur Spitze der Epiglottis.

Die Seitenränder der spitz auslaufenden Epiglottis sind kaudal über die Plica aryepiglottica mit den Arytaenoidknorpeln verbunden und bilden die lateralen Grenzen des Vestibulum laryngis. Die Plica beherbergen die grossen Processus cuneiformes der Arytaenoidknorpel. Das kaudale Ende des Vestibulums wird durch die Processus corniculati der Arytaenoidknorpel gebildet (Dahme 1988). Die Stimmfalten bilden den mittleren Teil des Larynx, auch Glottis genannt und sind wie die Arytaenoidknorpel gepaart (Evans 1993).

2.1.3 Pathophysiologische Mechanismen

Die Symptomatik und Klinik von brachycephalen Hunden lässt sich durch verschiedene pathophysiologische Mechanismen erklären. Grundsätzlich ist das Lumen der oberen Atemwege eingeengt, was zu einer erhöhten Atemarbeit führt, um letztlich genügend Sauerstoff zu erhalten wie nötig ist.

2.1.3.1 Effekte auf die oberen Atemwege

Der bis anhin primären Ursache für die Stenose der oberen Atemwege bei brachycephalen Hunden liegt der kraniofaziale Winkel, der kleiner als 19° misst aufgrund einer Fehlentwicklung des Schädels, wie oben beschrieben, zugrunde. Daraus resultieren die primären Erscheinungen wie ein rundlicher Schädel, eine kurze Nase, enge Nasenlöcher, ein eingeengter Nasopharynx und ein zu langes Gaumensegel (Regodon *et al.* 1993; Montavon 2000). Normalerweise reicht das Gaumensegel bis zum vorderen Rand der Epiglottis. Bei brachycephalen Hunden kann es aber bis mehrere Millimeter über den Epiglottisrand reichen. Das Gaumensegel kann im Luftstrom zu flattern beginnen, was zu einem für brachycephale Hunde typischem Atemgeräusch führt. Im Extremfall kann das Gaumensegel sogar über der Epiglottis hängen bleiben (Orsher, 1993). All diese stenotischen Veränderungen erhöhen also die Atemarbeit, um genügend Luft zu erhalten. Dadurch entsteht ein erhöhter inspiratorischer Unterdruck, der sofern er grösser ist als der Gewebewiderstand, die Weichteile ins Lumen zieht. Somit werden die Schleimhäute ödematös, die Tonsillen entzündet und die Larynxtaschen evertieren, was in einem Teufelskreis das Lumen noch mehr einengt und die

Symptomatik verstärkt. Durch Ermüdung der Strukturen können diese sogar kollabieren. Auch der Larynx kann einerseits durch den starken Unterdruck, andererseits durch den Verlust der Knorpelstützfunktion kollabieren. Der Larynxkollaps stellt eine Kombination dar von fortgeschrittener Schwellung der Weichteile, Hervortreten der Larynxtaschen und das Eintreten der Processus corniculati und cuneiformi ins Lumen. Dies führt zu einer drastisch verstärkten Symptomatik. Sogar die Trachea kann durch den starken inspiratorischen Unterdruck kollabieren, wobei sich die Veränderungen entweder nur auf den M. trachealis beschränken oder auch auf den Trachealknorpel ausgedehnt sein können. Dabei verliert der Knorpel seine Stützfunktion und wird oval anstatt ursprünglich kreisförmig (Jerram und Fossum 1997). Die Symptome äussern sich in inspiratorischer Dyspnoe, lebensbedrohlicher Hypoxie durch Erstickungsanfälle und Kollaps (Orsher 1993).

2.1.3.2 Inspiratorischer Stridor

Ein typisches, bei brachycephalen Hunden häufig zu hörendes Atemgeräusch, ist der inspiratorische Stridor. Dieser stellt allgemein, auch beim Menschen, häufig eine akute Situation infolge Entzündung oder Trauma dar. Bei stenosierenden Erkrankungen der extrathorakalen Luftwege ist der inspiratorische Stridor ein typisches Leitsymptom. Bei jeder Inspiration kommt es durch die Erweiterung des Thorax zu einer Druckabnahme gegenüber der Aussenwelt im Bereiche der Lunge und der Luftwege. Der dadurch erzeugte Luftstrom führt zu einer weiteren Druckverminderung (Gesetz von Bernoulli), was zur Engerstellung des Lumens im extrathorakalen Luftweg führt. Dadurch erhalten die Ränder eines stenosierenden Prozesses jene kritische Stellungsänderung, die zu einem Atemgeräusch führen, welches als inspiratorischen Stridor bezeichnet wird (Greusing und Grossenbacher 1986).

2.1.3.3 Effekte auf die unteren Atemwege und andere Strukturen

Die Verengung des Lumens in den oberen Atemwegen hat nicht nur Einfluss auf diese selbst, sondern auch auf die Lungenmechanik, Expirations- und Inspirationskurven und benachbarte Strukturen der luftleitenden Wege. So wird die Lungenmechanik durch chronische beidseitige Obstruktion der oberen Atemwege negativ beeinflusst. Durch die erhöhte Atemarbeit nehmen der pulmonale Widerstand, die funktionelle Residualkapazität und der endexpiratorische Intrapleuraldruck zu (Ohnishi *et al.* 1971). Die Inspirations- und Expirationskurven zeigen ihre Veränderung in Form einer Abflachung, wobei die Inspirationskurve relativ zur Expirationskurve infolge des starken inspiratorischen Unterdruckes abgeflacht ist (Amis und Kurpershoek 1986). Infolge häufiger Dyspnoe sieht man oft die typischen Zeichen einer oberen Atemwegsstenose, wie Aerophagie, Oesophagusdilatation, Magenblähung, Zwerchfellshochstand, gleitende Hiatushernien und Pylorusstenose (Montavon 2000). Bei brachycephalen Hunden werden auch oft mit Flüssigkeit gefüllte Bullae diagnostiziert ohne Zeichen auf Otitis media. Durch den erhöhten inspiratorischen Unterdruck können auch eine dicke Zunge und Schluckstörungen vorhanden sein. Auch neurologische Ausfälle (Venker-van Haagen 1992) und Bronchiektasien können gesehen werden (Montavon 2000).

2.1.3.4 Kompensationsmechanismen

Bei Atemnot stehen verschiedene Kompensationsmechanismen zur Verfügung, um die Sauerstoffversorgung aufrecht zu erhalten. Dies sind Tachypnoe, Erweitern der Nasenflügel bei der Inspiration (Evans 1993), Strecken des Halses, um Nasopharynx und Larynx zu dehnen und allenfalls das zu lange Gaumensegel unter die Epiglottis zu befördern. Falls das lange Gaumensegel über der Epiglottis hängen bleibt, legen sich die Hunde hin, wodurch das Gaumensegel neben die Epiglottis gleitet und sich befreit (Singleton 1962; Knecht 1979). Das Hecheln hilft den Hunden überschüssige Hitze abzugeben. Beim Hecheln wird in rascher Folge Luft über die Nase eingeatmet, dort beim Passieren der Conchae mit Feuchtigkeit beladen und übers Maul ausgeatmet. Die lateralen Nasendrüsen steigern dabei ihre Produktion (Schmidt-Nielsen *et al.* 1970). Unbekannterweise wehren sich die Hunde trotz massiver Obstruktion der oberen Atemwege lange gegen eine vollständige Maulatmung, obwohl diese eine rasche Optimierung der Sauerstoffversorgung bringen würde (Ohnishi *et al.* 1971). Weiter dienen zur Kompensation die Tachykardie und die Senkung des Nasenluftwegwiderstandes durch Vasokonstriktion der nasalen Blutgefäße und des nasalen Schwellkörpers (Ohnishi und Ogura 1969). Die Vasokonstriktion ist ein sympathischer Reflex, der mit dem Atemzentrum gekoppelt ist. Hyperkapnie löst den sympathischen Reflex aus und bewirkt eine markante Vasokonstriktion und somit Senkung des Nasenluftwegwiderstandes bei gleichzeitiger Erhöhung der Atemfrequenz (McCaffrey und Kern 1979). Eine milde bis moderate Hypoxie hingegen bewirken nur eine geringe Vasokonstriktion und der Nasenluftwegwiderstand wird kaum beeinflusst. Erst bei einer starken Hypoxie wird der Widerstand merklich gesenkt und die Atemfrequenz erhöht. Somit besteht zwischen dem Nasenluftwegwiderstand und der Atemfrequenz eine positive Korrelation (McCaffrey und Kern 1979).

Weiter wird der Nasenluftwegwiderstand auch beeinflusst durch Belastung und Medikamente wie z.B. Adrenalin, Phenylephrine, Dobutamin (Senkung des Widerstandes durch Vasokonstriktion) und Histamin (Erhöhung des Widerstandes und des Blutflusses) (Lung *et al.* 1984).

2.1.3.5 Dolicho- und mesocephale Hunderassen mit Brachycephalensyndrom

Den Überlegungen zur Pathophysiologie liegt zu Grunde, dass die Fehlentwicklung des Schädels und sowohl die verkürzte Nase als auch die Verengung im Nasopharynx der brachycephalen Rassen die Problemursachen darstellen. Nun gibt es aber unter den dolicho- und mesocephalen Rassen einige Vertreter wie zum Beispiel Golden Retriever, Spaniel, Dackel oder Norwich Terrier, welche eine dem Brachycephalensyndrom ähnliche Symptomatik entwickeln (Wilson *et al.* 1960; Rosaspina 2003). Dabei sind nur selten die Nüstern verengt. Hingegen werden oft zu lange Gaumensegel, evertierte Larynxtaschen und andere protruierte Weichteile im Pharynx beobachtet. Diese Hunde zeigen die gleichen klinischen Symptome wie die brachycephalen Hunde, nämlich inspiratorische Atemgeräusche, Leistungsabfall und Asphyxie im Schlaf (Rosaspina 2003). Es muss deshalb angenommen werden, dass die Länge der Nase, die Enge der Nasenlöcher oder die Verengung im Nasopharynx nicht die korrekten oder einzigen Ursachen des Brachycephalensyndromes sind. Es könnten auch Konformationsstörungen in den Conchae, veränderte Gesamtkopfformen (Regodon *et al.* 1993), Rigiditätsverluste von Knorpel oder Weichteile in den oberen Atemwegen, wie sie auch bei Kindern beschrieben sind (Greusing und Grossenbacher 1986) oder vaskuläre Besonderheiten (Ohnishi *et al.* 1971) die Ursache sein.

2.1.4 Klinik

Die Klinik ist abhängig von der Ausprägung der anatomischen Abnormalitäten und reicht von asymptomatisch bis hin zu lebensbedrohlicher Hypoxie durch Erstickungsanfälle. Durch die stenotischen Veränderungen in Nase und Nasopharynx entsteht der typische inspiratorische Stridor. Pfeifende oder schnarchende Atemgeräusche sind entweder nur im Schlaf, kurz nach dem Aufwachen oder aber auch im Wachzustand hörbar (Knecht 1979). Manche Tiere zeigen durch die vermehrte Weichteilmasse und das Erschlaffen der Muskulatur, die dann das Lumen verlegen, während des Schlafes auch eine Schlafapnoe von 4 bis 10 Sekunden, die mit derjenigen des Menschen vergleichbar ist (Wykes 1991). Weiter zeigen schwerere Fälle Dyspnoe, Husten, Tachypnoe, Erstickungsanfälle, Tachykardie, Hyperthermie, Belastungs- und Stressintoleranz (Amis und Kurpershoek 1986; Orsher 1993), eine respiratorische Azidose, Hypoxie, bei Abfall des PO_2 unter 60 mmHg auch Zyanose und Kollaps (Knecht 1979; Orsher 1993). Die Symptome werden durch warmes Klima erwartungsgemäss verstärkt (Orsher 1993).

2.1.5 Klinische Untersuchung und Diagnose

Wichtig bei der klinischen Untersuchung eines Tieres mit Dyspnoe ist das Vermeiden jeglichen Stresses und Manipulationen, die den Zustand des Patienten verschlechtern oder ihn sogar in Lebensgefahr bringen könnten (Wykes 1991). Oft muss der Patient zuerst gekühlt und oxygeniert werden, eventuell sogar sediert, bevor er klinisch untersucht werden kann. Wenn möglich sollte aber die klinische Untersuchung ohne Sedation erfolgen, da der Patient durch eine Sedation in Asphyxie geraten kann (Hobson 1995). Der Hund wird in ruhiger und kühler Umgebung gehalten, mit Sauerstoff versorgt und von Distanz wird Körperhaltung, Atemmuster, Atemfrequenz, Atemgeräusche und Bewusstseinszustand beurteilt. Darauf wird eine vorsichtige klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt.

Die spezielle Untersuchung des Atemtraktes beinhaltet Messung des Puls, sanfte Palpation von Hals und Thorax, Beurteilung der Schleimhäute, Auskultation von Herz und Atemtrakt und Inspektion der Nasenlöcher (Aron und Crowe 1985; Wykes 1991). Alle weiteren Untersuchungen, wie Röntgen und Endoskopie müssen unter Narkose und Sicherung der Atemwege durchgeführt werden. Vor der Anästhesie sollten Hämatologie- und Blutchemiewerte bestimmt werden (Aron und Crowe 1985; Wykes 1991; Hobson 1995). Venöse Blutgasproben geben Aufschluss über Blut-ph, HCO_2^- und pCO_2 -Werte. Weiter kann auch eine allfällige Hypoxie nachgewiesen werden mit arteriellem Blut, was sich aber ohne Sedation infolge mangelnder Kooperativität des Patienten als schwierig erweisen kann (Hobson 1995). Ist der Patient anästhesiert, sollten möglichst viele diagnostische und zugleich therapeutische Massnahmen in der gleichen Narkose erfolgen. In noch oberflächlicher Anästhesie werden mittels Laryngoskop der Oropharynx, das Gaumensegel und die Epiglottis beurteilt. Mit dem Laryngoskop wird die Epiglottis nach ventral gedrückt. Es werden die eventuell evertierten Larynxtaschen und die Stimmbänder sichtbar (Wykes 1991; Hobson 1995). Während Inspiration und Expiration werden die Bewegung der Rima glottidis, der Stimmbänder und der Arytaenoidknorpel beurteilt. Die Besichtigung des Innenlumens des Larynx und der Trachea erfolgt mittels Endoskopie in tiefer Narkose. Zum Schluss der Untersuchungen werden Thoraxröntgenbilder erstellt zur

Visualisierung von Veränderungen wie eine hypoplastische Trachea (Knecht 1979; Wykes 1991; Hobson 1995) oder Bronchiektasien (Montavon, 2000).

2.1.6 Therapien

Oftmals werden brachycephale Hunde als Notfälle mit Dyspnoe in die Klinik aufgenommen und Stabilisierungsmassnahmen sind als erste Massnahme nötig. Der Patient wird kühl gehalten, in einen O₂-Käfig verbracht oder es wird eine O₂-Nasensonde angesetzt. Eventuell ist eine Sedation und eine Behandlung mit Kortikosteroiden zur Abschwellung der ödematisierten Schleimhäuten notwendig. In schweren Fällen kann eine notfallmässige Intubation oder sogar eine temporäre Tracheotomie notwendig werden (Aron und Crowe, 1985).

Die Prämedikation erfolgt zum Beispiel mit einer Azepromazin-Butorphanol-Kombination (Aron und Crowe 1985; Hobson 1995) oder einer Midazolam- oder Diazepam-Butorphanol-Kombination (Aron und Crowe, 1985).. Bei starkem Speicheln kann eine Behandlung mit einem Anticholinergikum notwendig sein. Auch der Einsatz von Kortikosteroiden ist sinnvoll zur Verhinderung von Schleimhautödemen (Aron und Crowe 1985; Wykes 1991; Hobson 1995). Eine Präoxygenierung von zirka 5 Minuten ist zu empfehlen (Hobson 1995). Die Einleitung muss schnell erfolgen, um einen zusätzlichen Sauerstoffmangel zu verhindern. Geeignet sind Thiobarbiturate oder bei Kontraindikation Propofol. Für die intraoperative Erhaltung eignen sich Isofluran oder Halothan. Lachgas sollte nicht verwendet werden. Für die postoperative Analgesie kann weiterhin Butorphanol verwendet werden, da es neben der analgetischen auch eine antitussive Wirkung zeigt (Hobson 1995; Bettschart-Wolfensberger 1998).

Die chirurgischen Massnahmen erfolgen von kranial nach kaudal. Eine der ersten Massnahmen ist somit die Korrektur der stenotischen Nasenlöcher und oft gleichzeitig die Kürzung des zu langen Gaumensegels (Aron und Crowe 1985; Wykes 1991; Hobson 1995). Die Korrektur der Nasenflügel ist ein häufiger und erfolgreicher Eingriff und sollte so früh wie möglich durchgeführt werden, selbst schon im Alter von 3-4 Monaten, denn die stenotischen Nasenlöcher sind eine der Grundursachen für die Kaskade der Pathophysiologie (Aron und Crowe 1985; Wykes 1991). Weitere Massnahmen sind dann die Extraktion der vergrösserten Tonsillen und der erweiterten Larynxtaschen. Hunde mit einem Laryngealkollaps sollten auf jeden Fall einer Resektion der Nasenflügel, des Gaumensegels, der evertierten Larynxtaschen und Tonsillen unterzogen werden (Wykes 1991; Hobson 1995). Falls diese Eingriffe nicht zum Erfolg führen, muss eine partielle Laryngektomie vorgenommen werden, wobei die Komplikationsrate sehr hoch ist und nur 50% der Eingriffe zum Erfolg führen. Bleibt dieser also erfolglos, liegt die letzte Möglichkeit eines Therapieversuches in einer permanenten Tracheostomie (Harvey 1982a; Wykes 1991; Orsher 1993).

2.2 Hypoxie

2.2.1 Physiologische Reaktionen auf eine Hypoxie

Brachycephale Hunde können aufgrund ihrer oben beschriebenen Abnormalitäten im oberen Respirationstrakt schnell in eine Hypoxie geraten. Dies kann geschehen bei körperlicher Belastung, Stress, Ueberhitzung bei warmen Klima oder während einer Schlafapnoe. Die eingeatmete Luft reicht dann nicht mehr aus, den Körper mit genügend Sauerstoff zu versorgen. Der Sauerstoff ist aber der Grundstein für die Bereitstellung von Energie in allen Zellen im Körper eines Säugetieres (Gassmann 2001). Bei einem Sauerstoffmangel stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung. Durch verstärkte Atemarbeit wird die Atemfrequenz und das Atemzugsvolumen erhöht, die Nüstern erweitern sich (Evans 1993), so dass den Lungen mehr Einatemluft zugeführt werden kann. Durch Tachykardie wird das Herzminutenvolumen erhöht und die Lungen somit besser durchblutet (McCaffrey und Kern 1979).

Auf molekularer Ebene gibt es eine Vielzahl von Mechanismen, die stark miteinander verkettet sind. Die Erythrocyten sind die Sauerstoffträger im Blut. Bei Sauerstoffmangel bilden die Nieren das Hormon Erythropoietin (EPO), das die Erythropoese im Knochenmark stimuliert und somit die O₂-Transportkapazität erhöht. Das Protein Transferrin bindet im Blut Eisen, das zur Hämoglobinbildung gebraucht wird und ein wichtiger Baustein dieses Moleküls darstellt. Endothelin-1 führt zur Vasokonstriktion und somit zu einer Erhöhung des Blutdruckes und des peripheren Widerstandes. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF). Er wird in Endothelzellen gebildet und fördert die Neubildung von Blutkapillaren. Somit ist er auch wichtig für die Wundheilung und die embryonale Entwicklung von Blutgefäßen. Auch von Tumorzellen wird VEGF zur Förderung der Vaskularisation gebildet. So kann der Tumor sein Wachstum selbst fördern (Gassmann 2001).

Was ist aber das Signal, das die Menge der oben genannten Stoffe bei Sauerstoffmangel überhaupt im Blut ansteigen lässt? Es gibt einen Schlüsselfaktor, der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 α (HIF-1 α), dessen Konzentration nur unter dem Einfluss von Hypoxie innerhalb von Sekunden den Zellen zur Verfügung steht (Jewell *et al.* 2001) und so die Bildung von EPO, Transferrin, Endothelin-1, VEGF und anderen Hypoxie-regulierten Faktoren induziert. HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer α - und einer β - (auch ARNT genannten) Untereinheit besteht. Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1 α nicht stabil und wird innerhalb weniger Minuten wieder abgebaut. HIF-1 α wird nicht auf Transkriptionsebene, sondern über Proteinstabilisierung unter hypoxischen Bedingungen reguliert (Wenger und Gassmann 1997). Das HIF-1 α Protein wird also konstitutiv synthetisiert und unter normoxischen Bedingungen über die Ubiquitin/Proteasom-Degradationskaskade gleich wieder abgebaut (Salceda und Caro 1997; Huang *et al.* 1998; Jewell *et al.* 2001). Lange Zeit war nicht bekannt, wie die Zellen die O₂-Konzentration ihrer Umgebung messen. Die Schlüsselenzyme, die den O₂-abhängigen Abbau von HIF-1 α kontrollieren, sind spezifische Prolylhydroxylasen, die Fe²⁺ als Cofaktor und O₂ und 2-Oxoglutarat als Co-Substrate benötigen (Ivan *et al.* 2001; Jaakkola *et al.* 2001). Die Prolylhydroxylasen hydroxilieren zwei bestimmte Prolinreste, die in der sogenannten O₂-abhängigen Degradationsdomäne vorkommen (Masson *et al.* 2001). Unter normoxischen Bedingungen ermöglicht diese Hydroxilierung die spezifische Interaktion des von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Proteins (pVHL) mit HIF-1 α . Das pVHL beinhaltet die Ubiquitin Ligase, welche die

Ubiquitinierung von HIF-1 α vollzieht. Die ubiquinierten HIF-1 α Moleküle werden somit durch Proteasen abgebaut (Maxwell *et al.* 1999; Cockman *et al.* 2000; Ohh *et al.* 2000; Tanimoto *et al.* 2000). Bei Hypoxie fehlt der Prolylhydroxylase das O₂, so dass keine OH-Gruppen angehängt werden können. HIF-1 α wird in der Folge nicht abgebaut und wandert in den Zellkern und löst die oben beschriebene Kaskade aus (Heinicke K. 2002). Immunhistochemische Untersuchungen bei verschiedenen Organen von Mäusen haben gezeigt, dass das HIF-1 α Protein in Gehirn, Niere, Leber, Herz und Skelettmuskel schon unter normoxischen Bedingungen nachweisbar sind (Stroka *et al.* 2001). Offenbar ist HIF-1 α ein nicht redundanter, lebenswichtiger Faktor. Hypoxie bewirkt also intrazelluläre Stabilisierung von HIF-1 α , welches anschliessend in den Zellkern transportiert wird. Im Zellkern heterodimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β /ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und der daraus resultierende HIF1-Komplex bindet an eine spezifische Basensequenz von O₂-regulierten Genen (Wenger und Gassmann 1997; Camenisch *et al.* 2001). Diese Sequenz wird dann HIF-1 binding site (HBS) genannt. Die HBS ist das Kernsegment des hypoxia response element (HRE) und steuert die Feinregulierung der HIF-1-abhängigen Zielgene (Wenger und Gassmann 1997). Die Bindung von HIF-1 an die HRE-Sequenz führt zu einer gezielten Überproduktion von EPO, VEGF, Transferrin, Endothelin und weiteren Faktoren (Abb. 3) (Wenger und Gassmann 1997b; Camenisch *et al.* 2001).

2.2.2 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)

VEGF (Abb. 3) ist ein Faktor mit antiapoptotischer, mitogener und permeabilitätssteigernder Wirkung spezifisch auf Endothelzellen. Er wird benötigt für die normale embryonale Entwicklung von Gefässen, die zyklische Bildung von Blutgefässen im Endometrium, für die Bildung von Kapillaren bei der Wundheilung und für das Wachstum von malignen Tumoren. VEGF besteht aus 8 Exons und 7 Introns. Die Transkription wird in erster Linie durch die Bindung vom HIF-1 aktiviert. Die VEGF mRNA ist stabil in Hypoxie. Aufgrund alternierendem Splicing der VEGF mRNA entstehen mindestens 5 Isoformen von VEGF, nämlich VEGF 121, 145, 165, 189 und 206. Die Isoformen bestehen jeweils aus der entsprechenden Anzahl Aminosäuren. VEGF 165, die wichtigste Isoform, ist ein Heparin gebundenes Homodimer von 45 kDa, das nur teilweise an Zelloberflächen und an die extrazelluläre Matrix gebunden ist. VEGF 121 ist ein freilösliches Protein, das nicht an Heparin gebunden ist. Die anderen Isoformen treten nicht in signifikanten Mengen in die Blutzirkulation ein, weil sie entweder extrazellulär gebunden sind (VEGF 145) oder nur in kleinen Mengen sezerniert werden (VEGF 189, 206) (Jelkmann 2001). VEGF bindet an die Basalmembran von Endothelzellen und wird produziert infolge Hypoxie, Hypoglykämie und Entzündung von nicht malignen Zellen und von malignen Tumorzellen in hoher Konzentration. VEGF bindet mit grosser Affinität an zwei verschiedene Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, genannt Flt-1 und KDR, die von den Epithelzellen gebildet werden. Flt-1-Rezeptoren befinden sich auch auf Trophoblasten und Makrophagen, während die KDR-Rezeptoren auch auf hämatopoietischen Stammzellen zu finden sind (Neufeld *et al.* 1999; Jelkmann 2001). Es wird vermutet, dass alle Gewebe das Potential besitzen, VEGF zu bilden (Jelkmann 2001). Bei regelmässigem Ausdauertraining kommt es nicht nur zu einer Anpassung der Erythrocytenzahl, sondern auch zu einer Zunahme der Kapillarisation, der Mitochondrienzahl und der oxidativen Enzyme in der Skelettmuskulatur (Hoppeler 1986; Gustafsson und Kraus 2001). Unter O₂-Mangel wird vermehrt VEGF gebildet, das die Entstehung von neuen Blutgefässen fördert (Ferrara 1999). Dies wird bestätigt durch einen akuten Anstieg der VEGFmRNA-Konzentration in Biopsien des M. vastus lateralis nach einer einmaligen Belastung von untrainierten Personen unter normoxischen

Bedingungen (Richardson et al. 1999). Eine zusätzliche systemische Hypoxie (12%) während der Belastung führt unerwarteterweise zu keinem weiteren Anstieg der VEGFmRNA-Konzentration. Hoppeler und Mitarbeiter haben bei trainierten Personen andere Resultate gefunden. Eine simulierte Hypoxie während wiederholtem intensiven Training mit anschließender Ruhephase unter normoxischen Bedingungen hat zu einer VEGF-bedingten Erhöhung der Kapillarisation geführt. Sie haben postuliert, dass ein wiederholtes und intensives Training in Hypoxie, bei sonst normoxischen Lebensbedingungen, zu einer Erhöhung der Muskelkapillarisation führt (Hoppeler und Vogt 2001). Abnormale Angiogenese wird beobachtet zum Beispiel bei proliferativen Retinopathien, rheumatischer Arthritis, Psoriasis und malignen Tumorerkrankungen. VEGF spielt eine wichtige Rolle in der Expansion und Metastasierung von malignen Tumoren, durch die Permeabilitätssteigerung von Kapillaren und die wachstumsfördernde Wirkung auf Endothelzellen. Die VEGF-Genexpression wird auch gefördert durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 und 6 und dem Tumornekrosefaktor α (Ferrara und Davis-Smyth 1997; Neufeld *et al.* 1999) Diese Faktoren werden ebenfalls über das HIF-1 aktiviert (El Awad *et al.* 2000). Auch Hormone wie Insulin, Insulin-like growth factor 1, Thyreotropin und Steroidhormone sollen die Produktion von VEGF mRNA stimulieren (Ferrara 1999). Weil VEGF eine wichtige Rolle spielt bei der physiologischen und pathophysiologischen Angiogenese hat die Messung von VEGF diagnostischen und prognostischen Wert zum Beispiel bei kardiovaskulären Krankheiten, Entzündungsprozessen, Lebererkrankungen, entzündlichen Darmerkrankungen, Präeklampsie und Schwangerschaft (Wynendaele *et al.* 1999). VEGF wird als Tumormarker verwendet zum Beispiel beim Mammakarzinom, Kolorektalkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Non Hodgkin-Lymphom, renalem Zell-Karzinom, epithelialen Neoplasien und Sarkomen (Wynendaele *et al.* 1999).

2.2.3 Erythropoietin

EPO (Abb. 3) ist ein Glykoproteinormon bestehend aus 165 Aminosäuren und 4 Kohlenhydraten (Klinke und Silbernagl 1996) und ist eines der ersten gentechnologisch hergestellten Medikamente für den Einsatz bei Anämie (Gassmann 2001). Die Bildung von EPO wird vor allem bei arteriellem Sauerstoffmangel in der oben beschriebenen Weise durch HIF-1 induziert (Wenger und Gassmann 1997a). Ein verminderter Sauerstoffpartialdruck im renalen kortikalen Interstitium bildet den Reiz für die Steigerung der EPO-Synthese. Nicht die Syntheserate der einzelnen Zellen wird erhöht, sondern mehr Zellen werden rekrutiert. Bei einer Niereninsuffizienz versagt somit die Haupterythropoietinquelle und es kommt in der Folge zur renalen Anämie (Klinke und Silbernagl 1996). Verminderte Sauerstofftransportkapazität, zum Beispiel infolge Anämie, oder erhöhte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins erhöhen die EPO-Plasmakonzentration. EPO erhöht die Proliferation und Differenzierung der Erythrozytenvorläuferzellen (Klinke und Silbernagl 1996). Der Hämatokrit steigt an und führt zur Verbesserung der Sauerstofftransportkapazität und der sportlichen Leistung. EPO erhöht auch körpereigenes Stickstoffmonoxid, das eine vasodilatatorische Wirkung hat. Durch Verhinderung einer Hypertonie übernimmt es eine schützende Rolle im Körper. EPO wird beim Erwachsenen zu 90% in den Nieren von den Kapillarendothelzellen und den Fibroblasten der Nierenrinde gebildet. 10% der EPO-Bildung übernimmt die Leber. Beim Fötus geht die gesamte EPO-Bildung von der Leber aus (Klinke und Silbernagl 1996; Gassmann 2001).

Zu geringe Mengen an zirkulierendem EPO ist ein typisches Symptom spezifischer pathologischer Störungen, zu denen verschiedene Anämien und primäre Polyzythämie gehören. Überproduktion von EPO wird meist mit einem Nierenkarzinom in Verbindung gebracht. Einige Tumorarten, wie Uterusmyom, Hämangioblastom des Kleinhirns, Lebertumoren und Phäochromozytoblastom werden

für die ektope Produktion von EPO verantwortlich gemacht. Erhöhte EPO-Spiegel findet man auch bei aplastischen Anämien, Eisenmangelanämien, hämolytischen Anämien. Sekundäre Polyzythämie wird durch erhöhte Produktion und Freigabe von EPO verursacht, wie zum Beispiel bei Rauchen, Nierensteinen, Lungenfibrosen, die zu Hypoxie führen, Herzleiden, Tumore oder Hämoglobindefizienz (Braunwald 1987).

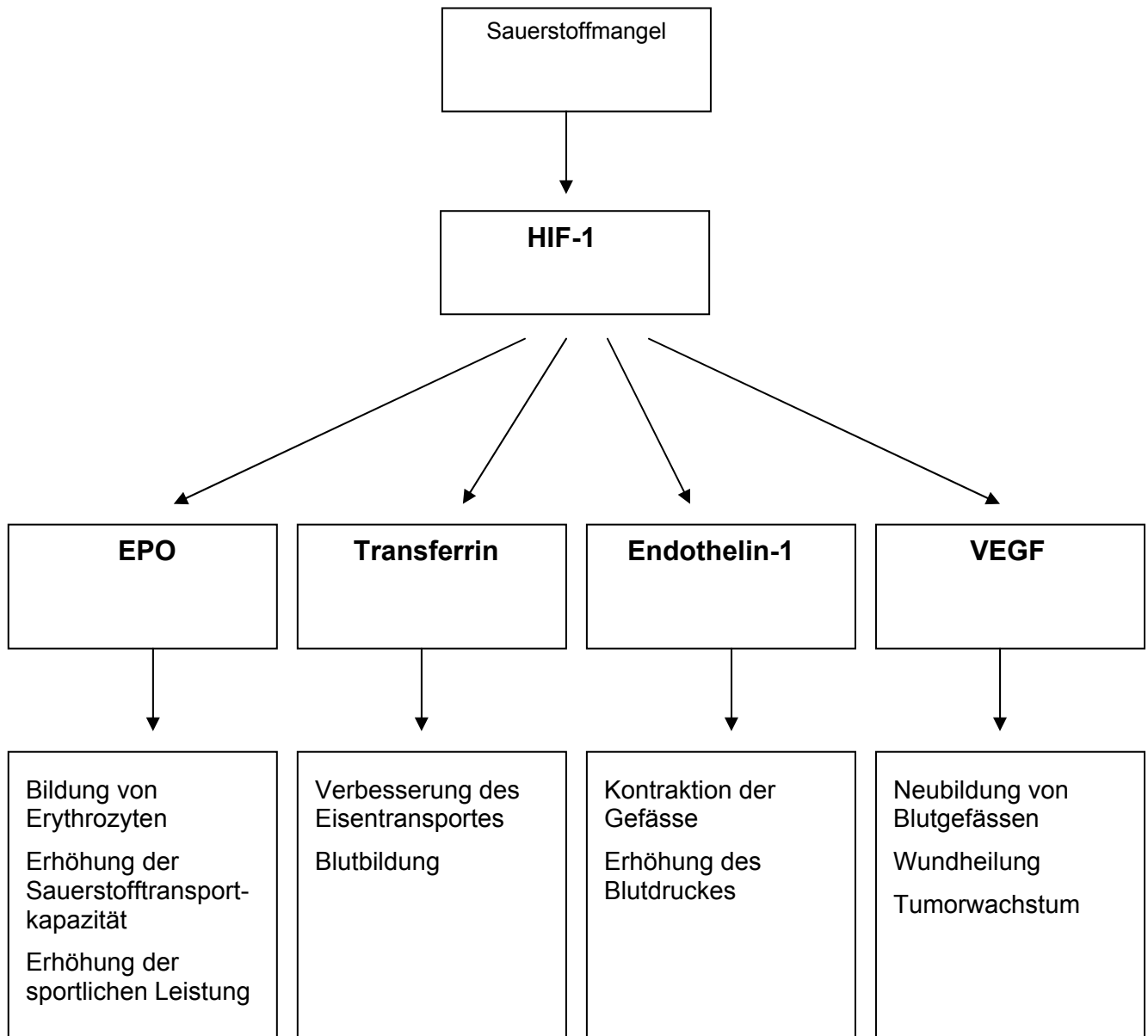


Abbildung 3: Beispiele von physiologischen Reaktionen auf Hypoxie

2.3 Hypothesen

Das Bedürfnis einer objektiven Beurteilung der Sauerstoffschuld, die Kenntnis der zellulären Antwort auf Hypoxie und die Tatsache, dass sowohl für VEGF als auch für EPO standardisierte humane Testkits zur Verfügung stehen, führten zur Formulierung folgender Arbeitshypothesen:

- (1) VEGF und EPO steigen bei mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung an, erreichen aber in 4 Stunden wieder die Ausgangswerte.
- (2) VEGF und EPO erreichen bei brachycephalen Hunden höhere Werte nach Belastung und erreichen die Ausgangswerte innerhalb 4 Stunden nicht wieder.
- (3) Die Ausgangswerte von VEGF und EPO sind bei brachycephalen Hunden wegen der möglichen chronischen Hypoxie höher als bei gesunden Hunden

3. Material und Methodik

Als mesocephale Hunde wurden acht Beagle bestimmt. Diese Rasse wurde als nichtbrachycephal eingeteilt (Balli 2004; Koch 2004). Sie wurden viermal im Abstand von je einer Woche einer Belastungsprobe unterzogen. Es wurden vor Belastung, unmittelbar nach Belastung, nach 2 und nach 4 Stunden Blutproben entnommen zur Bestimmung der VEGF- und EPO-Werte im Serum. Zum Vergleich wurden acht brachycephale Hunde, nämlich 7 Möpfe und 1 Griffon, nach dem gleichen Schema einmalig einer Belastungsprobe unterzogen.

3.1 Tiere

Für die erste Testreihe mit den Beaglen standen acht Hunde dieser Rasse aus einer kontrollierten Versuchstierzucht zur Verfügung (Tab. 1). Der Versuch wurde vom kantonalen Veterinäramt Zürich bewilligt. Die Hunde waren alle korrekt geimpft und subjektiv gesund. Bei allen Hunden wurde eine klinische Untersuchung und ein Laborstatus mit Hämatologie und Blutchemie durchgeführt.

Tabelle 1: Versuchsnummer, Alter, Geschlecht und Gewicht der Beaglehunde Nr. 1 bis 8

Hund Nummer	Alter	Geschlecht	Gewicht	Bemerkung
1	8.8 Jahre	männlich kastriert	10.0 kg	
2	9.5 Jahre	männlich kastriert	14.8 kg	Schwäche
3	8.8 Jahre	männlich kastriert	16.7 kg	häufiger Husten
4	8.8 Jahre	männlich kastriert	13.8 kg	Husten bei Belastung
5	8.7 Jahre	männlich kastriert	16.5 kg	
6	9.5 Jahre	männlich kastriert	13.0 kg	
7	8.8 Jahre	männlich kastriert	14.5 kg	
8	8.6 Jahre	männlich kastriert	14.9 kg	

Die Hunde waren während der Zeit zwischen den Versuchen in der Aussenstation Stigenhof, die zirka eine halbe Stunde Autofahrt vom Tierspital Zürich entfernt liegt, zu je zwei gleich grossen Gruppen untergebracht. Die Aussenboxen hatten eine Grösse von 5.5 m x 2.8 m und die Innenboxen 4.5 m x 2.8 m. Die Innenboxen mit Giebeldach hatten eine Höhe 3 m bis 4 m und waren mit Fenstern für Tageslicht und Kunststoffböden versehen. Die Hunde wurden jeweils abends gefüttert, wobei sie am Abend vor dem Versuch nüchtern gehalten wurden. Am Versuchstag wurden sie am Morgen in einem Kleinbus des Tierspitals in die Klinik gefahren. Nach den Belastungsproben stand den Hunden Wasser zur Verfügung. In der Zeit zwischen den Blutentnahmen wurden die Hunde zu je einer Vierergruppe, Nummer 1 bis 4 und Nummer 5 bis 8, in einem gedeckten und windgeschützten Aussengehege der Kleintierchirurgie von der Grösse 2 m x 4 m untergebracht.

Für die zweite Testreihe standen acht brachycephale Tiere (7 Möpfe, 1 Griffon) aus einer privaten Hundezucht zur Verfügung (Tab. 2). Die Hunde waren ebenfalls korrekt geimpft und subjektiv gesund.

Eine Laryngoskopie und Schädelröntgen unter Narkose wurden bei beiden Gruppen nicht durchgeführt.

Tabelle 2: Versuchsnummer, Alter, Geschlecht und Gewicht der Zuchthunde Nr. 1 bis 8

Hund Nummer	Alter	Geschlecht	Gewicht	Bemerkung	Rasse
1	8.9 Jahre	männlich	08.0 kg		Mops
2	1.5 Jahre	männlich	08.0 kg		Mops
3	9.0 Jahre	weiblich	11.0 kg		Mops
4	7.5 Jahre	männlich	10.0kg		Mops
5	11.2 Jahre	männlich	06.0 kg		Griffon
6	13.7 Jahre	weiblich	07.0 kg	Husten, Inspirat. Stridor	Mops
7	5.4Jahre	weiblich	07.0 kg	Inspirat. Stridor	Mops
8	6.3 Jahre	weiblich	07.0 kg	Inspirat. Stridor	Mops

Die Belastungsprobe wurde am Aufenthaltsort der Hunde durchgeführt. Die Hunde wurden zusammen mit den anderen Hunden der Zucht in verschiedenen Innenräumen von je zirka 3 m x 4 m mit Auslauf in den Privatgarten gehalten. Die Hunde wurden am Abend vor dem Versuch nüchtern gehalten. Nach der Belastungsprobe stand auch ihnen Wasser zur Verfügung. Zwischen den Blutentnahmen konnten sie sich frei mit den anderen Tieren der Hundezucht aufhalten.

3.2 Methodik

3.2.1 Belastungsprobe, Blutentnahmen, Verarbeitung der Blutproben

Zu Beginn wurde allen acht Hunden (acht Beaglen an je vier verschiedenen Versuchstagen im Abstand von je einer Woche und acht brachycephalen Hunden an einem Versuchstag) vor der Belastungsprobe eine Blutprobe entnommen zur Bestimmung des VEGF- und EPO-Basalwertes. Anschliessend wurden je vier Hunde zusammen von zwei Personen 10 Minuten lang auf einem Parcours von mehreren hundert Metern an der Leine im Trab belastet. Das Tempo wurde so gewählt, dass es das maximal mögliche Trabtempo der Hunde war. Sofort nach der Belastung wurden die Blutentnahmen für den 0-Stundenwert durchgeführt und nach 2 und 4 Stunden für den 2- bzw. 4-Stundenwert. Das Blut wurde an der Vena jugularis links oder rechts mit einer 5 ml Spritze und schwarzer Kanüle (22 gauge) entnommen, in ein Serumröhrchen umgefüllt und sofort bei 4°C in einem handelsüblichen Kühlschranks kühl gestellt. Nach genau 15 Minuten wurde das Blut 30 Minuten mit 1000 U/Min bei 4 °C zentrifugiert (Mikro 22 R, Firma Hettich Laborapparate). Das Serum wurde sofort abpipettiert und in Kunststoff-Tubes zu je 3 Aliquots gefüllt und bei 4°C gelagert. Nachdem alle Blutproben verarbeitet waren, wurden sie jeweils am selben Tag noch bei -80°C tief gefroren (Nap Coil UF 500, Hettich Laborapparate).

3.2.2 Bestimmung der VEGF-Werte

Die VEGF-Werte im Serum wurden mit dem humanen Testkit Quantikine® (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf einem quantitativen Sandwich Enzym linked Immuno Assay (ELISA). Er ist hergestellt zur Bestimmung der freien VEGF-Isoform 165 im Serum, Plasma oder in Zellkultur, kreuzreagiert aber mit VEGF-Isoform 121. Die ELISA-Platte ist mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für VEGF beschichtet.

Als erstes wurden die Serumproben aufgetaut und die Reagenzlösungen auf Raumtemperatur gebracht. Vom Calibrator Diluent RD6U wurden 1 ml zum VEGF Standard pipettiert zur Herstellung einer Standardausgangslösung mit der Konzentration von 2000 pg/ml. Von dieser Konzentration ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe von 1000 pg/ml bis 15.6 pg/ml hergestellt. Dazu wurden in sechs Polypropylentubes je 500 µl Calibrator Diluent RD6U pipettiert und mit 500 µl Standard beginnend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Standardverdünnungen und Serumproben wurden in die entsprechenden Löcher der Platte pipettiert und vorhandenes VEGF wurde so an die beschichteten Antikörper gebunden.

Während der zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 500 µl Waschpuffer mit 20 µl Waschpuffer-Konzentrat und destilliertem Wasser hergestellt. Die Platte wurde mit dem Waschpuffer dreimal gewaschen, so dass alle ungebundenen Substanzen entfernt wurden.

200 µl Konjugat, das Enzym-markierte polyklonale Antikörper spezifisch für VEGF enthält, wurden in jedes Loch hinzu gefügt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurden durch dreimaliges Waschen alle ungebunden Enzym-markierten Antikörper entfernt.

Durch Zusammenschütten der Farbreagenzien A und B wurde die Substratlösung hergestellt. Von dieser wurden innerhalb von 15 Minuten je 200 µl in jedes Loch pipettiert. Es entstand eine Farbreaktion proportional zur gebundenen VEGF-Menge im ersten Schritt. Die Farbreaktion wurde durch Hinzupipettieren der Stopplösung von je 50 µl in jedes Loch nach genau 25 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln unterbrochen. Gemessen wurde die Farbintensität (Extinktion) innerhalb von 30 Minuten mit einem ELISA-Lesegerät (DYNATECH MR 7000, BioConcept) bei 450 nm. Die Berechnung der absoluten VEGF-Konzentrationen wurden anhand des Quantikine-Manuals durchgeführt .

3.2.3 Bestimmung der EPO-Werte

Das EPO-Trac-RIA-Kit (Dia Sorin Inc., Stillwater, USA) ist zur quantitativen Bestimmung von EPO in Serum oder EDTA-Plasma mit Hilfe des Radioimmuno-Assays (RIA) zur Unterstützung der Diagnose von Anämien und Polyzythämien bestimmt. Er ist sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin verwendbar. Bei dieser Methode handelt es sich um einen ungleichgewichtigen, kompetitiv-bindenden Radioimmuno-Assay, bei welchem humanes rekombinantes EPO sowohl für den Tracer als auch für die Standards verwendet wird.

Die Proben wurden zunächst mit dem EPO-Trac Primär-Ziegenantikörper (Ziegen-Anti-EPO) inkubiert. Nach 2-stündiger Reaktion wurde ein mit Jod-125 markierter EPO-Trac Tracer hinzugefügt. Nach der Inkubation bis zum nächsten Tag wurde ein sekundärer Esel-Antiziegen Präzipitationskomplex- (DAG-

PTT = Donkey-Anti-Goat-Precipitating Complex) -Antikörper den spezifischen Teströhrchen zugegeben. Der DAG-PTT war ein Esel-Antiziegen-Serum, das mit normalem Ziegenserum und einem oberflächenentspannenden Stoff vorpräzipitiert wurde. Der DAG-PTT wurde mit Standards oder Proben, dem primären Antikörper und dem Tracer dreissig Minuten lang inkubiert. Anschliessend wurden die Teströhrchen zentrifugiert, um den gebundenen vom ungebundenen Tracer zu trennen. Der ungebundene Tracer wurde durch Abgiessen des Überstandes von jedem Teströhrchen entfernt. Der gebundene Tracer in den verbleibenden DAG-PTT-Komplex-Kügelchen wurde im Gammazähler (GAMMAmatic 1, Firma Kontron Analytical) 1 Minute lang gezählt. Die Jod-125-Zählungen waren umgekehrt proportional zu der in jeder Probe vorhandenen EPO-Menge. Die Resultate konnten durch Vergleich mit der Standardkurve quantitativ ausgewertet werden und sind in mU/ml ausgedrückt

3.3 Statistische Methoden

Zum Vergleich der VEGF- und der EPO-Werte innerhalb der MC-Gruppe und der BC-Gruppe und zum Vergleich der beiden Gruppen miteinander, wurde die Repeated Measure Analyse mit der Greenhouse-Geisser-Korrektur benutzt. Die VEGF-Basalwerte der mesocephalen Hunde wurden mittels einer Post-Hoc-Analyse mit Bonferoni-Korrektur gegeneinander verglichen. Der Vergleich der VEGF- Werte zu einem bestimmten Zeitpunkt der MC-Gruppe von Tag 4 mit der BC-Gruppe wurde mit dem Mann Whitney-Test durchgeführt. Als Signifikantsschwelle wurde ein p-Wert von < 0.05 erachtet.

4. Resultate

4.1 Klinische Beurteilung der Hunde

Die Hunde der MC-Gruppe waren subjektiv und aufgrund eines klinischen Allgemeinuntersuches alle gesund. Die Laborwerte ergaben ausser leicht erniedrigte Hämatokrit-, Hämoglobin-, Erythrocyten-, Totalprotein- und Albumindurchschnittswerte keine Besonderheiten (Tabelle 3). Lediglich Hund 3 und 4 stellten eine Ausnahme dar. Hund 3 zeigte häufigen Husten in Ruhe, und Hund 4 zeigte Husten bereits nach kurzzeitiger Belastung.

Die Hunde der BC-Gruppe zeigten alle die typischen äusseren Zeichen von Brachycephalie, wie eine kurze Nase, stenotische Atemgeräusche bei geringgradiger Belastung und Stressintoleranz. Ansonsten waren aber auch diese Hunde subjektiv gesund und die klinische Allgemeinuntersuchung ergab keine weiteren Besonderheiten. Die Laborwerte ergaben einen leicht erniedrigten Glucose- und einen leicht erhöhten Harnstoffdurchschnittwert. Die restlichen Werte lagen in den Normbereichen (Tab. 4).

Tabelle 3: Hämatologie- und Blutchemiewerte der Hunde der mesocephalen Gruppe (n.b. = nicht bestimmt, Ø-Wert= Durchschnittswert)

	Normalwerte	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8	Ø-Wert
Hämatokrit	42 - 55 %	44	37	42	36	42	33	40	38	39.0 ± 3.7
Hämoglobin	14.4 - 19.1 g/dl	14.7	12.7	14.3	12.0	14.3	11.1	13.6	12.8	13.2 ± 1.3
Erythrozyten	6.1 – 8.1*10 ⁶ /µl	6.70	5.69	6.19	5.41	6.13	4.93	5.97	5.40	5.8 ± 0.6
Leukozyten	4.7 – 11.3 *10 ³ /µl	7.6	7.0	15.4	5.6	7.6	10.1	6.5	9.2	8.6 ± 3.1
MCH	23 – 26 pg	22	22	23	22	23	22	23	24	22.6 ± 0.7
MCHC	34 – 36 g/dl	34	34	34	34	34	34	34	34	34.0 ± 0.0
MCV	64 – 73 fl	65	66	68	66	69	67	67	71	67.4 ± 1.9
Bilirubin gesamt	2.5 – 7.6 µmol/l	4.5	n.b.	3.5	n.b.	3.8	4.0	4.4	3.6	4.0 ± 0.4
Glukose	4.1 – 5.9 mmol/l	3.7	3.8	3.2	3.1	3.1	2.6	3.2	3.3	3.3 ± 0.4
Harnstoff	3.8 – 9.4 mmol/l	4.6	3.2	2.4	3.2	1.7	4.5	2.4	2.3	3.0 ± 1.1
Kreatinin	64 – 125 µmol/l	50	56	50	50	55	48	52	59	52.5 ± 3.8
Protein	56 – 71 g/l	53	55	57	53	55	52	52	51	53.5 ± 2.0
Albumin	29 – 37 g/l	28	30	29	28	32	24	27	26	28.0 ± 2.4
Cholesterin	3.5 – 8.6 mmol/l	5.0	4.1	5.0	4.7	3.4	3.4	3.9	3.1	4.1 ± 0.8
Alk. Phosphatase	20 – 98 U/l	117	60	258	60	51	43	91	79	94.9 ± 70.1
Amylase	377 – 1244 U/l	355	523	632	555	529	541	456	573	520.5 ± 83.2
ASAT (GOT)	20 – 44 U/l	56	35	36	38	38	46	29	37	39.4 ± 8.2
ALAT (GPT)	20 – 93 U/l	64	35	53	44	51	64	77	31	52.4 ± 15.6
Natrium	152 – 159 mmol/l	155	152	155	152	153	152	152	152	152.9 ± 1.4
Kalium	4.3 – 5.3 mmol/l	4.8	5.1	4.8	4.9	5.2	5.2	4.8	5.4	5.0 ± 0.2
Kalzium	2.4 – 2.8 mmol/l	1.81	1.85	1.82	2.25	1.82	2.12	1.75	1.88	1.9 ± 0.2
Phosphor	1.0 – 1.6 mmol/l	1.48	1.68	1.26	1.64	1.30	1.64	1.05	1.51	1.4 ± 0.2

Tabelle 4: Hämatologie- und Blutchemiewerte der Hunde brachycephalen Gruppe (¹ EDTA Blut geronnen)

	Normalwerte	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8	Ø-Wert
Hämatokrit	42 - 55 %	53	30	44	48	¹	37	54	47	44.7 ± 8.6
Hämoglobin	14.4 - 19.1 g/dl	18.1	10.4	15.3	16.5	¹	13.2	18.6	16.2	15.5 ± 2.9
Erythrozyten	6.1 – 8.1*10 ⁶ /µl	7.65	4.16	6.33	7.22	¹	5.43	7.56	6.84	6.5 ± 1.3
Leukozyten	4.7 – 11.3 *10 ³ /µl	11.5	22.1	17.0	15.8	¹	9.1	10.6	6.9	13.3 ± 5.3
MCH	23 – 26 pg	24	25	24	23	¹	24	25	24	24.1 ± 0.7
MCHC	34 – 36 g/dl	34	35	35	34	¹	36	35	35	34.9 ± 0.7
MCV	64 – 73 fl	69	72	69	67	¹	68	71	68	69.1 ± 1.8
Glukose (Serum)	4.1 – 5.9 mmol/l	4.2	3.1	3.7	3.3	2.6	3.5	3.8	5.0	3.7 ± 0.7
Harnstoff	3.8 – 9.4 mmol/l	11.7	18.4	13.0	6.8	9.0	10.5	9.8	3.8	10.4 ± 4.3
Kreatinin	64 – 125 µmol/l	90	74	77	68	74	97	74	62	77.0 ± 11.4
Protein	56 – 71 g/l	72	55	65	61	71	64	76	57	65.1 ± 7.4
Albumin	29 – 37 g/l	31	17	31	28	31	32	33	31	29.3 ± 5.1
Cholesterin	3.5 – 8.6 mmol/l	7.8	4.7	7.4	6.7	5.7	6.6	8.4	6.7	6.8 ± 1.2
Alk. Phosphatase	20 – 98 U/l	22	33	64	63	30	35	90	76	51.6 ± 24.8
Amylase	377 – 1244 U/l	635	841	444	447	n.b.	555	n.b.	676	599.7 ± 151.6
ASAT (GOT)	20 – 44 U/l	33	50	43	26	50	38	33	37	38.8 ± 8.5
ALAT (GPT)	20 – 93 U/l	52	32	46	35	43	36	36	33	39.1 ± 7.1
Natrium	152 – 159 mmol/l	n.b.	151	152	154	150	n.b.	157	152	152.7 ± 2.5
Kalium	4.3 – 5.3 mmol/l	n.b.	6.3	5.8	5.6	n.b.	n.b.	n.b.	4.6	5.6 ± 0.7
Kalzium	2.4 – 2.8 mmol/l	2.83	2.43	2.55	2.26	2.42	2.64	2.47	2.81	2.6 ± 0.2
Phosphor	1.0 – 1.6 mmol/l	1.76	2.08	1.62	1.57	1.51	1.57	1.31	2.27	1.7 ± 0.3

4.2 VEGF-Werte

4.2.1 VEGF-Werte der mesocephalen Hunde (MC)

Die Basalwerte und die zeitlichen Verläufe von VEGF nach kurzfristiger Belastung bei den acht Beaglen verhielten sich ähnlich. Die Basalwerte lagen mit wenigen Ausnahmen bei ≤ 10 pg/ml, die 0h- und 2h-Werte im selben Bereich, während die 4h-Werte etwas höher lagen (5 - 25pg/ml). Der zeitliche Verlauf der VEGF-Werte zeigte an allen vier Messtagen dasselbe Bild (Tabelle 5). Die Auswertung der gesamten Gruppe ergab, dass die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Blutentnahme (jeweils basal, 0h, 2h und 4h) sowie zwischen den Versuchstagen (jeweils Tag 1, Tag 2, Tag 3 und Tag 4) statistisch nicht signifikant waren.

Tabelle 5: VEGF-Werte von 8 mesocephalen Hunden in pg/ml vor bzw. 0h, 2h und 4 h nach kurzzeitiger Belastung an 4 Testtagen (Abstand 1 Woche)

Tag	Zeit	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8	Alle Hunde
1	Basal	2.14	4.77	2.20	17.14	2.52	2.89	0.00	6.27	5.02±5.12
1	0h	5.89	7.39	6.27	20.88	9.64	9.27	3.27	11.52	9.23±5.35
1	2h	10.77	5.52	11.14	14.52	9.27	6.64	5.14	17.51	10.06±4.38
1	4h	13.77*	9.27	20.51*	19.76	15.27*	8.14*	7.02	24.62	14.80±6.44
2	Basal	2.75	5.97	5.57	15.61	5.57	8.78	6.37	8.78	7.43±3.83
2	0h	10.39	5.17	5.57	12.00	6.77	7.98	4.76	9.18	7.73±2.63
2	2h	5.16	6.37	5.57	11.59	14.01	9.18	7.57	9.58	8.63±3.08
2	4h	7.57	9.99	9.58	17.22	13.60	11.19	7.98	9.98	10.98±3.17
3	Basal	1.56	2.25	6.71	9.36	4.11	4.48	0.00	4.85	4.22±2.88
3	0h	3.36	5.97	3.73	10.50	3.74	4.48	0.77	4.48	4.63±2.79
3	2h	4.48	5.22	2.62	12.01	9.74	11.25	2.62	6.34	6.79±3.75
3	4h	7.09	7.47	6.34	12.40	11.63	9.74	4.48	5.97	8.14±2.82
4	Basal	1.88	0.76	8.60	13.52	7.85	8.22	7.84	12.01	7.59±4.40
4	0h	1.88	1.51	10.12	15.84	7.84	12.39	6.34	13.54	8.68±5.27
4	2h	5.96	1.88	13.52	8.98	12.01	13.54	6.35	10.50	9.09±4.12
4	4h	5.22	2.62	13.16	12.77	14.31	16.23	9.34	13.16	10.85±7.47

* $p \leq 0.05$ bezogen auf den entsprechenden Basalwert

Die Basalwerte der Hunde waren unterschiedlich. Hund 4 zeigte signifikant höhere Basalwerte als die anderen Hunde. Auch Hund 8 hatte höhere Basalwerte als die verbleibenden 6 Hunde, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Abb. 4). Um diese individuellen Unterschiede für die Reaktion auf die kurzfristige Belastung auszugleichen, wurden die VEGF-Werte als Differenz zum jeweiligen Basalwert berechnet. Daraus ergaben sich die VEGF-Differenzen zwischen dem 0h-Wert zum Basalwert (Diff 0h-Basal), dem 2h-Wert zum Basalwert (Diff 2h-Basal) und dem 4h-Wert zum Basalwert (Diff 4h-Basal). Die Unterschiede wurden für alle acht Hunde errechnet und für jeden Versuchstage angegeben (Tab. 6).

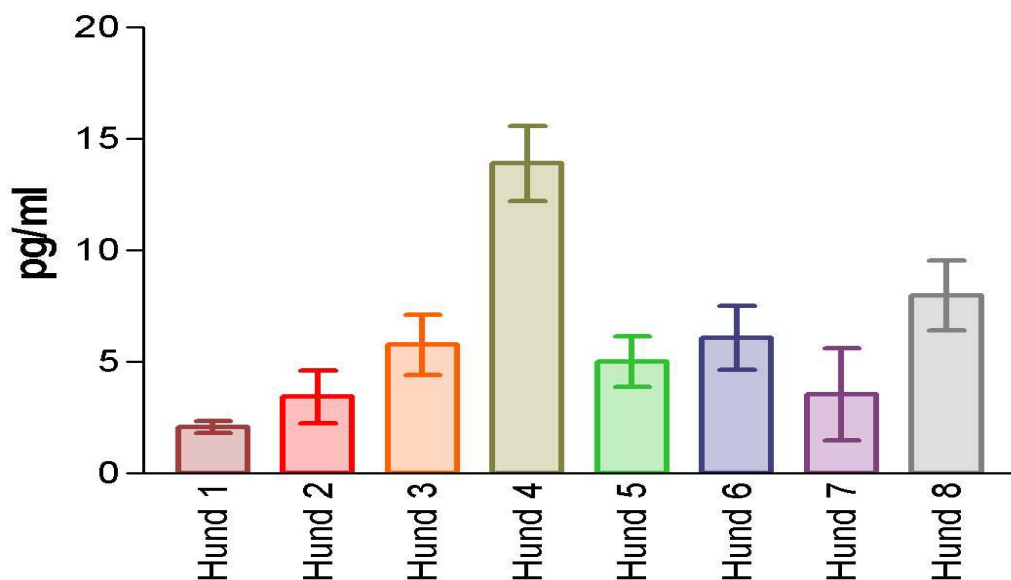


Abbildung 4: VEGF-Basalwerte von 8 mesocephalen Hunden

Tabelle 6: Differenzen der VEGF-Werte von 8 mesocephalen Hunden nach 0h, 2h und 4h zum Basalwert in pg/ml

Tag	Diff 0h - Basal	Diff 2h - Basal	Diff 4h - Basal	p-Werte Diff 4h - Basal
1	4.21	5.04	9.78	< 0.001
2	0.30	1.20	3.46	>0.05
3	0.41	2.57	3.92	>0.05
4	1.09	1.50	3.26	>0.05

Von Versuchstag 1 zu Versuchstag 4 war eine abnehmende Tendenz der Differenzen zu erkennen. Die effektiven Anstiege der 4h-Werte zu den Basalwerten sind signifikant, wenn alle 4 Messtage zusammengenommen werden. Bei der Einzelbetrachtung aller Hunde sind die Unterschiede im Anstieg aber nur für die Hunde 5 und 7 gegeben mit p-Werten von 0.0054 bzw. 0.0119 und bei der Einzelbetrachtung aller Tage, ist der Unterschied nur für Versuchstag 1 gegeben. Für den späteren Vergleich mit der BC-Gruppe nur Versuchstag 4 herangezogen (Abb. 5).

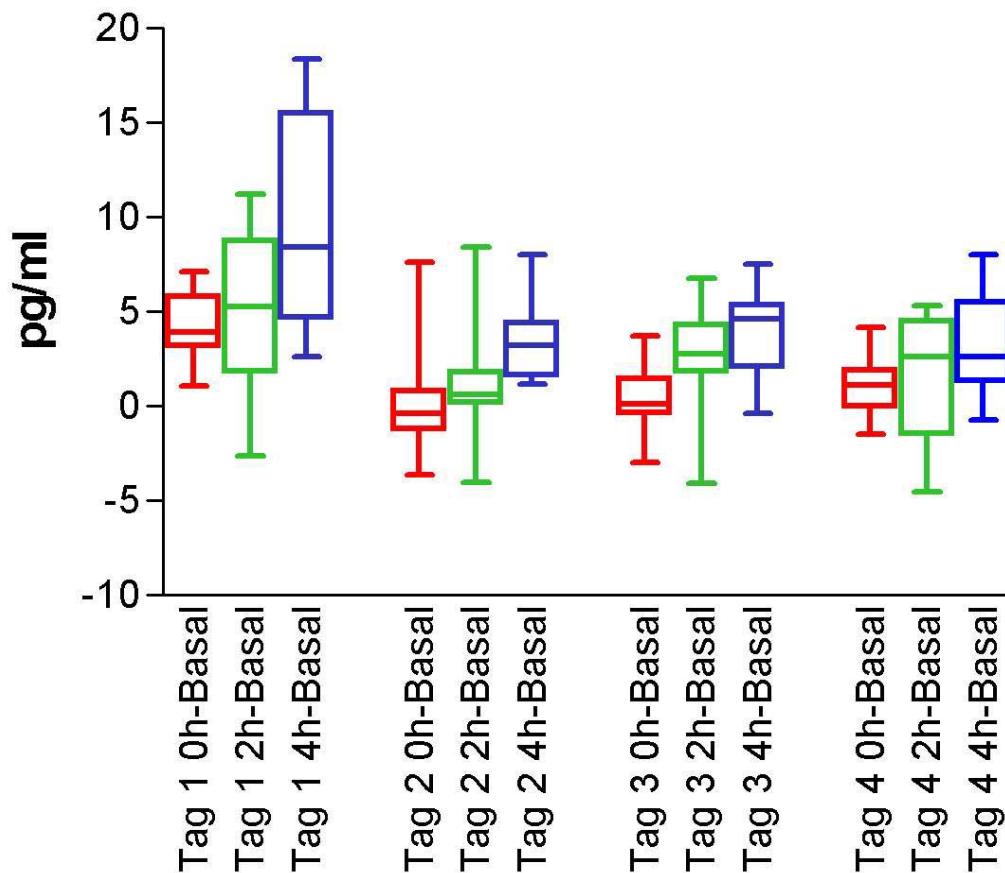


Abbildung 5: Effektive Anstiege der VEGF-Werte bei 8 mesocephalen Hunden von Tag 1 bis 4 als Differenz der Werte 0h, 2h und 4h zum Basalwert in pg/ml

4.2.2 VEGF-Werte der brachycephalen Hunde (BC)

Bei den brachycephalen Hunden wurden die Werte an einem Testtag erhoben. Die kurzfristige Belastung führte zu einem statistisch signifikanten Anstieg der VEGF-Werte (Vergleich des 4h-Wertes mit dem Basalwert, Tab. 7)

Tabelle 7: VEGF-Werte von 8 brachycephalen Hunden in pg/ml vor bzw. 0h, 2h und 4h nach kurzzeitiger Belastung

Zeit	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund5	Hund 6	Hund 7	Hund 8	Alle Hunde
Basal	11.45	6.79	0.37	4.95	4.95	12.38	4.95	9.58	6.92±4.00
0h	10.51	14.26	1.29	0.37	10.51	24.75	15.20	19.94	12.10±8.41
2h	19.94	23.79	2.20	0.37	11.45	38.46	20.90	11.45	16.07±12.43
4h	28.63	34.50	8.65	11.45	14.26	52.53	15.20	11.45	22.08±15.30

Um auch bei den brachycephalen Hunden die individuell unterschiedlichen Basalwerte bei der Reaktion auf die kurzfristige Belastung auszugleichen, wurden die Differenzen der 0h-, 2h- und 4h-Werte zum Basalwert berechnet. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Anstieg der VEGF Werte nach 4 Stunden (Tab 8.)

Tabelle 8: Differenzen der VEGF-Werte nach 0h, 2h und 4h zum Basalwert in pg/ml

Diff 0h - Basal	Diff 2h - Basal	Diff 4h - Basal	p-Wert Diff 4h - Basal
5.18	9.15	15.16	< 0.001

4.2.3 Vergleich des VEGF-Levels der MC-Gruppe und der BC-Gruppe

Zunächst wurden die Basalwerte der MC-Gruppe mit der BC-Gruppe verglichen (Abb. 6). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Die Reaktionen der beiden Gruppen auf die kurzfristige Belastung sind als Differenzen der 0h-, 2h- und 4h-Werte zum Basalwert nebeneinander in Abbildung 7 dargestellt. Die Reaktion der BC-Gruppe auf die Belastung ist unterschiedlich zur MC-Gruppe. Die Hunde der BC-Gruppe exprimieren nach 4 Stunden signifikant mehr VEGF als die Hunde der MC-Gruppe ($p = 0.003$). Der Unterschied ist bei den 0h- und 2h-Werten noch nicht sichtbar.

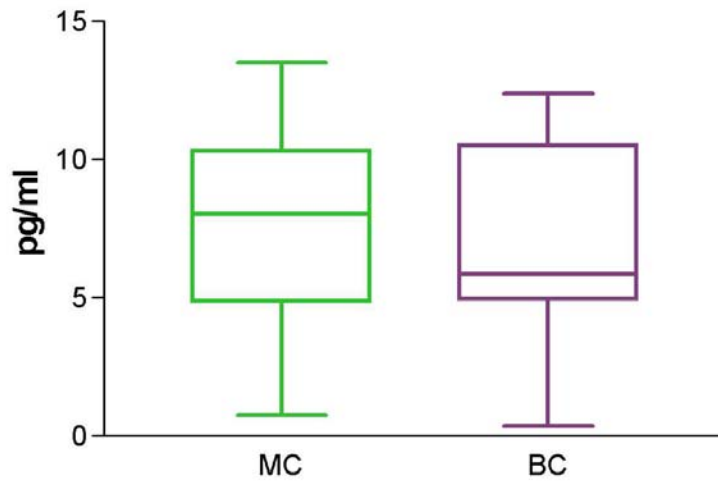


Abbildung 6: Vergleich der VEGF-Basalwerte der beiden Gruppen

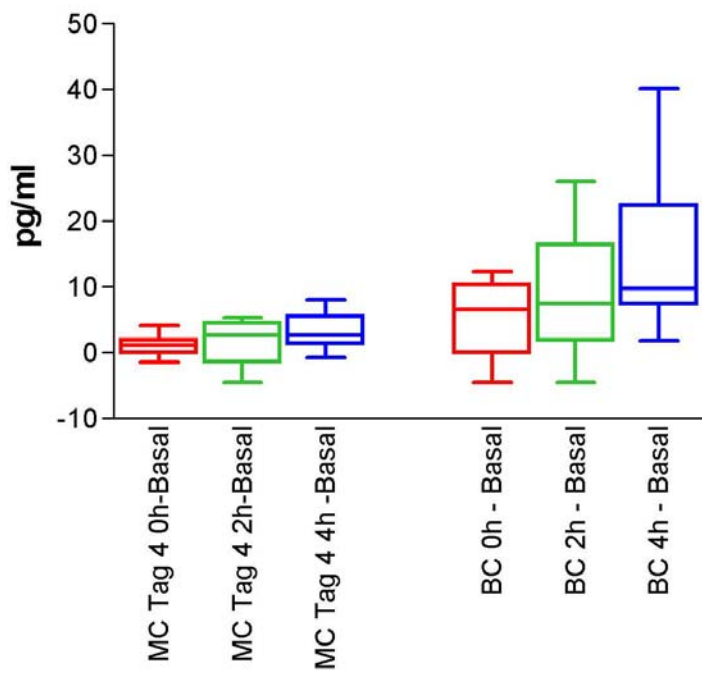


Abbildung 7: Vergleich der effektiven VEGF-Anstiege der beiden Gruppen

4.3 EPO-Werte

4.3.1 EPO-Werte der mesocephalen Hunde (MC)

Die EPO-Werte reagierten uneinheitlich auf die kurzfristige Belastung. Innerhalb von 4 Stunden konnten keine Unterschiede zwischen den Werten festgestellt werden. Es konnten auch keine Trends abgeleitet werden. Aus statistischer Sicht änderten sich die EPO-Werte bei der MC-Gruppe über die Versuchsdauer nicht (Tab. 9).

Zur Bestimmung der effektiven Anstiege wurden wieder die Differenzen der 0h-, 2h- und 4h-Werte zu den Basalwerten bestimmt. Es gab keinen signifikanten Anstieg der EPO-Werte im zeitlichen Verlauf ($p = 0.8971$).

Tabelle 9: EPO-Werte in mU/ml vor bzw. 0h, 2h und 4h nach kurzzeitiger Belastung bei 8 mesocephalen Hunden.

Tag	Zeit	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8	Alle Hunde
1	Basal	3.68	25.99	42.94	15.22	18.42	19.54	2.41	21.71	18.74±12.84
1	0h	16.60	17.18	34.01	18.89	5.71	25.27	0.24	36.14	19.26±12.51
1	2h	16.43	17.48	43.77	9.96	5.98	32.02	15.29	48.86	23.72±15.90
1	4h	9.42	6.58	47.99	19.65	11.52	26.64	0.00	38.65	20.06±16.65
2	Basal	11.06	24.18	30.08	7.27	9.45	23.87	6.89	40.80	19.20±12.46
2	0h	19.41	25.67	43.18	23.19	7.25	29.90	10.56	57.10	27.03±16.52
2	2h	20.56	26.64	37.02	12.80	7.52	27.55	13.49	50.84	21.32±14.79
2	4h	11.90	23.23	36.97	0.00	18.15	27.05	8.72	44.50	24.55±14.28
3	Basal	15.07	31.84	45.37	15.95	6.53	34.65	13.73	53.95	27.14±16.93
3	0h	10.51	28.39	36.66	17.32	15.38	24.45	18.18	58.96	26.23±25.57
3	2h	8.83	19.37	32.16	0.00	12.20	23.04	6.26	33.87	16.91±12.30
3	4h	17.78	20.63	31.98	15.07	6.97	39.03	0.36	67.82	24.96±32.32
4	Basal	18.76	17.51	58.71	13.61	15.54	44.81	6.53	64.98	30.06±22.61
4	0h	15.63	27.92	32.02	15.67	9.45	49.94	13.70	51.41	26.97±16.44
4	2h	15.63	25.71	48.92	21.89	9.28	33.01	16.43	49.97	27.61±15.23
4	4h	15.89	24.10	50.91	15.32	21.13	44.75	9.90	73.24	31.90±22.13

4.3.2 EPO-Werte der brachycephalen Hunde (BC)

Bei den brachycephalen Hunden stiegen die EPO-Werte nach der Belastung nicht signifikant an (Tab.10). Ein leichter Trend zu höheren Werten nach 4 Stunden war festzustellen. Zur Bestimmung der effektiven Anstiege wurden die Differenzen zum Basalwert bestimmt. Bei den brachycephalen Hunden konnte kein signifikanter effektiver Anstieg der EPO-Werte festgestellt werden.

Tabelle 10: EPO-Werte von 8 brachycephalen Hunden in mU/ml vor bzw. 0h, 2h und 4h nach kurzzeitiger Belastung

Zeit	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8	Alle Hunde
Basal	14.29	11.45	11.00	14.97	5.40	7.29	15.06	11.77	11.40±3.54
0h	14.31	15.41	12.31	17.14	10.72	11.01	13.94	11.77	13.32±2.26
2h	9.84	15.27	13.16	16.69	10.18	11.82	11.01	12.91	12.61±2.42
4h	11.43	15.59	14.17	23.14	13.26	15.39	12.20	7.52	14.09±4.48

4.3.3 Vergleich des EPO-Levels der MC-Gruppe und der BC-Gruppe

Zum Vergleich der EPO-Werte zwischen den beiden Gruppen wurde nur der Tag 4 der MC-Gruppe mit der BC-Gruppe verglichen. Der Basalwertvergleich zeigte, dass die MC-Gruppe einen höheren Wert aufwies als die BC-Gruppe ($p=0.021$, Abb. 8). Die Reaktion der EPO-Werte auf die kurzfristige Belastung hingegen ergab keinen Unterschied (Abb. 9). In beiden Gruppen änderte sich der EPO-Wert während der Beobachtungszeit von 4 Stunden nicht.

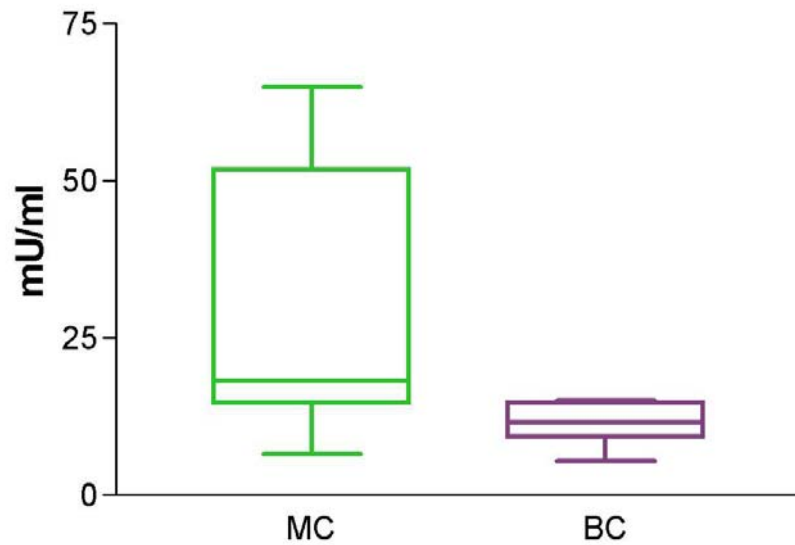


Abbildung 8: Vergleich der Basalwerte von EPO zwischen der mesocephalen und der brachycephalen Gruppe

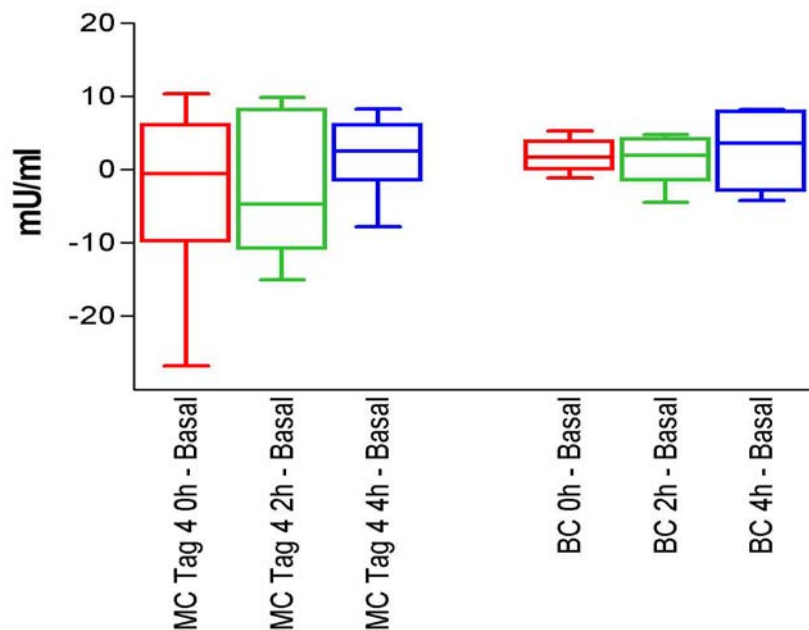


Abbildung 9: Vergleich der effektiven Anstiege der EPO-Werte der beiden Gruppen

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Das Ziel dieser Arbeit war, eine einfache Methode zur Objektivierung der Sauerstoffversorgung bei Hunden unter Belastung zu entwickeln, die klinisch anwendbar ist und ohne grossen technischen Aufwand in der Praxis durchgeführt werden kann. Auch sollte der Test für die Patienten ein akzeptables Risiko darstellen.

Viele Hunde mit oberen oder unteren Atemwegsproblemen zeigen bereits in Ruhe infolge Dyspnoe eine verminderte Sauerstoffsättigung im Blut, die dann sehr einfach mit Pulsoxymetrie verifiziert werden kann. Viele andere Patienten aber, wie zum Beispiel brachycephale Hunde, geraten erst unter Belastung in eine Hypoxie. Die Hypoxie unter Belastung bei Hunden zu messen, stellt eine gewisse Herausforderung dar.

Es existieren einige verschiedene direkte und indirekte Methoden zur Messung der Sauerstoffsättigung im Blut, die aber für unsere Fragestellung alle nicht praktikabel waren. Eine indirekte Messung ist zum Beispiel die Bestimmung von Laktat im venösen Blut. Laut einer Studie mit dem amerikanischen Foxhound (Musch *et al.* 1985) sinkt die Laktatkonzentration im venösen Blut signifikant nach mehrwöchigem Training, bleibt aber während der Belastung per se unverändert. Bei anästhesierten Hunden wurde ein signifikanter Anstieg des arteriellen Laktates während einer massiven Hypoxie bei einer Sauerstofftransportkapazität von 52% festgestellt (Stanley *et al.* 1990). Während der Belastungsprobe in unserer Studie kamen die Hunde aber nie in eine solch ernsthafte Hypoxie. Weiter wurden in einer unveröffentlichten Studie Mehrstufenbelastungstests mit Hunden am Sportmedizinischen Leistungszentrum für Pferde an der Universität Zürich durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Anstieg der Laktatkonzentration festgestellt werden (Vogt 2000). Wir haben uns auf diese Befunde gestützt, nicht für Laktatbestimmungen zum Hypoxienachweis entschieden. Die Bestimmung von HIF-1 α im Blut ist nicht möglich, da HIF-1 α ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor ist. Direkte O₂-Messungen sind die Pulsoxymetrie, die Near infrared Spectroscopy (NIRS) und die arterielle pO₂-Messung. Da nach der Belastung der O₂-Partialdruck sich sofort normalisiert, sobald der Patient wieder normal atmen kann, ist man mit der Durchführung der Pulsoxymetrie und der arteriellen pO₂-Messung nach der Belastung mit Sicherheit zu spät. Die Pulsoxymetrie müsste somit während der Belastung durchgeführt werden, was wir nach eingehender Diskussion (Padrid 2003) als nicht praktikabel erachtet haben. Zur arteriellen pO₂-Messung ist weiter anzufügen, dass sie neben dem Zeitfaktor auch praktisch nicht einfach anwendbar ist infolge mangelnder Kooperativität der Patienten. NIRS ist eine nicht invasive Methode, bei der mittels Infrarotstrahlung simultan die intravaskuläre (Hämoglobin) und die mitochondriale (Cytochrome) Oxygenierung in zwei bis sechs cm³ der Gliedmassenmuskulatur gemessen werden kann. Die Änderung der Konzentration von Oxy-, Deoxy- und Totalhämoglobin können mit einer Modifikation des Beer-Lambert-Gesetz kalkuliert werden. Die Messung an der Gliedmassenmuskulatur muss am stehenden, absolut ruhigen Patienten durchgeführt werden (Ferrari *et al.* 1997; Kawaguchi *et al.* 2001; Van Beekvelt *et al.* 2001). Diese Methode ist für die Veterinärmedizin zu teuer und auch nicht praktisch anwendbar.

Mit der Messung von VEGF und EPO, für die Testkits aus der Humanmedizin bestehen, wurde erhofft, die Grundlage einer einfachen Diagnostik entwickeln zu können, der den oben beschriebenen Anforderungen entspricht. Wir stellten die Hypothesen auf, dass die VEGF- und EPO-Konzentrationen

im Serum erst einige Zeit nach der Belastung ansteigen und auch einige Stunden in erhöhter Menge erhalten bleiben, so dass sie auch nach der Belastung noch nachgewiesen werden können. Für das VEGF ist dies gelungen, welches 4 Stunden nach der Belastung infolge einer Hypoxie signifikant anstieg. Für das EPO trifft dies nicht zu.

Für die Belastungsproben wurden die Hunde nicht auf das Laufband gebracht. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass einige Hunde auf dem Laufband stehen blieben und nicht laufen wollten, da sie Angst hatten oder weil sie das Laufband nicht kannten. Es bestand die Gefahr, dass sie sich die Pfoten am Laufband geklemmt hätten. Da der Test für klinische Patienten zur Verfügung stehen sollte, war es auch nicht möglich, diese zu trainieren, um an das Laufband zu gewöhnen. Deshalb war ein 10 Minuten langer Trab in maximalem Tempo, wenn möglich sogar mit dem eigenen Besitzer, sehr viel einfacher und stressfreier für den Hund auszuführen. Indem der Hund maximal im Trab belastet wurde, konnte man den verschiedenen Parameter der Hunde gerecht werden, so dass die Belastung im Verhältnis zu Grösse und Gewicht immer ungefähr die gleiche war. Es war uns bewusst, dass diese Belastungsmethode für die Hunde nicht die exakt gleiche Leistung produzierte, aber in Bezug auf die Umsetzbarkeit in der Praxis war sie die einfachste Methode. Im Verlaufe der Messungen wurde bemerkt, dass sich die Resultate verändern und die VEGF-Werte am ersten Versuchstag signifikant höher lagen, als an den restlichen drei Tagen. Wir schliessen dies darauf zurück, dass die Hunde am ersten Tag noch gestresst waren durch die neue Umgebung und die fremden Leute. Am ersten Tag traten auch Probleme mit dem engen und genau einzuhaltenden Zeitplan auf, bezüglich der Blutentnahmen und der Verarbeitung der Blutproben. An den folgenden Tagen waren die Hunde an uns gewohnt und unser Team war eingespielt. Weiter wurden die mesocephalen Hunde an vier Tagen getestet, um auch eine Reproduzierbarkeit der Methode zu sichern, was für die letzten drei Testtage zutrifft. Die brachycephalen Hunde wurden in ihrer gewohnten Umgebung in Anwesenheit der Besitzerin getestet. Stress der Hunde sollte also keinen Grund für den signifikanten Anstieg der VEGF-Werte gewesen sein. Da diese Hunde einer privaten Zucht angehörten, wurden sie nur an einem Versuchstag getestet.

Der untere Schwellenwert für VEGF liegt mit dem Quantikine Testkit bei 9.0 pg/ml und mit dem EPO-Trac-Testkitt bei 4.4 mU/ml. Somit lagen ein grosser Teil der VEGF- und einige wenige EPO-Messwerte der MC-Gruppe unter der zuverlässigen Nachweisgrenze. Um den unterschiedlichen Individualbasalwerten von VEGF und EPO gerecht zu werden und die effektiven Anstiege zu berechnen, wurden die Differenzen der Anstiege zu den Basalwerten benutzt. Beide von uns verwendeten Testkits für die Bestimmung der VEGF- und EPO-Konzentrationen standen für die Verarbeitung von Blutserum oder -plasma zur Verfügung. Für unsere Messungen wurde stets Blutserum verwendet. Obwohl das VEGF-Quantikine Testkit und das EPO-Trac-Testkit beide für die Humanmedizin etabliert wurden, sind diese trotzdem für Hunde verwendbar. In einer Studie von Scheidegger (Scheidegger *et al.* 1999) wurde gezeigt, dass alle Hauptisoformen von VEGF des Menschen auch beim Hund vorhanden sind. Die Aminosäuresequenzen in der Loop-Region, die verantwortlich sind für die Rezeptorbindung an menschliche Zellen, sind beim Menschen und beim Hund identisch. Die VEGF-Rezeptoren vom Menschen und vom Hund sind sehr ähnlich. Canines VEGF aktiviert humane Endothelzellen im selben Ausmass wie menschliches VEGF. Auch wird bei caninen Tumoren das VEGF im selben Ausmass überexprimiert wie beim Menschen. Die Studie zeigte aufgrund von Literatur und eigenen Untersuchungen, dass die Struktur und Funktion von VEGF beim Menschen und beim Hund sehr ähnlich sind. Von jenen Unterschieden, die in den Aminosäuresequenzen festgestellt wurden, befinden sich keine an einer Lokalisation, die relevant für die biologische Aktivität von VEGF wäre. Die Firma DiaSorin hat das EPO-Trac-Testkit für Katze,

Hund, Ratte, Maus, Pferd, Rind, Schwein, Pavian und Kaninchen getestet. Somit sind beide Testkits zuverlässig für Hunde anwendbar.

5.2 Diskussion der Resultate

5.2.1 VEGF

Bezüglich unserer Hypothesen (Kapitel 2.3) können wir nicht bestätigen, dass die Serum-VEGF-Konzentration bei mesocephalen Hunden nach kurzzeitiger Belastung signifikant ansteigt und nach vier Stunden wieder den Ausgangswert erreicht. Somit muss die erste Hypothese verworfen werden. Die zweite Hypothese ist allerdings zu bestätigen. Die VEGF-Werte der brachycephalen Gruppe stiegen nach kurzzeitiger Belastung signifikant an und waren auch noch nach vier Stunden auf einer hohen Konzentration. Es wäre in Zukunft interessant zu messen, wie der Kurvenverlauf über 24 Stunden aussehen würde, was allerdings für die Anwendung in der Praxis nicht praktikabel wäre.

Die Analyse der Resultate zeigte interessanterweise, dass man zwischen Hunden mit und ohne klinischer Ausprägung des Brachycephalensyndromes mittels Serum-VEGF unterscheiden kann. Dazu werden die Basal- und 4-Stunden-Werte nach 10 Minuten langer Belastung verglichen. Dies ist durchaus als Erfolg zu verzeichnen, da sonst bisher in der Veterinärmedizin keine anderen Parameter, wie zum Beispiel GOT, GPK und CK, die nach Belastung untersucht wurden, fähig waren, diesen Unterschied aufzudecken (Sanders *et al.* 1978). Wir stützen uns auf die Resultate von Humanstudien. Die Studie von Richardson 1999 zeigte vergleichbare Resultate, wo ein akuter Anstieg der VEGFmRNA-Konzentration in Biopsien des M. vastus lateralis nach einer einmaligen Belastung von untrainierten Personen unter normoxischen Bedingungen festgestellt wurde (Richardson *et al.* 1999). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass es bei regelmässigem Ausdauertraining nicht nur zu einer Anpassung der Erythrocytenzahl, sondern auch zu einer Zunahme der Kapillarisation, der Mitochondrienzahl und der oxidativen Enzyme in der Skelettmuskulatur kommt (Hoppeler 1986; Gustafsson und Kraus 2001).

Die Basalwerte der MC- und der BC-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant. Das ist damit zu begründen, dass unsere untersuchten brachycephalen Hunde in Ruhe nicht unter einer Hypoxie gelitten haben und somit Basalwerte in gleichem Rahmen aufweisen wie die mesocephalen Hunde. Eine Ausnahme dazu stellt Hund 4 der MC-Gruppe dar. Aufgrund seiner Probleme der oberen Atemwege befand er sich schon in Ruhe in einem Sauerstoffkapazitätsmangel, was sich in einem signifikant höheren Basalwert zeigte. Allerdings war sein VEGF-Anstieg nicht signifikant höher. Richardson unterzog in seiner Studie 1999 seine untrainierten Testpersonen zusätzlich einer systemischen Hypoxie während der Belastung und konnte keinen weiteren Anstieg der VEGFmRNA-Konzentration verzeichnen. Offenbar spielt nicht die Grösse des Anstieges der VEGF-Konzentration eine Rolle, sondern der Anstieg per se. In einer weiteren Studie müssten eine viel grössere Anzahl an Hunden mit Problemen der oberen Atemwege mittels Serum-VEGF-Messungen vor und nach kurzzeitiger Belastung untersucht werden. Die Resultate widerspiegeln aber trotzdem sehr schön die klinischen Verhältnisse.

Der Test könnte also eventuell auch für Probleme mit chronischer Hypoxie, das heisst, wenn bereits im Ruhezustand eine Hypoxie besteht, anwendbar sein. In diesen Fällen ist aber eine Pulsoxymetrie zum Beispiel einfacher anzuwenden. Der Test ist nicht spezifisch für das Brachycephalensyndrom, sondern dient allgemein zur Objektivierung der Sauerstoffversorgung. Es konnte gezeigt werden, dass ein Patient mit einem Problem der oberen Atemwege schon durch eine kleine Belastung in einen Sauerstoffmangel gerät.

5.2.2 EPO

Die EPO-Werte stiegen weder bei der MC- noch bei der BC-Gruppe signifikant an. Die Frage bleibt offen, ob die Konzentrationen nicht erst viel später ansteigen würden. Es existieren sehr viele Humanstudien über EPO im Zusammenhang mit Höhenexpositionen und weniger mit physischer Belastungen auf niedrigen Höhen. Somit sind die Vergleiche mit all diesen Studien nicht 1:1 applizierbar. Ein 24-Stunden-Monitoring wie es in einer Humanstudie durchgeführt wurden (Ge *et al.* 2002), wäre sicherlich interessant und für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet empfehlenswert. In dieser Studie wurde festgestellt, dass die EPO-Konzentrationen während vier simulierten Höhen in einer Dekompressionskammer erst nach 6 Stunden anstiegen und dann innerhalb von 24 Stunden einen signifikanten Anstieg erreichten. EPO reagiert beim Menschen sehr sensitiv auf Höhenunterschiede (Heinicke *et al.* 2003), aber eine nur kurzzeitige physische Belastung ist wahrscheinlich kein genügend grosser Stimulus für eine höhere Expression von EPO. Interessanterweise kommt es nämlich unter starker körperlicher Belastung zwar zu einem Abfall der Nierendurchblutung (Buskies 1987), jedoch konnte keine Erhöhung der EPO-Plasmaspiegel unmittelbar nach akuter Belastung bei untrainierten Personen sowie nach langandauernden Trainingsperioden festgestellt werden (Schmidt *et al.* 1991; Weight *et al.* 1992; Bodary *et al.* 1999). In Humanstudien hat man gesehen, dass bei einem Aufenthalt in Höhen von nur 1500 m bis zu extremen Höhen von 5500m schon wenige Stunden Höhenexposition ausreichen, um die EPO-Konzentration im Blut ansteigen zu lassen (Schmidt *et al.* 1991; Weight *et al.* 1992; Boning *et al.* 1997; Heinicke *et al.* 2003). Interessant ist, dass noch während eines Höhengaufenthaltes die EPO-Konzentration wieder auf fast normoxische Werte abfällt (Mairbaurl *et al.* 1990; Heinicke *et al.* 2003). Nur wenn Veränderungen in der Sauerstoffversorgung stattgefunden haben, das heisst Wechsel zwischen Meereshöhe und Gebirge, wurden EPO-Anstiege verzeichnet, die den höchsten Peak nach 2 Tagen erreichten und erst nach 11 Tagen wieder auf ursprüngliches Niveau zurückgingen (Heinicke *et al.* 2003). In der Folge interessierte uns nur noch der Basalwertvergleich zwischen den beiden Gruppen. Interessanter- und unerwarteterweise bewegten sich die Basalwerte der BC-Gruppe auf einem tieferen Niveau als die der MC-Gruppe. Eine Erklärung dazu, wieso die EPO-Werte der BC-Gruppe nicht erhöht waren, ist sicherlich, dass unsere untersuchten brachycephalen Hunde sich offenbar in Ruhe nicht in einer Hypoxie befanden und die kurzzeitige Belastung nicht ausreichte für einen Anstieg der EPO-Konzentration. Warum aber die EPO-Basalwerte der mesocephalen Hunde signifikant höher lagen als die der brachycephalen Hunde, blieb aber unklar.

5.2.3 Diskussion der Laborwerte

Insgesamt weichen die Laborwerte beider Gruppen nur wenig von der Norm ab (Tab. 3 und 4). Sowohl bei der MC-Gruppe, als auch bei der BC-Gruppe zeigten einige eine leichtgradige Anämie,

was wir auf das Alter zurückgeschlossen haben, ausgenommen bei Hund 2 der BC-Gruppe, der erst 1.5 jährig war. Von Hund 5 der BC-Gruppe war das EDTA-Blut leider im Probenröhrchen geronnen. Die Blutprobe konnte nicht wiederholt werden, da der Hund in der Zwischenzeit euthanasiert wurde. Alle Hunde, ausser Hund 8 der BC-Gruppe hatten eine leichte Hypoglykämie, die darauf schliessen lässt, dass alle Hunde nüchtern belastet wurden. Von den restlichen Laborwerten gab es verschiedene geringgradige Abweichungen, auf die wir nicht näher eingegangen sind, da sie aufgrund des subjektiven und klinischen Eindruckes der Hunde die Testresultate nicht beeinflussten sollten.

5.3 Schlussfolgerungen

Von weiterem Interesse wäre, Transferrin und Endothelin vor und nach Belastung zu bestimmen und ein 24 Stunden-Monitoring von VEGF und EPO durchzuführen.

Die VEGF-Werte der brachycephalen Hunde sind 4 Stunden nach der Belastung signifikant angestiegen. Der Basalwert unterschied sich nicht von demjenigen der mesocephalen Hunde. Offenbar verfügen brachycephale Hunde über eine gute Adaptationsfähigkeit, so dass sie unter stress- und belastungsfreier Situation sich im normoxischen Bereich befinden können. Unsere untersuchten Hunde der BC-Gruppe waren aber alle subjektiv gesund. Es wäre durchaus möglich, dass Hunde mit schwererer Ausprägung des Brachycephalensyndromes schon im Ruhezustand hypoxisch sind und erhöhte VEGF-Basalwerte aufweisen würden.

Wir kommen zum Schluss, dass wir mit der Bestimmung der Serum-VEGF-Konzentration vor und 4 Stunden nach Belastung die Grundlage für eine einfache, stressfreie und in der Praxis anwendbare Methode entwickelt haben. Mit dieser kann durch den Vergleich des VEGF 4- Stundenwertes mit dem Basalwert objektiv erkannt werden, ob ein Hund mit einem oberen Atemwegsproblem unter schon kurzer Belastung in eine Hypoxie gerät. Weiter dient sie auch zur Diagnosesicherung, ob ein der brachycephalen Rasse angehörender Hund unter dem Brachycephalensyndrom leidet oder nicht. Natürlich gibt es Extremfälle unter den brachycephalen Hunden, bei denen eine VEGF-Messung wohl nicht notwendig ist, um eine Hypoxie zu erkennen, da sie schon durch wenig Stress zyanotisch werden können. Aber nicht alle brachycephalen Hunde leiden offensichtlich unter einer Hypoxie während Stress oder Belastung. Für züchterische Aspekte und im Sinne des Tierschutzes wäre es sehr hilfreich und nötig, mit einer griffigen Methode Zahlen liefern zu können, mit welchen man bestätigen könnte, wie viele der brachycephalen Hunde prozentual tatsächlich unter einem Brachycephalensyndrom leiden. Es besteht auch die Möglichkeit, den Erfolg einer Operation der oberen Atemwege bei einem Hund mit Brachycephalensyndrom zu verifizieren. Dies wäre interessant, in einer Folgestudie zu untersuchen. Weiter könnte der Test auch hilfreich sein zur Unterscheidung, ob gewisse Rassen zu den brachycephalen Rassen gehören sollen.

6. Literaturverzeichnis

- Amis T.C. und Kurpershoek C. (1986) Tidal breathing flow-volume loop analysis for clinical assessment of airway obstruction in conscious dogs. *Am J Vet Res* 47, 1002 - 1006.
- Aron D.N. und Crowe D.T. (1985) Upper airway obstruction. General principles and selected conditions in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 15, 891-917.
- Balli A. (2004) *Radiologische Methode zur Klassifizierung der Schädeltypen und Beurteilung des Brachycephaliegrades beim Hund*. Dissertation, Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich.
- Bettschart-Wolfensberger R. (1998) Spezielle Anästhesiologie. In: *Vorlesungsunterlagen*, Zurich.
- Bodary P.F., Pate R.R., Wu Q.F. und McMillan G.S. (1999) Effects of acute exercise on plasma erythropoietin levels in trained runners. *Med Sci Sports Exerc* 31, 543-546.
- Boning D., Maassen N., Jochum F., Steinacker J., Halder A., Thomas A., Schmidt W., Noe G. und Kubanek B. (1997) After-effects of a high altitude expedition on blood. *Int J Sports Med* 18, 179-185.
- Braunwald (1987) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill.
- Brehm H., Loeffler K. und Komeyli H. (1985) Schädelformen beim Hund. *Zbl Vet Med C Anat Histol Embryol* 14, 324-331.
- Buskies (1987) *Ueber das Verhalten des Blutvolumens in Lunge, Herz, Leber, Niere und Gehirn während dosierter Arbeit bei Luft- und Sauerstoffatmung*, Konstanz.
- Camenisch G., Stroka D.M., Gassmann M. und Wenger R.H. (2001) Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Eur J Physiol* 443, 240-249.
- Cockman M.E., Masson N., Mole D.R., Jaakkola P., Chang G.W., Clifford S.C., Maher E.R., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. und Maxwell P.H. (2000) Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275, 25733-25741.
- Coolman B.R., Marretta S.M., McKiernan B.C. und Zachary J.F. (1998) Choanal atresia and secondary nasopharyngeal stenosis in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 34, 497-501.
- Dahme E. (1988) Stütz- und Bewegungsapparat. In: *Grundriss der speziellen Anatomie der Haustiere*, Hrsg.: E. Dahme und E. Weiss, Enke Verlag, Stuttgart. pp 314 - 351.
- El Awad B., Kreft B., Wolber E.M., Hellwig-Burgel T., Metzen E., Fandrey J. und Jelkmann W. (2000) Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int* 58, 43-50.
- Evans H.E. (1993) *Millers' anatomy of the dog*, 3 Ausg., WB Saunders Company, Philadelphia.
- Ferrara N. (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis (Review). *Kidney Int* 56, 794-814.
- Ferrara N. und Davis-Smyth T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25.
- Ferrari M., Binzoni T. und Quaresima V. (1997) Oxidative metabolism in muscle. *Phil Trans R Soc Lond B* 352, 677-683.
- Gassmann M. (2001) Sauerstoffmangel und Erythropoietin. *Schweiz Arch Tierheilk* 143, 455-460.
- Ge R.L., Witkowski S., Zhang Y., Alfrey C., Sivieri M., Karlsen T., Resaland G.K., Harber M., Stray-Gundersen J. und Levine B.D. (2002) Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 92, 2361-2367.

- Greusing B. und Grossenbacher R. (1986) Inspiratory stridor. A review. *Schweiz Rundsch Med Prax* 75, 543-547.
- Gustafsson T. und Kraus W.E. (2001) Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Front Biosci* 6, D75-89.
- Hardie E., Ramirez O., Clary E.M., Kornegay J.N., Correa M.T., Feimster R.A. und Robertson E.R. (1998) Abnormalities of the thoracic bellows: stress fractures of the ribs and hiatal hernia. *J Vet Intern Med* 12, 279-287.
- Harvey C.E. (1982a) Upper airway obstruction surgery 2: Soft palate resection in brachycephalic dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 18, 538-544.
- Harvey C.E. (1982b) Upper airway obstruction surgery 8: Overview of Results. *J Am Anim Hosp Assoc* 18, 567-569.
- Heinicke K., Prommer N., Cajigal J., Viola T., Behn C. und Schmidt W. (2003) Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man. *Eur J Appl Physiol* 88, 535-543.
- Heinicke K. T.H., R.H. Wenger, M. Gassmann (2002) Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* Jahrgang 53, Nr.10, 270 -276.
- Hobson H.P. (1995) Brachycephalic syndrome. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 10, 109-114.
- Hoppeler H. (1986) Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 7, 187-204.
- Hoppeler H. und Vogt M. (2001) Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol* 204, 3133-3139.
- Huang L.E., Gu J., Schau M. und Bunn H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S. und Kaelin W.G., Jr. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Kriegsheim A., Hestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W. und Ratcliffe P.J. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.
- Jelkmann W. (2001) Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 47, 617-623.
- Jerram R. und Fossum T. (1997) Tracheal collapse in dogs. *Comp Contin Educ Pract Vet* 19, 1049-1052.
- Jewell U.R., Kvietikova I., Scheid A., Bauer C., Wenger R.H. und Gassmann M. (2001) Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB* 15, 1312 - 1314.
- Kawaguchi K., Tabusadani M., Sekikawa K., Hayashi Y. und Onari K. (2001) Do the kinetics of peripheral muscle oxygenation reflect systemic oxygen intake ? *Eur J Appl Physiol* 84, 158-161.
- Klinke R. und Silbernagl S. (1996) *Lehrbuch der Physiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Knecht C.D. (1979) Upper airway obstruction in brachycephalic dogs. *Comp Cont Educ Pract Vet* 1, 25-31.

- Koch D. (2004) Untersuchungen zur Pathophysiologie des Brachycephalensyndromes beim Hund. In: *Tagung Frankfurter Kreis*, Frankfurt am Main.
- Lorinson D., Bright R.M. und White R.A.S. (1997) Brachycephalic airway obstruction syndrome - a review of 118 cases. *Canine Practice* 22, 18 - 21.
- Lung M.A., Phipps R.J., Wang J.C. und Widdicombe J.G. (1984) Control of nasal vasculature and airflow resistance in the dog. *J Physiol* 349, 535-551.
- Mairbaurl H., Schobersberger W., Oelz O., Bartsch P., Eckardt K.U. und Bauer C. (1990) Unchanged in vivo P50 at high altitude despite decreased erythrocyte age and elevated 2,3-diphosphoglycerate. *J Appl Physiol* 68, 1186-1194.
- Masson N., Willam C., Maxwell P.H., Pugh C.W. und Ratcliffe P.J. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J* 20, 5197-5206.
- Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R. und Ratcliffe P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271-275.
- McCaffrey T.V. und Kern E.B. (1979) Response of nasal airway resistance to hypercapnia and hypoxia in the dog. *Acta Otolaryngol* 87, 545-553.
- Montavon P.M. (2000) Le syndrome brachycephalique. In: *Proceedings, 1ères recontres Franco-Suisses*, Lausanne.
- Musch T.I., Haidet G.C., Ordway G.A., Longhurst J.C. und Mitchell J.H. (1985) Dynamic exercise training in foxhounds. I. Oxygen consumption and hemodynamic responses. *J Appl Physiol* 59, 183-189.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S. und Poltorak Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13, 9-22.
- Nickel R., Schummer A. und Wille K.H. (1984) Passiver Bewegungsapparat, Skelettsystem. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 1, Bewegungsapparat*, 5. Ausg., Hrsg.: R. Nickel, A. Schummer und E. Seiferle, Paul Parey, Berlin, Hamburg. pp 11 - 229.
- Ohh M., Park C.W., Ivan M., Hoffman M.A., Kim T.Y., Huang L.E., Pavletich N., Chau V. und Kaelin W.G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2, 423-427.
- Ohnishi T. und Ogura J.H. (1969) Partitioning of pulmonary resistance in the dog. *Laryngoscope* 79, 1847-1878.
- Ohnishi T., Ogura J.H. und Nelson J.R. (1971) Effects of nasal obstruction upon the mechanics of the lung in the dog. *Laryngoscope* 81, 220-225.
- Orsher R.J. (1993) Brachycephalic airway disease. In: *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery*, Hrsg.: J. Bojrab.
- Padrid P. (2003) *Personal communication*, Milano.
- Regodon S., Vivo J.M., Franco A., Guillen M.T. und Robina A. (1993) Craniofacial angle in dolicho-, meso- and brachycephalic dogs: radiological determination and application. *Anat Anz* 175, 361-363.
- Richardson R.S., Wagner H., Mudaliar S.R., Henry R., Noyszewski E.A. und Wagner P.D. (1999) Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *Am J Physiol* 277, H2247-2252.
- Rosaspina M. (2003) *Beobachtungen am oberen Atemapparat bei einer Population von Norwich-Terriern*, University of Zurich, Zurich (in preparation).

- Salceda S. und Caro J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-22647.
- Sanders M., White F.C., Peterson T.M. und Bloor C.M. (1978) Effects of endurance exercise on coronary collateral blood flow in miniature swine. *Am J Physiol* 234, H614-619.
- Scheidegger P., Weiglhofer W., Suarez S., Kaser-Hotz B., Steiner R., Ballmer-Hofer K. und Jaussi R. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. *Biol Chem* 380, 1449-1454.
- Schmidt W., Eckardt K.U., Hilgendorf A., Strauch S. und Bauer C. (1991) Effects of maximal and submaximal exercise under normoxic and hypoxic conditions on serum erythropoietin level. *Int J Sports Med* 12, 457-461.
- Schmidt-Nielsen K., Bretz W.L. und Taylor C.R. (1970) Panting in dogs: unidirectional air flow over evaporative surfaces. *Science* 169, 1102-1104.
- Singleton W.B. (1962) Partial velum palatiectomy for relief of dyspnea in brachycephalic breeds. *J Small Anim Pract* 3, 215-216.
- Stanley W.C., Mazer C.D., Neese R.A., Wisneski J.A., Cason B.A., Demas K.A., Hickey R.F. und Gertz E.W. (1990) Increased lactate appearance and reduced clearance during hypoxia in dogs. *Horm Metab Res* 22, 478-484.
- Stroka D.M., Burkhardt T., Desbaillets I., Wenger R.H., Neil D.A., Bauer C., Gassmann M. und Candinas D. (2001) HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *Faseb J* 15, 2445-2453.
- Tanimoto K., Makino Y., Pereira T. und Poellinger L. (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J* 19, 4298-4309.
- Toombs J.P. und Hardy R.M. (1981) Neurologic signs associated with congenital anomalies in a Yorkshire terrier. *Vet Med Small Anim Clin* 76, 207-214.
- Van Beekvelt M.C.P., Collier W.N.J.M., Wevers R.A. und Van Engelen B.G.M. (2001) Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O₂ consumption and blood flow in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90, 511-519.
- Venker-van Haagen A. (1992) Chronische Erkrankungen der oberen Atemwege. In: *Proceedings SVK Tage*, Lausanne. pp 111 - 113.
- Verhaert L. (2001) Oral pathologies. In: *Handbook of canine and feline dentistry*, Hrsg.: C. Gorrel, P. Hennet und L. Verhaert, Choc Pub, Nice. pp 23-49.
- Vogt R. (2000) Mehrstufenbelastungstest und Laktatspiegel bei drei Hunden. *Persönliche Mitteilung, Sportmedizinisches Leistungszentrum Zürich*.
- Weight L.M., Alexander D., Elliot T. und Jacobs P. (1992) Erythropoietic adaptations to endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64, 444-448.
- Wenger R.H. und Gassmann M. (1997a) Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378, 609-616.
- Wenger R.H. und Gassmann M. (1997b) Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378, 609-616.
- Willemse T. (1991) *Clinical dermatology of dogs and cats*, Bunge, Utrecht.
- Wilson F.D., Rajendran E.I. und David G. (1960) Staphylococcal infection in a dachshound. *Indian Vet J* 37, 639-642.

Wykes P.M. (1991) Brachycephalic airway obstructive syndrome. *Probl Vet Med* 3, 188-197.

Wynendaele W., Derua R., Hoylaerts M.F., Pawinski A., Waelkens E., de Bruijn E.A., Paridaens R., Merlevede W. und van Oosterom A.T. (1999) Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: a key to study an angiogenic marker in vivo? *Ann Oncol* 10, 965-971.

7. Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, herzlich bedanken:

Herrn Dr. med. vet. Diplomate ECVS D. Koch für die Leitung des Projektes und die hilfreiche Unterstützung der Durchführung der Versuche und zur Erstellung der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. P. M. Montavon für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Übernahme des Referates,

Herrn Prof. Dr. M. Gassmann für die kompetente fachliche Beratung und die Übernahme des Korreferates,

Frau Dr. M. Wergin und Herrn Dr. B. Grenacher für die Hilfe bei den Laboruntersuchungen und teils Durchführung der Analysen,

Frau PD Dr. S. Arnold für die Initialisierung des Gesamtprojektes,

Frau L. Mordasini für die zur Verfügung gestellten brachycephalen Hunde aus ihrer Zucht,

Herrn Dr. R. Weilenmann, Roche AG Basel, für die zur Verfügung gestellten mesocephalen Hunde,

Frau N. Nad und Frau M. Rosaspina für die engagierte Mithilfe während den Belastungsproben der mesocephalen Hunde,

Frau M. Roos für ihre Berechnungen und die Hilfe für den statistischen Teil der Arbeit,

Herrn Dr. med. vet. Diplomate ECVS U. Rytz für die Unterstützung beim Erstellen des Vortrages zur öffentlichen Präsentation dieser Arbeit,

Herrn M. Haab für die Gestaltung der Grafiken.

Lebenslauf

Name	Judith Wenk
Geburtsdatum	10. Februar 1970
Geburtsort	Tal
Nationalität	Schweiz
Heimatort	Ebnat-Kappel (SG)
April 1977 - April 1983	Primarschule Goldach
April 1983 - April 1986	Sekundarschule Goldach
April 1986 - April 1988	Diplommittelschule Talhof St. Gallen Abschluss: Diplom
April 1988 - April 1991	Schule für medizinische Laboranten und Laborantinnen Kantonsspital St. Gallen Abschluss: Diplom
Feb. 1992 - Aug. 1995	Interstaatliche Maturitätsschule für Erwachsene St. Gallen, berufsbegleitend Abschluss: Maturität Typus B
Okt. 1995 - Okt. 2000	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich Abschluss: Staatsexamen an der Universität Zürich
Feb. 2001 - März 2001	Praktikum auf der Dermatologie im „Melbourne Veterinary Specialist Center“, 70 Blackburn Road, Glen Waverley, 3150 Vic Australien,
April 2001	Praktikum in Kleintierpraxis in der „Ascot Veterinary Surgery“, 223 Lancaster Road, Ascot, Brisbane, QLD 4007, Australien
Okt. 2001 - März 2003	Assistentin zu 60% in Gemischtpraxis bei Dr. med. vet. H. Maurer Turenmattenstr. 8, 3860 Meiringen Tätigkeit: vor allem Betreuung der Kleintierpraxis
April 2003 - Juni 2004	Assistentin am Tierspital Bern, Internship in der Kleintierklinik mit Rotationen in den Abteilungen Radiologie, Anästhesie, Neurologie, Innere Medizin und Chirurgie