

**AUS DER ABTEILUNG FÜR KLINISCHE CHEMIE
UND MOLEKULARE DIAGNOSTIK**

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

- Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Harald Renz -

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Die Kurzzeitstabilität von BNP und NTproBNP in der Präanalytik

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich der Humanmedizin der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

Vorgelegt von

Anna Christina Dillmann aus Frankfurt am Main

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am 03.07.2008.
Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. H. G. Wahl
1. Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Koch

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Albert, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Behr, Berger, Besedovsky, Bien, Büch, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dünne, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Engenhardt-Cabillic, Feiber, Fuchs, Garten, Geks, Gemsa, Gerdes, Görg, Gress, Grzeschik, Grimm, Groß, Gudermann, Hadji, Hamer, Happle, Hartmann, Hasilik, Hertl, Hofbauer, Hofmann, Hörle, Hoyer, Ihm, Jacob, Jaques, Jones, Kalder, Kann, Kanngiesser, Kill, Kim-Berger, Klaus, Kleine, Klenk, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kühnert, Langer, Lemke, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mann, Martin, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller, Mutters, Neubauer, Netter, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Peter, Quante, Rehder, Reinartz, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rose, Rosenow, Rothmund, Rucholtz, Rupp, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schmitt, Schmitz, Schnabel, Schneider, Schultz, Schunck, Seitz, Sommer, Steiniger, Stiewe, Stiletto, Stempel, Sure, Tebbe, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Wahl, Waldegger, Weihe, Werner, Wiegandt, Wulf

Meine akademischen Lehrer in Frankfurt waren die Herren:

Bechstein, Bentas, Caspary, Cerovac, Faust, Frank , Holtmeier, Jonas, Marzi, Möller, Moritz, Probst, Stein, Teupe, Trojan, Walcher, Wedel, Wetzel

DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. Dr. Wahl danke ich für die Vergabe des Themas, die Unterstützung und Betreuung der Arbeit während ihrer gesamten Entstehung.

Besonderen Dank gilt den netten und immer hilfsbereiten Medizinisch Technisch Angestellten des Zentrallaboratoriums der Universitätsklinik Marburg, insbesondere Frau Scheckel und Frau Schneider. Sie haben die Arbeitsatmosphäre im Labor durch ihre unkomplizierte und freundliche Art jederzeit angenehm gemacht. Vielen Dank für die Hilfe, Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Einen persönlichen Dank möchte ich Marco Gleixner, Miriam Hachelaf und Stefan Grünewald aussprechen, die mir bei der Erstellung der Abbildungen bzw. der Formatierung der Arbeit geholfen haben.

Meiner Familie und Marco Gleixner danke ich für den Beistand, die Förderung meiner Motivation und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	<u>Die natriuretischen Peptide</u>	1
1.2	<u>Aufbau der natriuretischen Peptide</u>	1
1.3	<u>BNP und NTproBNP</u>	3
1.3.1	<u>Synthese</u>	3
1.3.2	<u>Rezeptoren</u>	4
1.3.3	<u>Abbau der natriuretischen Peptide</u>	5
1.3.4	<u>Wirkung der Dialyse auf BNP und NTproBNP</u>	5
1.3.5	<u>Wirkung auf verschiedene Organsysteme</u>	6
1.4	<u>Natriuretische Peptide in der Diagnostik</u>	8
1.4.1	<u>Krankheitsbild der Herzinsuffizienz</u>	8
1.4.2	<u>Methoden zur Messung der natriuretischen Peptide</u>	9
1.4.3	<u>Referenzwerte</u>	11
1.4.4	<u>Veränderungen im Alter</u>	12
1.4.5	<u>Unterschiede zwischen Frauen und Männern</u>	13
1.4.6	<u>Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen</u>	13
2	<u>FRAGESTELLUNG</u>	15
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
3.1	<u>Material</u>	16
3.1.1	<u>Probandenbeschreibung</u>	16
3.1.2	<u>Blutentnahme, -material und -gefäße</u>	16
3.1.3	<u>Trasyolol® 500 000 KIE als Stabilisator</u>	17
3.2	<u>Labormethoden</u>	17
3.2.1	<u>Probenverarbeitung</u>	17
3.2.2	<u>BNP-Messung: ADVIA Centaur (Bayer)</u>	18
3.2.3	<u>NTproBNP-Messung: Elecsys 2010 (Roche)</u>	21
3.3	<u>Statistik</u>	24
4	<u>ERGEBNISSE</u>	25
4.1	<u>BNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)</u>	26
4.2	<u>Statistische Auswertungen der BNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)</u>	28

4.3	NTproBNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)	34
4.4	Statistische Auswertungen der NTproBNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)	37
4.5	BNP-Messungen bei Intensiv- und Dialysepatienten	43
4.6	Statistische Auswertungen der BNP- und NTproBNP-Messungen bei Intensiv- und Dialysepatienten	45
5	DISKUSSION	49
5.1	Stabilitätsmessungen: BNP	49
5.2	Stabilitätsmessungen: NTproBNP	51
5.3	Diagnostische Relevanz	52
5.4	Therapeutische Relevanz	54
5.5	Relevanz der in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse	55
6	TABELLENVERZEICHNIS	57
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	60
9	LITERATURVERZEICHNIS	61
10	ANHANG	65

1 EINLEITUNG

1.1 Die natriuretischen Peptide

Die natriuretischen Peptide sind Hormone, die den Flüssigkeitshaushalt des menschlichen Organismus regulieren. Zur Familie der Peptide gehören das atriale natriuretische Peptid oder Atriopeptin (ANP), das „brain natriuretic peptide“ oder B-Typ natriuretisches Peptid (BNP), das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), Urodilatin, Guanylin und Uroguanylin. Eine Vermehrung des extrazellulären Volumens (EZV) stellt den Stimulus für die Sekretion der Peptide dar. Durch Steigerung der glomerulären Filtration und Hemmung der Natriumreabsorption an den Sammelrohren bewirken sie die vermehrte Ausscheidung von Salzen, und damit eine Steigerung der Diurese. Außerdem werden den natriuretischen Peptiden weitere, den Kreislauf entlastende Wirkungen zugeschrieben, wie zum Beispiel eine Erhöhung von Herzfrequenz, Vor- und Nachlast, die Senkung des Blutdrucks, Vasodilatation und eine Zunahme der Kapillarpermeabilität. [3, 26]

Das B-Typ natriuretische Peptid oder „brain natriuretic peptide“ (BNP) wurde zuerst 1988 von T. Sudoh et al. aus Hirngewebe von Schweinen extrahiert [4]. Dies führte zu dem im medizinischen Sinne nicht ganz korrekten Namen. Mittlerweile ist bekannt, dass BNP und sein Spaltprodukt NTproBNP in viel größeren Mengen im Ventrikelmyokard als im Hirngewebe synthetisiert werden [4,40,59].

1.2 Aufbau der natriuretischen Peptide

Die Struktur der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP enthält einen Ring aus 17 Aminosäuren, von denen 11 homolog sind. An diesem Ring hängen jeweils zwei Aminosäureketten mit für jedes Peptid unterschiedlicher Länge.

BNP setzt sich aus insgesamt 32 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 3,5 kDa. Es stammt hauptsächlich aus dem Ventrikelmyokard. ANP, das atriale natriuretische Peptid, wird vor allem im Myokard der Vorhöfe gebildet. Es besteht aus 28 Aminosäuren. Die beiden Moleküle werden verstärkt bei erhöhtem kardialen Stress beziehungsweise bei Hypervolämie aus ihren Ursprungszellen freigesetzt.

CNP setzt sich aus 22 Aminosäuren zusammen und wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem synthetisiert, wo es Salzhunger sowie Durst mitbestimmt.

Der Vollständigkeit halber zu erwähnen sind hier auch Guanylin, aus 15 Aminosäuren bestehend, und Uroguanylin, aus 16 Aminosäuren bestehend, ebenfalls verwandte Peptide.

Diese werden primär im Gastrointestinaltrakt produziert und regulieren dort den Salz- und Wassertransport über die Mukosa [4, 40, 42].

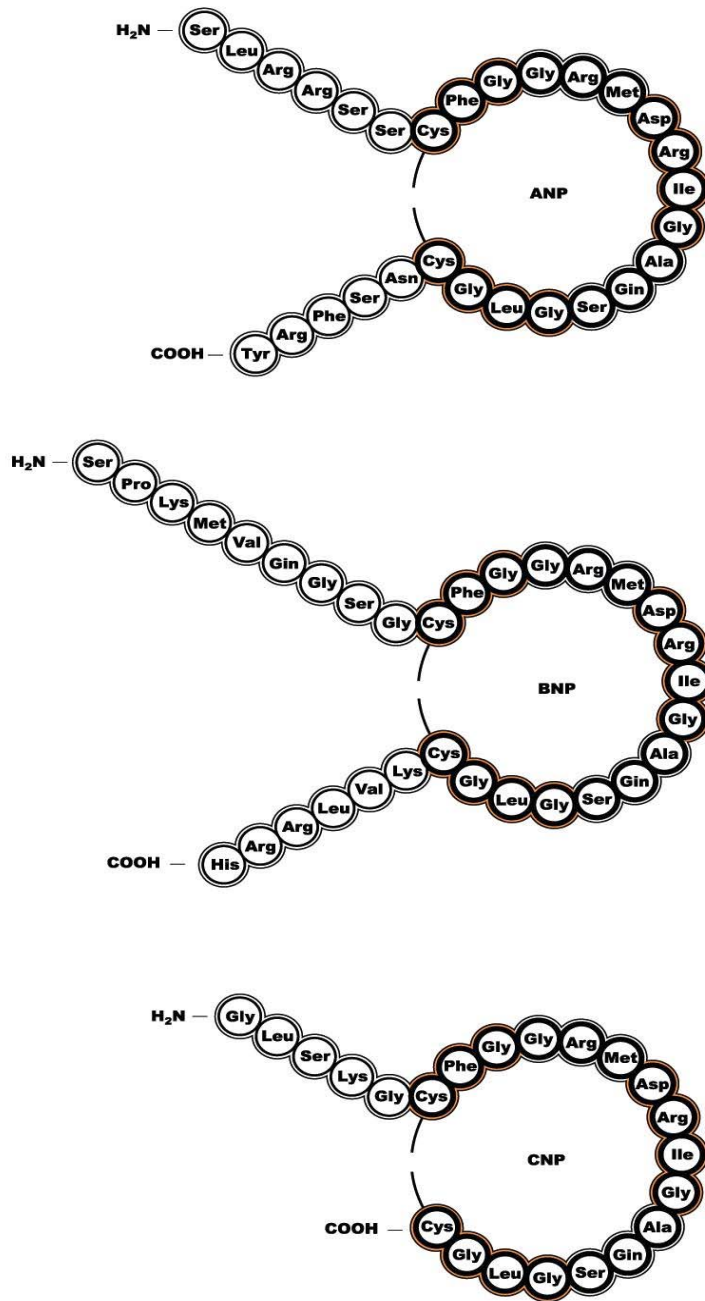


Abbildung 1: Struktur der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP [16,38,39]

Abbildung 1 zeigt den strukturellen Aufbau der natriuretischen Peptide. Allen gemeinsam ist der Aminosäurering. Ganz oben ANP, dessen Aminosäureketten beinahe gleichlang sind (fünf bzw. sechs AS). In der Mitte BNP, das größte der drei abgebildeten Peptide, und unten CNP, welches über nur eine Aminosäurekette verfügt.

1.3 BNP und NTproBNP

1.3.1 Synthese

BNP wird, im Gegensatz zu ANP, das sowohl in den Atrien als auch in den Ventrikeln gebildet wird, hauptsächlich in den Myozyten der Ventrikel synthetisiert [41]. Die Ursachen für eine vermehrte Sekretion der beiden sehr ähnlichen natriuretischen Peptide sind die gleichen. Nimmt das Volumen und die Wandspannung der Ventrikel zu, wirkt dieser Dehnungsreiz als Mechanismus für die Induktion der mRNA von preproBNP [49]. Bestimmte Moleküle verlängern in dieser Situation die Halbwertszeit der mRNA, wodurch mehr transkribiert werden kann [40]. Als Vorstufe wird zuerst das länger-kettige preproBNP mit 132 Aminosäuren erzeugt, welches aber zugleich durch Proteasen gespalten wird. So entsteht das Vorläuferprotein proBNP mit 108 Aminosäuren. Übrig bleibt dabei ein Signalpeptid von 26 Aminosäuren. Bei der Sekretion aus den Myozyten erfolgt eine weitere proteolytische Spaltung: proBNP wird zu dem 32 Aminosäuren langen BNP und damit von seinem aminoterminalen Abschnitt, dem 76 Aminosäuren langen NTproBNP, getrennt.

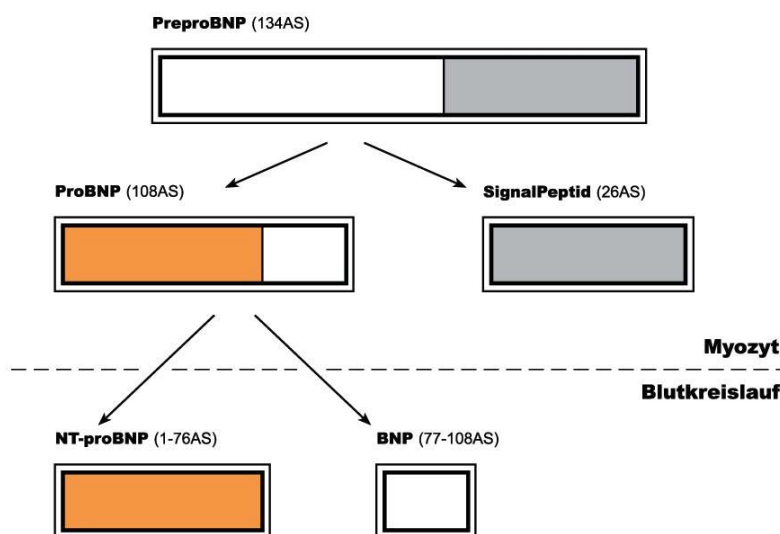


Abbildung 2: Synthese von BNP und NTproBNP (schematisch) [38, 39, 40, 41]

Das biologisch aktive BNP enthält die Ringstruktur. Es hat eine Halbwertszeit von 20 Minuten. Das biologisch inaktive NTproBNP dagegen hat eine Halbwertszeit von 120 Minuten. Beide Moleküle werden sezerniert und zirkulieren im Plasma [20, 41, 42].

1.3.2 Rezeptoren

Die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP wirken über drei bekannte Rezeptoren („natriuretic peptide receptor“ = NPR), an die sie mit hoher Affinität binden: NPR-A, NPR-B und NPR-C. Sie tragen auch den Namen „membrane-associated particulate guanylyl cyclase receptors“ (GC).

NPR-A und -B sind strukturell sehr ähnlich: ihre extrazellulären, ligand-bindenden Domänen sind zu 44% homolog. Ihre Hauptaufgabe ist die Weiterleitung der physiologischen Aktivitätssignale der natriuretischen Peptide im Zellinneren. NPR-A, der primär in großen Blutgefäßen vorkommt, bindet sowohl ANP als auch BNP, während NPR-B, welcher vorwiegend im Gehirn gefunden wird, vornehmlich CNP bindet. Beide sind auch in den Nebennieren und den Nieren zu finden.

Die Rezeptoren enthalten ein einziges membranüberspannendes Segment, das den extra- und den intrazellulären Raum miteinander verknüpft. Bindet ein natriuretisches Peptid an seinen Rezeptor, wird die ATP-abhängige Aktivität der Guanylatzyklase des Rezeptors stimuliert. Dadurch wird Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt. Das entstandene cGMP aktiviert dann die cGMP-abhängige Proteinkinase G oder einige Phosphodiesterasen, wodurch die biologischen Effekte der natriuretischen Peptide, wie zum Beispiel die Natriuresis, initialisiert werden [38, 56].

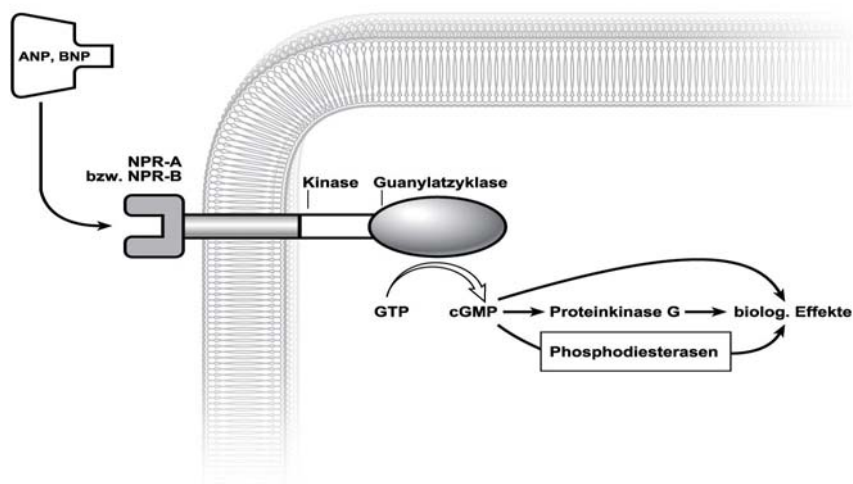


Abbildung 3: Natriuretische-Peptid-Rezeptoren A und B [38, 43, 56]

1.3.3 Abbau der natriuretischen Peptide

Der dritte, bereits genannte Rezeptor, NPR-C, bindet die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP mit gleicher Affinität und sorgt für ihre Elimination aus dem Blutkreislauf. Er ist ein homodimeres Protein, in dem jedes Monomer ein membranübergreifendes Segment enthält. Sobald eines der Peptide mit ihm einen Ligand-Rezeptor-Komplex bildet, wird es durch Endozytose aufgenommen und enzymatisch abgebaut. Der natriuretische Peptidrezeptor Typ C gelangt danach wieder zurück an die Oberfläche der Zellmembran, wo er erneut in die Zellstruktur integriert wird, um neuerlich Peptidbindungen einzugehen [38, 40].

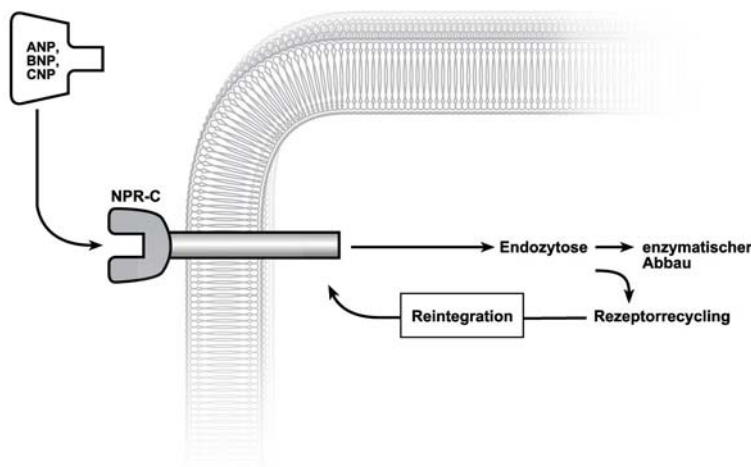


Abbildung 4: Natriuretischer-Peptid-Rezeptor C [38]

Außerdem wird vermutet, dass die natriuretischen Peptide ANP und BNP auch auf einem alternativen Weg abgebaut werden können. Die im extrazellulären Raum befindlichen neutralen Endopeptidasen, welche in Blutgefäßen und den Nieren vorkommen, inaktivieren und bauen die natriuretischen Peptide durch Spaltung ebenfalls ab. Dies wurde bei Schafen nachgewiesen [11, 38]. Zudem wird eine renale Ausscheidung der Peptide diskutiert. Folgerichtig kommt es bei Nierenfunktionsstörungen oder -versagen zu einem Anstieg von BNP und NTproBNP im Blut [42].

1.3.4 Wirkung der Dialyse auf BNP und NTproBNP

Besonders bei Patienten mit eingeschränkter beziehungsweise fehlender Nierenfunktion kann man die Bedeutung der Niere im Eliminationsweg der natriuretischen Peptide nachweisen. Bei ihnen findet eine Kumulation der natriuretischen Peptide statt. Durch das mechanische Verfahren der Blutreinigung (Hämodialyse) können die BNP- und NTproBNP-Konzentrationen

im Plasma signifikant gesenkt werden. Durch eine dreistündige Hämodialyse fällt BNP durchschnittlich um 15 – 30 % ab, was die Annahme einer renalen Elimination stützt [42]. Je nach verwendeter Dialysemembran kann die NTproBNP-Konzentration aber auch ansteigen, nämlich bei low-flux Membranen. Dies kann man mit dem größeren Molekulargewicht (8,5 kDa für BNP gegenüber 3,5 kDa) und der längeren Halbwertszeit (40-100 min. länger) des NTproBNP erklären.

Die BNP- und NTproBNP-Konzentrationen im Plasma von Dialysepatienten sind auch nach der Dialyse immer noch höher als in gesunden Kontrollgruppen. Dabei sind die Werte von BNP niedriger als die von NTproBNP, da letzteres vermutlich ausschließlich glomerulär filtriert beziehungsweise eliminiert wird. Besteht bei der genannten Patientengruppe außerdem eine Herzinsuffizienz, dann korrelieren die erhöhten Werte der natriuretischen Peptide signifikant mit einer linksventrikulären Hypertrophie und der Pumpfunktion des Herzens. Das heißt, dass sowohl hohe BNP- als auch NTproBNP-Werte ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko anzeigen. Das gleiche gilt für erhöhte ANP-Konzentrationen.

Die direkte Beziehung zwischen Plasma-BNP vor und nach Dialyse und der Flüssigkeitsretention kann den Grad der Überwässerung bei chronisch dialysierten Patienten nachweisen. Auch hier besteht eine direkte Korrelation. Die Volumenvermehrung kann ursächlich für eine Hypertonie und eine daraus resultierende linksventrikuläre Funktionsstörung sein [1, 47, 48, 60, 64, 71].

1.3.5 Wirkung auf verschiedene Organsysteme

Die Bedeutung der natriuretischen Peptide im menschlichen Organismus erklärt sich durch ihre Wirkung auf mehrere Organe gleichzeitig. Hierdurch werden die erwünschten diuretischen, natriuretischen und vasodilatatorischen Effekte und damit das angestrebte Flüssigkeitsgleichgewicht schnellstmöglich erreicht.

Die natriuretischen Peptide haben sowohl autokrine als auch parakrine Wirkungen auf das Myokard, wie zum Beispiel: Regulation des Myozytenwachstums, Hemmung der Fibroblastenproliferation, zellprotektive Funktion bei Myokardischämie und Einfluss auf Proliferation und Kontraktilität des Gefäßendotheliums der Koronarien sowie in der Peripherie [18]. Ein gewisser Wachstumseffekt der natriuretischen Peptide in Gefäßwänden bei Arteriosklerose und Hypertonie wird ebenfalls diskutiert. Die Peptide besitzen antimitogene Wirkungen auf das kardiovaskuläre System und andere Organe. ANP zum Beispiel unterdrückt in Gefäßmuskelzellen signifikant sowohl die Zellproliferation als auch die Angiotensin II-induzierte RNA- und Proteinsynthese und reduziert damit einhergehend die Zellgröße. Hierbei wirkt ANP über die Aktivierung des ANP-Rezeptors, der an eine Guanylatzyklase gebunden ist. Somit antagonisieren die natriuretischen Peptide eine Gefäßverkalkung. An kultivierten glatten Muskelzellen aus Rattenaorten konnte man zeigen, dass ANP die Zellproliferation unterdrückt, indem es den Einbau von Uridin und Leucin bei der Proteinbiosynthese verhindert [27]. Eine ähnliche abschwächende Wirkung auf die DNA-Synthese konnte für kultivierte Endothelzellen

aus Rinderaorten nachgewiesen werden. Mittels einer Guanylatzyklase, die rezeptorvermittelt stimuliert wird, wird eine Reduktion der Zellvermehrung erreicht [28].

Zu den kardiovaskulären Aufgaben der natriuretischen Peptide zählen außerdem die Steigerung der Permeabilität mit Zunahme der extravasalen Flüssigkeit und die Vasodilatation der peripheren Gefäße. Erreicht wird dies durch die Proteinkinase G, die nach Bindung von ANP, BNP oder CNP an ihre Rezeptoren (NPR-A bzw. -B), durch das entstandene zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert wird. Die Proteinkinase G senkt die Kalziumkonzentration intrazellulär, was zu einer Relaxation der Gefäßmuskelzellen und damit zur Erweiterung der Blutgefäße führt [56]. CNP hat die stärkste vasodilatatorische Wirkung, da es die Konzentration von cGMP am stärksten zu erhöhen vermag. ANP, und in gewissem Maße BNP, können außerdem die Sympathikusaktivität im peripheren Gefäßsystem hemmen, was über afferente vagale Nervenfasern vom Typ C vermittelt wird. Das führt zu einer zusätzlichen Gefäßerweiterung mit Vergrößerung der venösen Kapazität, wodurch der mittlere arterielle Blutdruck gesenkt wird. Die Wirkung der natriuretischen Peptide auf die Vagusafferenzen unterdrückt außerdem Reflextachykardie und Vasokonstriktion, die Antworten auf eine gesenkte Vorlast zur Aufrechterhaltung des mittleren Blutdrucks [4, 14, 27, 28, 38, 52].

Im zentralen Nervensystem koordinieren und unterstützen die natriuretischen Peptide, von denen CNP zum größten Teil, ANP zu einem geringeren Teil im Gehirn gebildet werden, die zentralen und peripheren Mechanismen der Elektrolyt- und Flüssigkeitshomöostase. Langub et al. konnten in Rattengehirnen keine mRNA für BNP nachweisen und gehen daher davon aus, dass dieses nicht im Gehirn gebildet wird [36]. Allerdings können in Regionen, die an die Ventrikel angrenzen und nicht durch die Blut-Hirn-Schranke begrenzt werden, sowohl zentral gebildete als auch zirkulierende natriuretische Peptide gebunden werden. Dort befindet sich vor allem der Rezeptor Typ A (NPR-A) [23]. So können ANP und BNP hemmend auf Durst und den Appetit auf Salz wirken, wodurch sie den diuretischen Effekt der natriuretischen Peptide an den Nieren unterstützen. Der Rezeptor NPR-B ist hauptsächlich im Hypothalamus aber auch in anderen Hirnregionen lokalisiert, wo CNP die Sekretion von Vasopressin (antidiuretisches Hormon) hemmt. Letzteres kann einer Diurese dann nicht mehr entgegen wirken. Der Rezeptor Typ C ist im gesamten zentralen Nervensystem verteilt und unterdrückt wahrscheinlich das Wachstum von Gliazellen. Indem ANP oder BNP an ihn binden, wird in kultivierten fetalen Diencephalonzellen aus Ratten der Einbau von Thymidin in Astroglia vermindert und die Zellproliferation inhibiert [37]. Steele et al. konnte außerdem zeigen, dass in die Hirnventrikel injiziertes ANP bei anästhesierten Ratten den mittleren Blutdruck, die Herzfrequenz und die renale sympathische Aktivität vermindert. Vermittelt werden diese Effekte durch die Inhibition von Angiotensin II abhängigen Nervenaktivitäten [57]. Man nimmt an, dass die natriuretischen Peptide auch beim Menschen im Hirnstamm senkend auf den Sympathotonus wirken. Dadurch wird im Kreislauf Hypotension, kardiale Inhibition und Natriuresis hervorgerufen und das Herz entlastet [38].

Auch auf die Nieren haben die natriuretischen Peptide eine direkte Wirkung. Am Glomerulum senken ANP und BNP den Widerstand im zuführenden Gefäß (Vas afferens) und erhöhen den im abführenden Gefäß (Vas efferens). Dadurch steigt der effektive Filtrationsdruck in den

Golmerulumkapillaren an. Es kommt zur vermehrten Natrium- und Wasserausscheidung. In den Mesangiumzellen erhöhen die natriuretischen Peptide durch Aktivierung der Guanylatzyklase die Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), wodurch die Zellen relaxieren und eine größere effektive Filtrationsoberfläche bieten. Die glomeruläre Filtrationsrate wird erhöht, der renale Plasmafluss wird vermindert [12, 29]. K. T. Jensen et al. zeigten, dass durch BNP-Infusionen bei Gesunden die Natriumreabsorption in distalen Abschnitten der Nephrone dosisabhängig gesenkt wird. Demnach wird auch BNP-dosisabhängig vermehrt Wasser ausgeschieden [29]. Dort und in den Glomeruli lässt sich der Rezeptor NPR-A nachweisen. Dessen Aktivierung führt zur Funktionsminderung der Natriumkanäle. Durch die BNP-Wirkung konnten eine um 156 % höhere Natriumexkretion und ein um 65 % höheres Urinvolumen gemessen werden. Ein Effekt auf die Kaliumsekretion war nicht feststellbar. An den medullären Sammelrohren bewirken ANP und BNP durch die rezeptorvermittelte Stimulation der Guanylatzyklase eine Hemmung der Natrium-Chlorid-Resorption und damit eine verstärkte Wasserausscheidung. Auf die kortikalen Sammelrohre wirken die Peptide antagonistisch zu Vasopressin (antidiuretisches Hormon), indem sie den tubulären Wasserrücktransport hemmen [40, 56].

Allerdings wiesen P. J. Hunt et al. nach, dass ANP den cGMP-Spiegel im Plasma viermal mehr anhebt als BNP, also ein stärkerer Modulator ist. Vor allem ANP und nicht BNP hemmt die Ausschüttung von Angiotensin II-stimuliertem Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebenniere, was zu einer verstärkten Salz- und Wasserretention führt. BNP hemmt dagegen direkt die Reninbildung in der Niere, wodurch wiederum indirekt die Angiotensin II- und damit auch die Aldosteronfreisetzung verringert werden. Natriurese und Diurese werden gefördert und der Blutdruck gesenkt [14, 25, 38, 40, 58].

1.4 Natriuretische Peptide in der Diagnostik

1.4.1 Krankheitsbild der Herzinsuffizienz

Schätzungen zufolge leiden in Nordamerika und Europa mehr als 15 Millionen Menschen an Herzinsuffizienz. Jährlich kommen 1,5 Millionen neue Fälle hinzu [45]. Die vielfältigen Erkrankungsursachen umfassen unter anderem: primäre Herzmuskelerkrankungen, Koronaratherosklerose, welche Myokardischämien und Herzinfarkte bewirken kann, Herzklappenerkrankungen, die zu hämodynamischen Überlastungen des Herzens führen können, kardiale Beeinträchtigungen durch Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und die chronisch konstriktive Perikarditis, durch welche der Herzmuskel möglicherweise entzündlich infiltriert wird. Es entsteht in der Folge eine eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit des Myokards.

Bis zu einem gewissen Grad kann dann eine erhöhte Belastung durch den Frank-Starling-Mechanismus abgefangen werden. Dies bedeutet im weiteren Sinne eine Erhöhung der Vorlast durch Herzmuskelhypertrophie, Volumenumverteilung und neurohumorale Reaktionen. Zu

letzteren zählen vermehrte Plasma-Katecholamine, zunächst physiologische Abnahme der β -Rezeptorempfindlichkeit bei gesteigertem Sympathikotonus, vermehrte vasokonstriktorische Hormone, verstärkte Ausschüttung von ANP und BNP sowie erhöhte Aldosteronfreisetzung. Unter diesen Voraussetzungen kann das Herz eine Überlastung zunächst kompensieren, ohne dass dies klinisch manifest wird. Bei plötzlicher beziehungsweise zu großer Überlastung unterschiedlicher Ursache kann jedoch eine Herzinsuffizienz mit ihrem vollen klinischen Bild ausgelöst werden. Zu den auslösenden Faktoren zählen unter anderem eine Lungenarterienembolie, Infektionen, Anämie, Schwangerschaft, Thyreotoxikose, Arrhythmien und emotionale Überlastungen [26]. Die erhöhten Anforderungen können dann nur durch eine überdurchschnittlich große Steigerung des enddiastolischen Füllungsdrucks kompensiert werden.

Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz wird nach unterschiedlichen Kriterien eingeteilt:

- Linksherz-, Rechtsherz- oder Globalinsuffizienz
- Ruhe- oder Belastungsinsuffizienz
- diastolische oder systolische Insuffizienz
- kompensierte oder dekompenzierte Insuffizienz
- akuter oder chronischer Verlauf
- nach den ABCD-Stadien der American Heart Association (AHA) oder
- nach den schon erwähnten Stadien der New York Heart Association (NYHA) [22].

Nach zuletzt genannter NYHA-Einteilung sind Personen in Stadium I sowohl in Ruhe als auch unter Belastung noch beschwerdefrei. Sobald Beschwerden in Ruhe auftreten, spricht man von einem NYHA-Stadium IV [21, 22, 26]. Typische Beschwerden der Herzinsuffizienz sind Dyspnoe, dann Orthopnoe, vorschnelle Ermüdbarkeit, herabgesetzte Belastbarkeit, zerebrale Symptome, periphere Ödeme, Venenstauungen, Hepato- und Splenomegalie sowie Aszites [21, 26]. Mittel der Wahl bei der medikamentösen Behandlung sind heute ACE-Hemmer, Diuretika, Digitalis-Präparate, vasodilatatorische Vor- und Nachlastsenker, β -Blocker, positiv inotrope Substanzen und Phosphodiesterasehemmer.

Neben Krankheitsverlauf, NYHA-Klasse und Alter des Patienten kann jetzt auch die Bewertung von BNP- und NTproBNP-Werten zur Einschätzung der Schwere der Krankheit unterstützend hinzugezogen werden. Dem B-Typ natriuretischen Peptid kommt eine zunehmende Bedeutung bei der Diagnostik der Herzinsuffizienz zu. Immer häufiger wird die Aufnahme in die Routinediagnostik empfohlen [40, 41, 42, 45, 65].

1.4.2 Methoden zur Messung der natriuretischen Peptide

Radioimmunoassays:

Bevor die Messung von BNP und NTproBNP maschinell möglich wurde, konnte man diese nur mittels eines Radioimmunoassays (RIA) von Hand bestimmen. Das Verfahren wurde 1960 von Berson und Yalow zur Messung von Insulin im Plasma eingeführt [69]. Es ist langwierig, teuer und durch die Nutzung von radioaktiv-markierten Antigenen umweltbelastend.

Bei der Durchführung des RIA stellt man zuerst ein Gemisch aus radioaktiv markierten Antigenen und gegen diese gerichtete spezifischen Antikörpern her. Diesem Gemisch fügt man dann unmarkierte oder „kalte“ Antigene bekannter Menge hinzu, welche die markierten Antigene aus ihrer Antikörperbindung verdrängen. Daraufhin trennt man die gebundenen von den ungebundenen Antigenen und misst die Radioaktivität der beiden Konzentrationen.

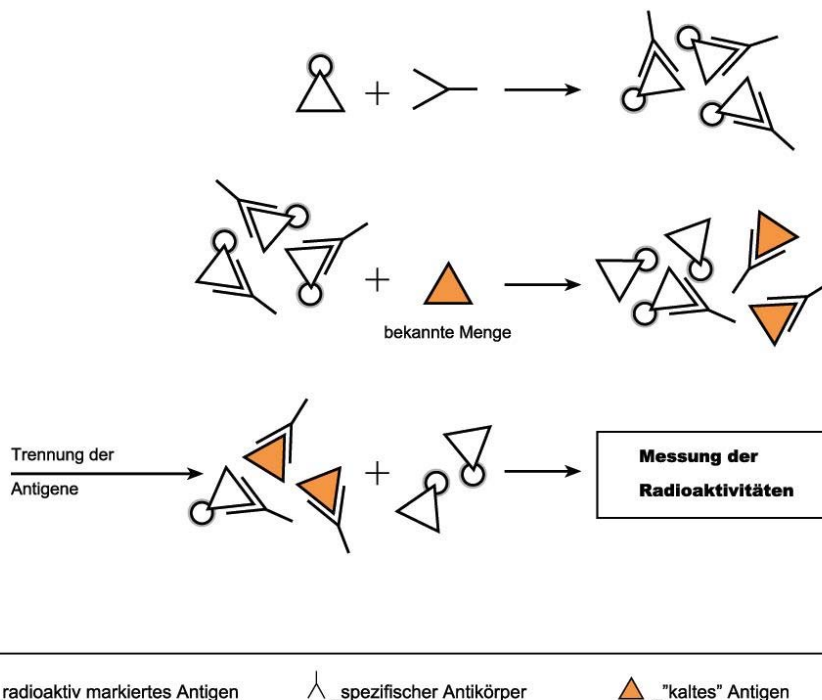


Abbildung 5: RIA

So erhält man eine Standardkurve für den Verlauf der Aktivität von markierten Antigen-Antikörper-Komplexen, entweder durch Messung der radioaktiven Komplexe, oder durch Messung der freien Aktivität. Später kann man dann eine zu untersuchende unmarkierte Antigenkonzentration durch Vergleich des Ergebnisses mit der Standardkurve ermitteln.

Zur Trennung von gebundenem Antigen von freiem Antigen werden folgende Methoden verwendet:

- Gelchromatographie
- Elektrophorese

- Dünnschichtchromatographie
- Ausfällung des freien Proteins durch Adsorption an unlösliche Stoffe, oder Aggregation durch eine Lösung plus Zentrifugieren
- Immunpräzipitation durch einen zweiten Antikörper plus Zentrifugieren
- Immobilisierung des Antikörpers durch Fixation mittels Antikörper oder Magnetismus

Der RIA ist ein sehr sensibler Test, dessen Ergebnisse allerdings im Vergleich mit zum Beispiel dem automatisierten Elecsys 2010 von Roche (vollautomatischer Immunoassay Analyseautomat) in hohen Konzentrationsbereichen nicht übereinstimmen. Dies könnte auf die unterschiedliche Kalibrierung der beiden Verfahren zurückgeführt werden [61]. Ferner ergeben sich beim RIA Inkubationszeiten von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen und Inkubationstemperaturen zwischen 4°C und 37°C. Der von Hand durchgeführte RIA ist auch zeitaufwendiger als der maschinelle Test.

Chemilumineszenz-Methoden:

Bei der Methode der Chemilumineszenz nutzt man die Emission von Licht, die durch eine chemische Reaktion erreicht wird, um eine Antigenkonzentration sichtbar zu machen, das heißt zu bestimmen. Eine Probe, also ein Antigen, wird mit zwei verschiedenen Antikörpergemischen zusammengebracht. Die Antikörper binden an unterschiedlichen Epitopen des Antigens, es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex („Sandwich“-Komplex). Die Immunkomplexe werden dann von den ungebundenen Partikeln getrennt. Durch Zuführen eines weiteren Agens beziehungsweise Elektrizität wird dann eine Oxidation ausgelöst, die Licht emittiert. Das gemessene Licht ist direkt proportional zum Antigengehalt.

Diese Methode findet in den vollautomatischen Messungen von BNP und NTproBNP Anwendung. (Siehe 3. Material und Methoden)

1.4.3 Referenzwerte

Zur Interpretation der Plasmakonzentrationen von BNP und NTproBNP werden Referenzwerte benötigt. Bei gesunden, unter 45 Jährigen entspricht ein BNP-Wert von 11,9 pg/ml der Norm. Dagegen befindet sich der mittlere BNP-Wert von gesunden Menschen über 75 Jahren bei 60,3 pg/ml [Testanleitung ADVIA Centaur für BNP 131074 Rev. D, 2003-08 S.9/20, Bayer Vital GmbH Diagnostics, Fernwald, Deutschland]. Bei Messungen des N-terminalen proBNP zeigen gesunde Personen im Alter von 18 bis 59 Jahren eine durchschnittliche Konzentration von 37,1 pg/ml [Testanleitung Elecsys 2010 für NTproBNP 2004-04, V 7 DE S.3/4, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland].

Für symptomatische Personen werden cut-off-Konzentration bestimmt, um eine Herzinsuffizienz auszuschließen bzw. zu diagnostizieren. Als Grenzwert zum Ausschluss einer akuten Herzinsuffizienz bei Dyspnoe-Symptomatik gilt ein BNP-Wert von unter 100 pg/ml [9, 13]. Dieser Wert hat eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 41 % für die Diagnose einer akuten Herzinsuffizienz. Dagegen besitzt ein cut-off-Wert von 400 pg/ml eine Sensitivität von 87

%, sowie eine Spezifität von 76 % [13]. Bei Niereninsuffizienz liegt der verlässlichste prädiktive Wert für eine akute Herzinsuffizienz bei über 200 pg/ml [9].

Für NTproBNP gilt eine cut-off Konzentration von unter 125 pg/ml, um bei Dyspnoe-Symptomatik eine Herzinsuffizienz mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen [9, 42].

Tabelle 1: BNP- und NTproBNP-Konzentrationen bei akuter Dyspnoe [9, 13, 33]

BNP (pg/ml)	NTproBNP (pg/ml)	Bemerkung
<100	<125	akute Herzinsuffizienz unwahrscheinlich
100 - 400		Herzinsuffizienz wahrscheinlich, wenn Ausschluss anderer Dyspnoe-Ursachen
>400	>130	akute Herzinsuffizienz wahrscheinlich

1.4.4 Veränderungen im Alter

Mehrere Studien, wie in Kinda (Schweden) [2], oder in Olmsted County, Minnesota (USA) [51], zeigten, dass die Plasmawerte von BNP und NTproBNP im Alter sowohl bei Frauen als auch bei Männern ansteigen. Zum einen wird ein bei älteren Menschen häufig vorkommendes, steiferes Ventrikelmyokard dafür verantwortlich gemacht. Das würde bedeuten, dass das Herz nicht mehr ausreichend dehnungsfähig ist und schneller auf eine vermeintliche Volumenüberlastung reagiert. Folglich werden vermehrt natriuretische Peptide ausgeschüttet. Zum anderen wird angenommen, dass die Peptide nicht mehr vollständig renal ausgeschieden werden können, wofür eine reduzierte Nierenfunktion im Alter verantwortlich gemacht wird.

Auf jeden Fall steigen die Werte im Verlauf des Lebens an, überschreiten im Falle des BNP bei Gesunden bis 75 Jahre jedoch in der Regel nicht 50 pg/ml [2, 41, 42, 50, 51].

Für NTproBNP gilt, dass bei Menschen unter 75 Jahren zum Ausschluss einer Herzinsuffizienz die Plasmawerte unter 125 pg/ml und bei den über 75-Jährigen unter 450 pg/ml liegen sollten [68]. Werden NTproBNP-Werte gemessen, die sich zwischen den beiden vorgeschlagenen befinden, sollten weitere Untersuchungen zur Abklärung herangezogen werden. Sie können jedoch vorerst als nicht pathologisch betrachtet werden. Es wurden bei diesen Beobachtungen keine Unterschiede zwischen weißer und schwarzer Bevölkerung gefunden [42].

1.4.5 Unterschiede zwischen Frauen und Männern

Auch geschlechtsspezifische Unterschiede lassen sich bei den B-Typ natriuretischen Peptiden nachweisen. Man kann bei Mädchen, die älter als zehn Jahre alt sind, bereits höheres Plasma-BNP messen als bei Jungen im gleichen Alter. Mädchen in der Pubertät weisen höhere Werte auf als solche im präpubertären Alter [32]. Auch im Erwachsenenalter haben Frauen höhere BNP-Werte im Plasma als Männer ihrer Altersklasse [50, 51, 68]. Nach A. Clerico und M. Emdin liegt der Durchschnittswert bei Frauen über 50 Jahren sogar 36% höher als bei gleichaltrigen Männern [14].

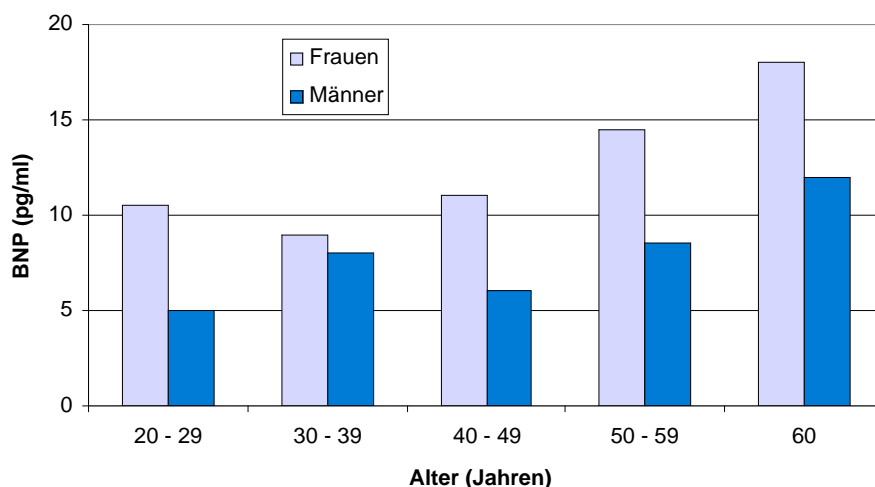


Abbildung 2: BNP bei Männern und Frauen verschiedener Altersgruppen [14]

1.4.6 Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen

BNP- wie auch NTproBNP-Plasma-Konzentrationen ändern sich im Laufe des Lebens. BNP-Werte sind bei Neugeborenen gemessen in der Vena umbilicalis relativ hoch und steigen am ersten Lebenstag (Tag 0) noch um ein Vielfaches an. Y. Kunii et al. beobachtete bei anfänglichen Werten von $10,4 \pm 11,9$ pg BNP/ml im Umbilikalvenenblut eine Veränderung auf bis zu $118,8 \pm 83,2$ pg BNP/ml Blut während des ersten Tages [35]. Dies ist vermutlich Ausdruck der Umstellung des intrauterinen auf den postpartalen Kreislauf. Nach M. Yoshibayashi et al. sind die BNP-Konzentrationen am ersten Lebenstag sogar 25 bis 30 mal höher als die Werte bei Erwachsenen [70]. Danach fällt die Plasma-Konzentration von BNP innerhalb der ersten Woche wieder ab auf durchschnittliche Werte von $48,4$ pg/ml [32, 35]. Bei Säuglingen, älter als zwei Wochen, liegt der ermittelte Wert schon wieder unter $32,7$ pg/ml. Bis zum dritten Lebensmonat erreichen die BNP-Konzentrationen im Plasma dann Werte vergleichbar mit denen bei Erwachsenen [32].

Während A. Nir beschrieb, dass NTproBNP-Konzentrationen im Plasma von Säuglingen bis zum vierten Monat über den Werten von Erwachsenen liegen, berichteten T. S. Mir und seine Mitarbeiter, dass sie im Plasma von Kindern, Heranwachsenden und Erwachsenen keinen signifikanten Unterschied zeigen. In dieser Studie waren Babys ab dem zehnten Lebenstag und Erwachsene bis zum 32. Lebensjahr miteinbezogen worden [44, 46]. Wertet man also Messungen der natriuretischen Peptide aus kindlichem Blut aus, sind für eine korrekte Beurteilung sowohl Alter als auch Geschlecht zu berücksichtigen.

2 FRAGESTELLUNG

Die hohe Bedeutsamkeit von BNP und NTproBNP für die Herzinsuffizienzdiagnostik und –therapie wird innerhalb des Kapitels 5 „Diskussion“ erläutert. Ziel dieser Dissertation ist es, die Stabilität und insbesondere die Kurzzeitstabilität der genannten natriuretischen Peptide im Rahmen der Präanalytik zu untersuchen.

Folgendes soll hier erörtert werden:

1. Wie stabil sind BNP und NTproBNP in den ersten 24 Stunden nach der Blutentnahme?
2. Hat der Zusatz in den Monovetten zur Blutentnahme (EDTA-Plasma, EDTA-Vollblut, Serum und Heparin-Plasma) einen Einfluss auf die Messergebnisse?
3. Gibt es Unterschiede in der Kurzzeitstabilität von BNP und NTproBNP zwischen Gesunden, Kranken und Dialysepatienten?
4. Welchen Einfluss hat die Lagerung bei Raumtemperatur beziehungsweise bei 4°C auf die Stabilität?
5. Welchen Einfluss auf die Stabilität hat die Aufbewahrung von Vollblut in Vacutainer- (Glas-) beziehungsweise in PET- (Kunststoff-) Röhrchen?
6. Kann durch die Zugabe von Trasylol zum EDTA-Vollblut BNP und NTproBNP stabilisiert werden?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Probandenbeschreibung

Die Stabilität von BNP und NTproBNP wurde anhand der Blutproben von 24 anonymisierten Probanden untersucht. Es handelte sich dabei um vier gesunde Personen mit Ausgangswerten unter 50 pg BNP/ml und vier Personen mit Ausgangswerten zwischen 50 und 100 pg BNP/ml.

Zwei Personen waren herzinsuffizient mit Ausgangswerten über 100 pg BNP/ml. Drei Patienten lagen auf einer Intensivstation und hatten Ausgangswerte zwischen 16 und 96 pg BNP/ml und elf Patienten waren Hämodialysepatienten mit Ausgangswerten zwischen 341 und 5843 pg BNP/ml. Das Alter der Probanden lag zwischen 17 und 80 Jahren.

Die Probanden wurden über den Zweck, die Durchführung und den erhofften Nutzen der Studie ausführlich informiert und aufgeklärt. Sie gaben ihre schriftliche Einwilligung zur freiwilligen Teilnahme. Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß den Regeln der Deklaration von Helsinki.

Die Bestimmung der beiden Peptide erfolgte zur Optimierung der Präanalytik vor Einleitung der Patienten in die klinische Routine.

3.1.2 Blutentnahme, -material und -gefäße

Die Blutentnahme fand dem Standard entsprechend aus einer Vene am Unterarm oder der Hand eines jeden Probanden mittels eines Venofix®-Venenpunktionsbesteckes, Größe 0,8 x 20 mm der Firma BRAUN, Melsungen, statt. Es wurden dabei jeweils sechs Kalium-EDTA-Monovetten® mit 9 ml Fassungsvermögen, zwei Lithium-Heparin-Monovetten® mit 7,5 ml Fassungsvermögen und zwei Serum-Monovetten® mit 4,7 ml Fassungsvermögen gefüllt. Es handelte sich bei allen Monovetten® um solche der Firma SARSTEDT, Nümbrecht. In jeweils einer der EDTA-Monovetten wurde vor Blutentnahme 450 µl Trasylo® 500 000 KIE der Firma Bayer AG, Leverkusen, vorgelegt. In drei Versuchen (Versuch acht, neun und zehn) wurde zusätzlich ein Kalium-EDTA-Vacutainer aus Glas der Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, mit 7 ml Fassungsvermögen verwendet.

Bei den drei intensivpflichtigen und den elf Hämodialysepatienten wurden zur Schonung des Kreislaufs nur zwei Kalium-EDTA-Monovetten® mit 9 ml Fassungsvermögen befüllt. Bei den Niereninsuffizienten wurde das Blut immer kurz vor dem Anschließen an das Hämodialysegerät entnommen.

3.1.3 Trasylol® 500 000 KIE als Stabilisator

Außerdem wurde in dieser Studie zur Kurzzeitstabilität von BNP und NTproBNP ein Stabilisator getestet. Zur Verwendung kam Trasylol® 500 000 KIE der Firma Bayer AG, Leverkusen. Es enthält den Wirkstoff Aprotinin. Dabei handelt es sich um ein Polypeptid aus 58 Aminosäuren, das aus Rinderlungen gewonnen wird. Aprotinin ist ein polyvalenter Proteinaseinhibitor, der durch Bildung stöchiometrischer Enzym-Inhibitor-Komplexe als Hemmstoff von menschlichem Trypsin, Plasmin und von Plasma- und Gewebe-Kallikrein wirkt. In der Klinik wird er bei Hyperfibrinolyse und als Antidot bei Überdosierung von Fibrinolytika angewendet. (Beipackzettel Trasylol® 500 000 KIE, Firma Bayer AG, Leverkusen)

In dieser Studie wurden 450 µl Trasylol® in jeweils zwei Kalium-EDTA-Monovetten pipettiert. Diese wurden wieder verschlossen und danach mit venösem Blut gefüllt. Davon wurden eine Probe als Vollblut bei 4°C und eine als Vollblut bei Raumtemperatur aufbewahrt. Untersucht werden sollte, ob durch Aprotinin in vitro auch der Abbau von BNP und NTproBNP im Blut verhindert oder verlangsamt werden kann.

Zwischen den Versuchstagen wurde die Aprotinin-Lösung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.2 Labormethoden

3.2.1 Probenverarbeitung

Vom Zeitpunkt der Blutentnahme an wurden vier der Probengefäße (drei Kalium-EDTA-Monovetten®, eine Lithium-Heparin-Monovette®) in einem Eis/Eiswasser-Gemisch und nach einer Stunde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die restlichen Gefäße (drei Kalium-EDTA-Monovetten®, eine Lithium-Heparin-Monovette®, zwei Serum-Monovetten® und gegebenenfalls ein Vacutainer) wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Sie waren dabei stets verschlossen, außer zur Entnahme des zu messenden Probenvolumens.

Direkt nach der Blutentnahme wurden jeweils eine Kalium-EDTA- und eine Lithium-Heparin-Monovette® bei 4°C und bei 24°C für zehn Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute in einer Megafuge 1.0 R der Firma Heraeus Sepatech, Hanau, zentrifugiert. Hinterher wurde in die vier Röhrchen ein Seraplas® Ventil-Filter der Firma SARSTEDT, Nümbrecht, gedrückt, um das Plasma von den Zellbestandteilen, getrennt zu halten. Für die 9 ml Kalium-EDTA-Monovetten® wurden solche der Größe V16, für die Lithium-Heparin-Monovetten® solche der Größe V15 verwendet. Aus dem EDTA-Vollblut, dem EDTA-Vollblut mit Trasylol und, falls verwendet, aus dem Vacutainer-Vollblut wurden 500 µl entnommen und in Kunststoff-Reaktionsgefäße (3810) der Firma Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, pipettiert. Es wurde darauf geachtet, die Blutentnahmegefäße vor der Probenentnahme leicht zu schwenken, um die verschiedenen Blutbestandteile wieder zu vermischen. Die Eppendorf Cups wurden dann für fünf Minuten bei 10000 Umdrehungen/Minute in einer Biofuge A der Firma Heraeus Christ, Hanau, zentrifugiert.

Anschließend wurden jeweils 400 µl aus den Eppendorf-Gefäßen, dem kalten und dem bei Raumtemperatur zentrifugierten EDTA- und Heparin-Plasma entnommen und in die Messgefäße für den ADVIA Centaur der Firma Bayer Vital GmbH, Fernwald, umpipettiert. Diese wurden zuerst in die Racks für den ADVIA Centaur gestellt, worin die Messungen für BNP erfolgten. Daraufhin wurden dieselben Gefäße entnommen und in die Racks für den Elecsys 2010 der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, gestellt, worin die Proben auf NTproBNP gemessen wurden.

Somit erfolgte die erste Messung immer direkt 15 Minuten nach der Blutabnahme. Es mussten zwei Serum-Monovetten® verwendet werden, da sonst das Probenvolumen nicht ausgereicht hätte. Sie wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und erst dann ebenfalls zehn Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute in einer Megafuge 1.0 R der Firma Heraeus Sepatech, Hanau, zentrifugiert. Daher konnten die BNP- und NTproBNP-Werte der Serumprobe immer erst bei der zweiten Messung (nach 15 min.) mitbestimmt werden.

Die jeweils zwei Proben der intensivpflichtigen Patienten und der Dialysepatienten wurden in Kalium-EDTA-Monovetten® als Vollblut bei Raumtemperatur aufbewahrt. Je eine der beiden Monovetten war mit 450 µl Trasylo® 500 000 KIE, Bayer AG, versehen. Im weiteren Versuchsablauf wurden sie wie schon oben beschrieben die Vollblutproben der anderen Probanden verarbeitet und gemessen.

Insgesamt wurden acht Messungen mit jeder Probe durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 0' (welcher 15 Minuten nach Blutentnahme war; die Viertelstunde wurde zum Probentransport, zur Probenverarbeitung und –zentrifugation benötigt), 15 min., 30 min., 60 min., 120 min. (zwei Stunden), 360 min. (sechs Stunden), 720 min. (12 Stunden) und 1440 min. (24 Stunden). Dabei wurden jedes Mal wieder die Vollblutproben in den Eppendorf-Cups zentrifugiert, bevor sie, ebenso wie die Proben aus dem Kalium-EDTA-Plasma, dem Lithium-Heparin-Plasma und dem Serum, in die ADVIA Centaur-Gefäße umgefüllt wurden, um an den Laborgeräten gemessen zu werden.

Alle Pipettierschritte wurden mit 1000 µl Kunststoffpipettenspitzen der Firma Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, durchgeführt. Am Ende der Messreihen nach 24 Stunden, wurde das überschüssige Probenmaterial bei –25°C tiefgefroren, um es für eventuell weitere Fragen heranziehen zu können.

3.2.2 BNP-Messung: ADVIA Centaur (Bayer)

Durch das vollautomatische Messgerät ADVIA Centaur der Firma Bayer Vital GmbH, Fernwald, konnte die BNP-Konzentration in den verschiedenen Proben mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion bestimmt werden. Die Messung basiert dabei auf einem Zweistufen-Sandwich-Immunassay (Elektro-Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assay).

3 MATERIAL UND METHODEN

Das Sandwichprinzip des ADVIA Centaur funktioniert dabei folgendermaßen:

1. Zuerst wird Lite-Reagenz zur Probe hinzugegeben und gemischt. Bei diesem handelt es sich um einen kovalent mit Acridiniumester verbundenen monoklonalen Maus-anti-human-BNP $F(ab')_2$ -Fragment-Antikörper, welcher spezifisch an die Ringstruktur des B-Typ natriuretischen Peptids (Aminosäuren 27-32) bindet. Der Acridiniumester wird in seiner Dimethylform verwendet und dient als Chemilumineszenz-Marker. Die Inkubationszeit beträgt fünf Minuten bei 37°C.
2. Als nächstes wird der zweite Antikörper zusammen mit paramagnetischen Streptavidinpartikeln hinzugegeben. Der Antikörper ist ein biotinylierter monoklonaler Maus-anti-human-Antikörper, der spezifisch am C-terminalen Ende des BNP (Aminosäuren 14-21) bindet. Die paramagnetischen Partikel, die mit diesen Antikörpern beschichtet sind, werden als Solid Phase oder Festphase bezeichnet. Es wird wiederum bei 37°C inkubiert, diesmal jedoch nur für 2,5 Minuten. Während dieser Zeit bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe: die mit Streptavidinpartikeln beschichteten Antikörper binden an BNP über das Biotin. Da BNP bereits mit den mit Acridiniumestern verbundenen Antikörpern gekoppelt ist, entsteht so ein großer Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (AG-AK-Komplex).

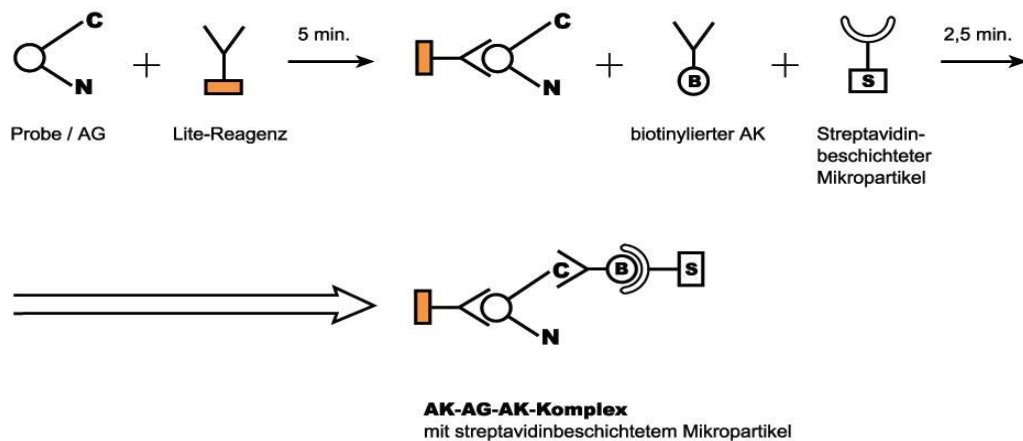


Abbildung 3: ADVIA Centaur Messprinzip

3. In der Messzelle wird dann ein Magnetfeld erzeugt, wodurch das paramagnetische Streptavidin zusammen mit dem gebundenen Komplex auf der Küvettenwand fixiert wird. Die ungebundenen Bestandteile der Probe und der verwendeten Antikörper-Reagenzien werden ausgewaschen und entfernt.

4. Danach werden Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base) zugeführt, um die Chemilumineszenz-Reaktion auszulösen. Dabei wird in saurem Milieu durch Wasserstoffperoxid der Acridiniumester zuerst oxidiert, um dann durch das Beimengen der Base die Chemilumineszenz-Reaktion des Acridiniumesters zu starten. Das so entstehende Licht wird in relativen Lichteinheiten (RLU = Relative Light Units) gemessen angegeben. Die maximale Lichtemission ist schon nach einer Sekunde zu messen ist. Die produzierte Lichtmenge ist direkt proportional zur Konzentration des zu messenden Antigens in der Probe.

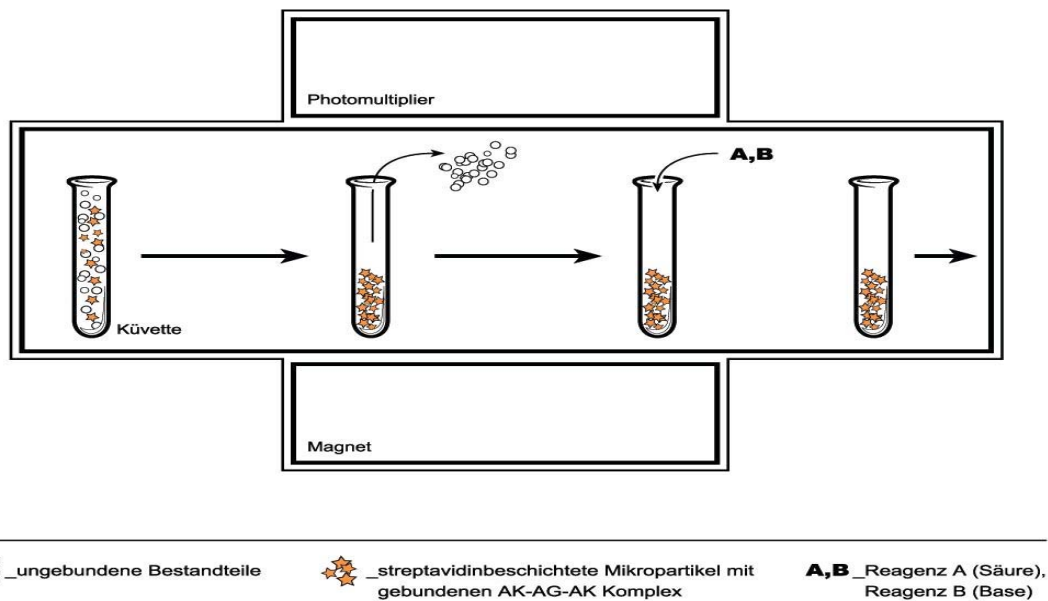


Abbildung 4: Funktionsweise des ADVIA Centaur

Der ADVIA Centaur Test zur Messung von BNP wird mit einer Basiskalibrationskurve jeweils vor Verwendung einer neuen Charge für Lite-Reagenz und Festphase kalibriert. Dafür werden die speziell zur Charge gehörenden Angaben der Basiskurvenkarte und ein Barcode mittels Barcodeleser oder Tastatur eingelesen. Die Berechnung der BNP-Konzentration in der Probe erfolgt automatisch durch das System.

Bei diesem Testverfahren erwies sich die kurze Inkubationszeit (7,5 Minuten) für die Antigen-Antikörper-Reaktionen als sehr vorteilhaft. Außerdem kann durch den Einsatz von paramagnetischen Partikeln eine sichere Bindung an die Küvettenwand während der Chemilumineszenz-Reaktion und der anschließenden Messung sichergestellt werden.

Für die Verwendung werden vom Hersteller Proben aus Plasma empfohlen.

Aus einer Referenzgruppe aus offensichtlich gesunden Personen ergaben sich die nachstehenden Werte, die in der Testanleitung für den ADVIA Centaur der Firma Bayer Vital GmbH, Fernwald, Deutschland, veröffentlicht wurden:

Tabelle 2: Referenzgruppe Männer (ADVIA Centaur Testanleitung, Bayer Vital Diagnostics)

Alter	Alle	<45	45 - 54	55 - 64	65 - 74	>75
Mittelwert	17,9	9,1	11,2	14,5	25,8	41,9
Anzahl	736	129	140	223	188	56
Median	11,3	5,9	7,6	11,9	17,8	26,1
95.Perzentile	54,3	29,4	32,8	38,8	67,6	121

Tabelle 3: Referenzgruppe Frauen (ADVIA Centaur Testanleitung, Bayer Vital Diagnostics)

Alter	Alle	<45	45 - 54	55 - 64	65 - 74	>75
Mittelwert	28,1	13,8	19,8	25,6	31	71,9
Anzahl	785	188	151	180	177	89
Median	18,5	10,4	14,8	19,4	25,7	54,3
95.Perzentile	86,1	35,9	56,7	75,5	72,9	167

Der Messbereich des ADVIA Centaur BNP-Tests liegt zwischen <0,2 bis 5000 pg/ml. Bei Werten, die diesen Bereich übersteigen, muss das Gerät die Proben verdünnen. Dies ist dem Benutzer in zweifacher, fünffacher und zehnfacher Verdünnung möglich und wird vom Gerät bei der Angabe des Messergebnisses automatisch berücksichtigt.

3.2.3 NTproBNP-Messung: Elecsys 2010 (Roche)

Die immunologische Bestimmung von NTproBNP erfolgte mit Hilfe eines vollautomatischen Immunoassay Analyseautomaten, dem Elecsys 2010 der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, der nach dem Elektro-Chemi-Lumineszenz (ECL) – Verfahren arbeitet.

Das ECL-Verfahren für NTproBNP ist nach einem Sandwichprinzip aufgebaut:

1. Im ersten Inkubationsschritt wird die Probe (in flüssiger Phase) mit einem Reagenz versetzt, das vor allem aus Antikörpern zweier unterschiedlicher Arten besteht. Zum einen handelt es sich dabei um biotinylierte polyklonale NTproBNP-spezifische Antikörper, zum anderen werden mit Ruthenium-Komplex markierte ebenfalls spezifische polyklonale Antikörper verwendet. Jeder Antikörper erkennt dabei unterschiedliche Epitope des Antigens und bindet daran. Die Inkubationszeit für diesen ersten Schritt beträgt neun Minuten bei 37°C. Die Antikörper bilden dabei zusammen mit der Probe einen „Sandwich“-Komplex, bei dem sich die Probe, also das Antigen, praktisch in der Mitte der drei Komponenten befindet.
2. Als nächstes werden streptavidinbeschichtete paramagnetische Mikropartikel zugegeben. Der formierte Antigen-Antikörper-Komplex bildet dann über das Biotin eine kovalente Bindung mit den Mikropartikeln. Auch hier beträgt die Inkubationszeit wieder neun Minuten bei 37°C.

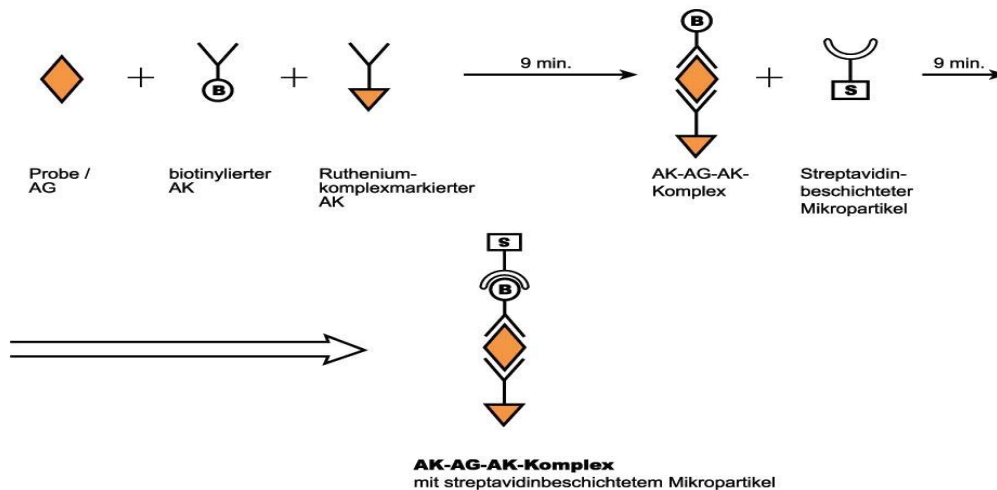


Abbildung 5: Elecsys 2010 Messprinzip

- Das entstandene Reaktionsgemisch mit den Immunkomplexen wird danach in die Messzelle des Elecsys 2010 gesaugt, wo es an einer definierten Stelle auf der Arbeitselektrode, bei der es sich um eine Platinelektrode handelt, festgehalten wird. Dies geschieht mit Hilfe eines Magneten, der unter die Arbeitselektrode geklappt ist und die Mikropartikel mit den gebundenen Immunkomplexen fixiert. Durch die chemisch stabile Biotin-Streptavidin-Bindung wird das Antigen sicher festgehalten. Das ungebundene Reagenz- und Probenmaterial wird dann durch eine Pufferflüssigkeit (ProCell), die Tripropylamin (TPA) enthält, aus der Messkammer ausgespült.
- Nachdem der Magnet weggeklappt wurde, wird an die Arbeitselektrode eine Spannung angelegt, welche die Elektro-Chemi-Lumineszenz-Reaktion auslöst. Die Rutheniumkomplexe, die in den Antigen-Antikörper-Komplexen eingebunden sind, werden oxidiert und so dazu veranlasst, Licht zu emittieren. Die Lichtstärke verhält sich direkt proportional zum Antigengehalt der zu untersuchenden Probe. Sie wird mit einem Photomultiplier gemessen und in Konzentrationen (pg/ml) umgerechnet.

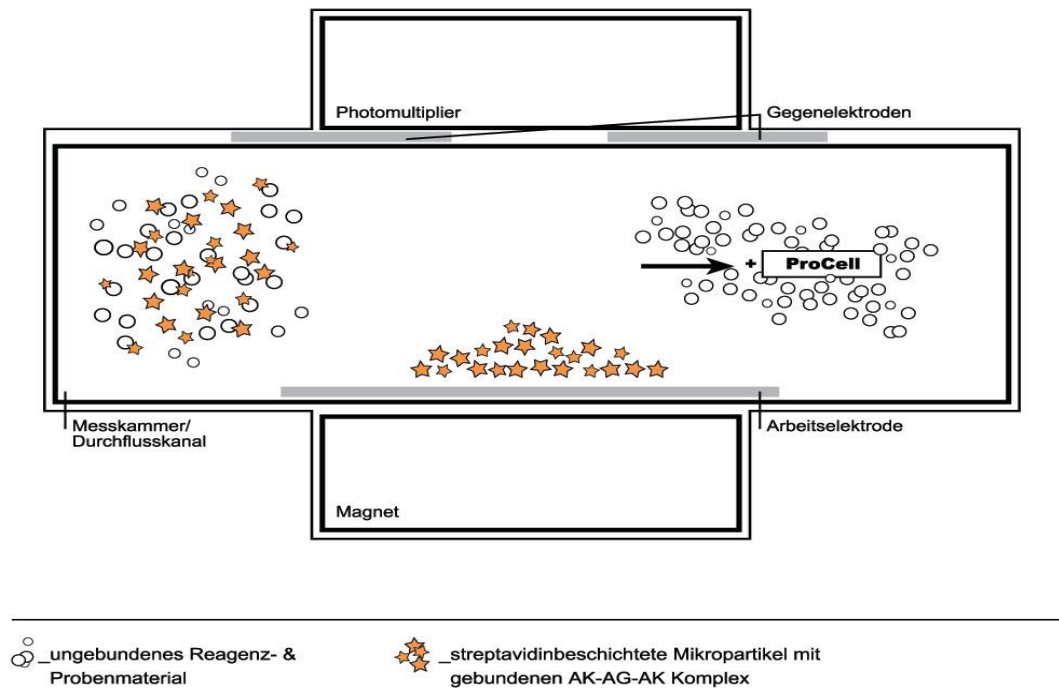


Abbildung 6: Funktionsweise des Elecsys 2010

Die Bewertung und Berechnung der Antigen – beziehungsweise NTproBNP-Konzentration wird mit Hilfe einer Kalibrationskurve ausgeführt die mit Kalibratoren bekannter Antigenkonzentrationen ermittelt wurde. Sie wird durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve vor Beginn des Tests gerätespezifisch generiert. Sowohl die Bewertung als auch die Berechnung der Probenkonzentration erfolgt automatisch durch den Elecsys 2010-Analyseautomaten.

Vorteil dieses Testverfahrens ist die hohe Sensitivität und die kurze Inkubationszeit (18 Minuten) für die Antigen-Antikörper-Reaktionen. Der Einsatz von Mikropartikeln erlaubt zudem auch hier eine sichere Bindung an die Elektrode der Messzelle. Außerdem werden äußerst stabile Marker, die nicht radioaktiv sind, verwendet.

Die Bestimmung von NTproBNP kann nach Herstellerangaben in Serum, Li- und NH_4^+ -Heparin-Plasma und K_3 -EDTA-Plasma erfolgen. Es ist zu beachten, dass bei Verwendung von K_3 -EDTA-Plasma um ca. 10% niedrigere Werte gemessen werden.

Nach Herstellerangaben wurden für eine NTproBNP-Klassifizierung nach Alter und Geschlecht bei Blutspendern folgende Werte ermittelt:

Tabelle 4: NTproBNP-Klassifizierung (Elecsys 2010-Testanleitung, Roche Diagnostics GmbH)

Alter	18 – 49		50 – 59		> 60	
Geschlecht	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Anzahl	964	574	211	94	110	28
Median	20	39,3	27,4	65,8	42	61,4
95. Perzentile	63,9	125	125	186	194	204
97,5. Perzentile	84,2	146	179	270	278	262

Das Gerät weist für diesen Test einen Messbereich von 5 bis 35000 pg/ml aus. Liegen die gemessenen Werte höher, kann das Gerät je nach Benutzerwahl eine fünffache, zehnfache oder zwanzigfache Verdünnung vornehmen. Bei den dokumentierten Messergebnissen wird dies vom Elecsys 2010 berücksichtigt.

3.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel® und das Statistik-Programm SPSS® 11.0 für das Betriebssystem Windows von Microsoft verwendet. Die Ergebnisse wurden durch die GLM-Varianzanalyse mit Messwiederholungen ausgewertet. Eine post-hoc Analyse mit adjustierten p-Werten erschien nicht aussagekräftiger als die graphische Betrachtung der Plots. Aus diesem Grunde wurde die globale Signifikanz der Interaktion in Verbindung mit der graphischen beziehungsweise optischen Analyse der Konzentrationsverläufe beschrieben.

Unter anderem Verwendung fand der Test nach Levene, der auf die Homogenität von Varianzen zwischen Gruppen testet, sowie die Pillai-Spur, eine multivariate, mehrfaktorielle und robuste Prüfgröße. Letztere untersucht die Abhängigkeit von Parametern untereinander und wurde von Olsen 1976 für kleinere Stichproben empfohlen. Die Signifikanz ist hoch, wenn $p < 0,001$ ist.

Die statistische Beratung und Auswertung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps Universität in Marburg.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der verschiedenen Messungen werden nachfolgend in einigen repräsentativen Diagrammen dargestellt. Die gesamten Diagramme zu jedem einzelnen Versuch sind im Anhang zu finden. Die gestrichelten Linien werden jeweils für die Proben verwendet, die bei 4°C aufbewahrt wurden. Diesen steht außerdem ein großes K für „kalt“ voran, zum Beispiel K-EDTA-Plasma, K-EDTA-Vollblut, K-EDTA-Trasylol usw. Die durchgezogenen Linien entsprechen den ungekühlten Proben. Es wurden immer die gleichen Farben für die jeweiligen Blutentnahmegefäße verwendet, nämlich: dunkelblau für EDTA-Plasma, rot für EDTA-Vollblut, hellblau für EDTA-Vollblut-Trasylol, grün für Lithium-Heparin, rosa für Serum und in drei Fällen braun für den Kalium-EDTA-Vacutainer aus Glas.

Die x-Achse gibt die Zeit in Minuten an. Die y-Achse gibt die BNP- beziehungsweise die NTproBNP-Konzentration in pg/ml (Pikogramm pro Milliliter) an.

War aus technischen Gründen ein Punkt nicht analysierbar, erfolgte die Kennzeichnung im Diagramm als Leerstelle.

In dieser Arbeit wurde bei der Auswertung der Ergebnisse die Zugabe von Trasylol mengenmäßig nicht berücksichtigt. Die angegebenen Ergebnisse beziehen sich auf eine Füllmenge von 9,45 ml in den EDTA-Röhrchen (nach Zugabe von 450 µl Trasylol). Wollte man hier die Werte korrigieren, müsste mit dem Faktor 1,05 multipliziert werden. Diese Korrektur der Ergebnisse wäre dann aber nur eine ungefähre Annäherung an den echten Wert, da man nicht zu 100% voraussetzen kann, dass die Blutentnahmegefäße immer vollständig befüllt wurden. Die folgende Tabelle zeigt, wie sich die Korrektur der Ergebnisse in den EDTA-Trasylol-Proben auswirken würde:

Tabelle 5: EDTA-Trasylol (bei Raumtemperatur und bei 4°C), Messergebnis und Korrektur

	EDTA-T	EDTA-T korrigiert	K-EDTA-T	K-EDTA-T korrigiert
0'	960	1008	980	1029
15'	980	1029	1004	1054
30'	930	977	998	1047
60'	977	1026	1019	1069
120'	1017	1067	991	1040
360'	1025	1076	1011	1061
720'	1023	1074	1044	1096
1440'	1053	1105	1092	1146

4.1 BNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)

Die Abbildungen 7 bis 9 zeigen jeweils ein repräsentatives Versuchsergebnis aus der Gruppe der Patienten mit BNP-Werten > 100 pg/ml, zwischen 50 und 100 pg/ml und aus der Gruppe der Gesunden mit BNP-Werten < 50 pg/ml.

Schon zu Beginn, also bei der 0 min-Messung beziehungsweise der 15 min-Messung für Serum, werden die BNP-Konzentrationen in Heparin-Plasma, in K-Heparin-Plasma und in K-Serum aufbewahrt bei 4°C, in Serum und im Vacutainer aus Glas durchschnittlich niedriger gemessen als in den EDTA-Röhrchen. Das heißt, die größte Stabilität von BNP zeigte sich in den EDTA-Röhrchen, wobei die Aufbewahrungstemperatur keinen sonderlichen Unterschied machte. In EDTA-Plasma, Heparin-Plasma und Serum fielen die Peptidkonzentrationen bei 4°C durchschnittlich etwas geringer ab als bei Raumtemperatur (11,1% statt 14,1%, 38,9% statt 49% und 82,3% statt 84,6%).

Es wurden die Werte für die 0 min-Messungen der Serum-Röhrchen anhand von Liniendiagrammen geschätzt und in die Tabellen eingefügt, da im Statistikprogramm SPSS® sonst keine Berechnungen möglich wären.

Der Levene-Test zeigt Varianzhomogenität für die Zeitpunkte 0 min bis 1440 min ($p > 0,05$). Die Pillai-Spur ergibt einen signifikanten Einfluss der Zeit ($p < 0,001$).

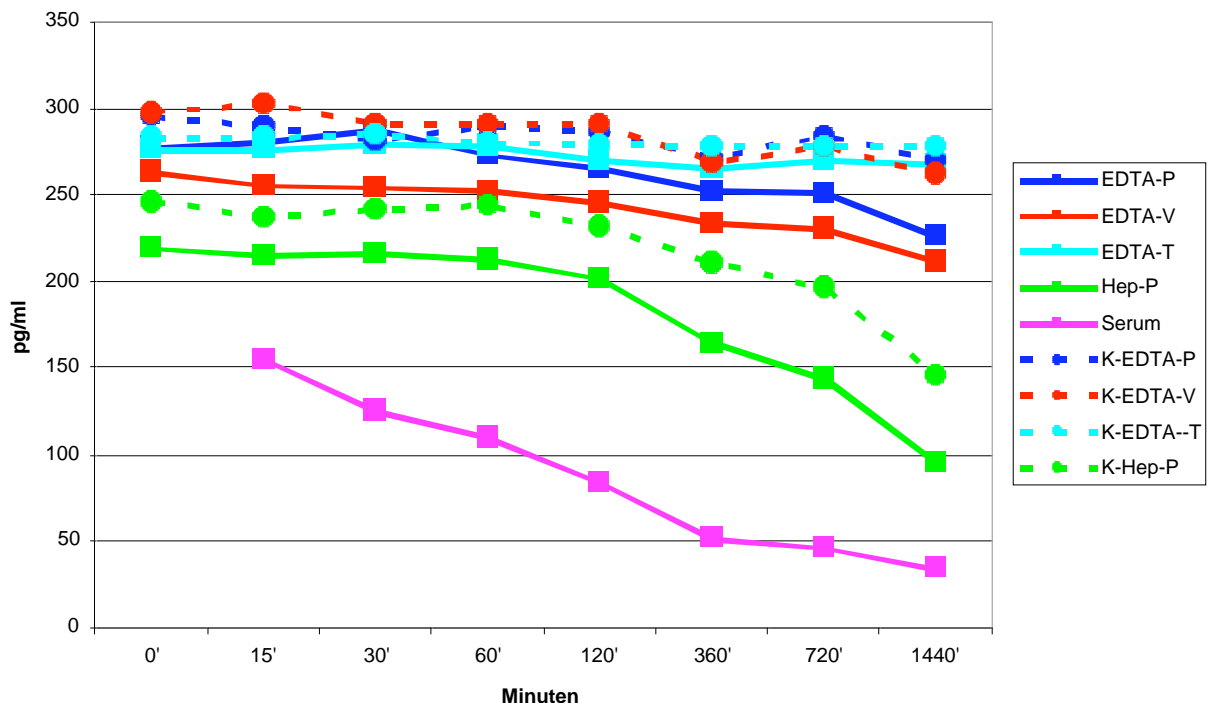


Abbildung 7: BNP-Messung bei Patient mit Herzinsuffizienz

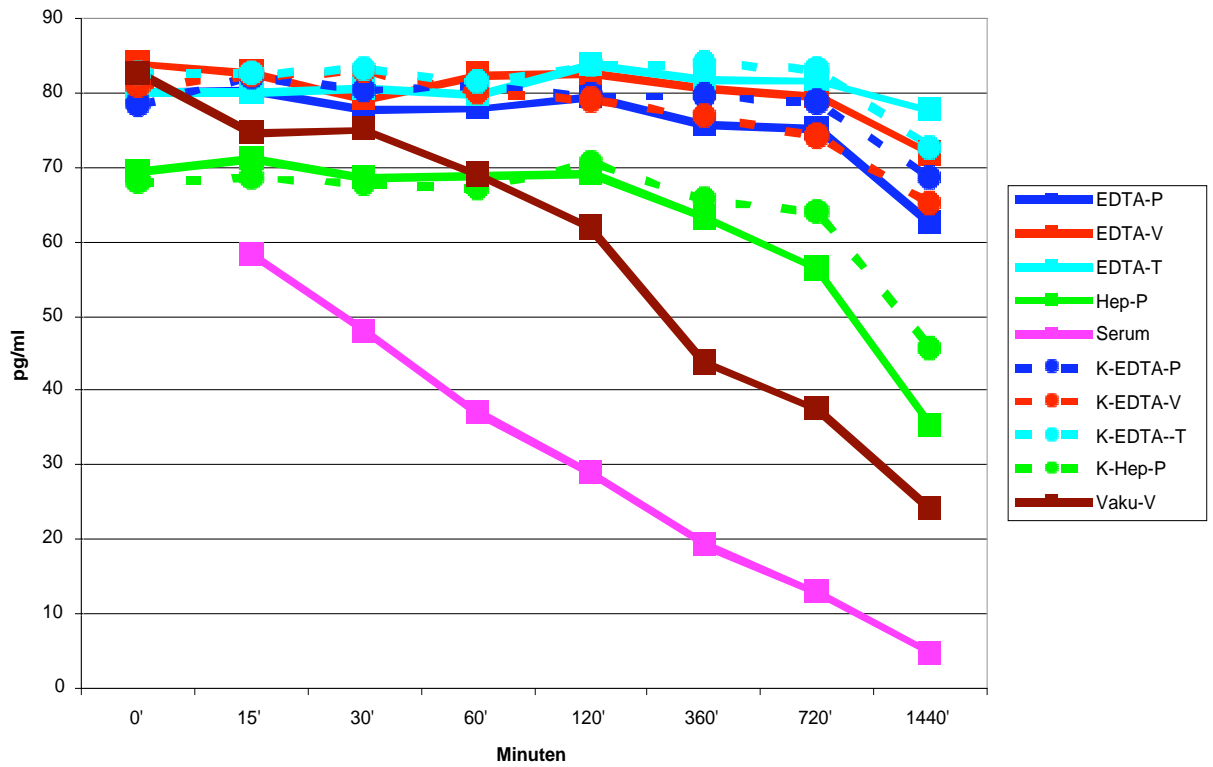


Abbildung 8: BNP-Messung bei Patient ohne kardiale Symptomatik

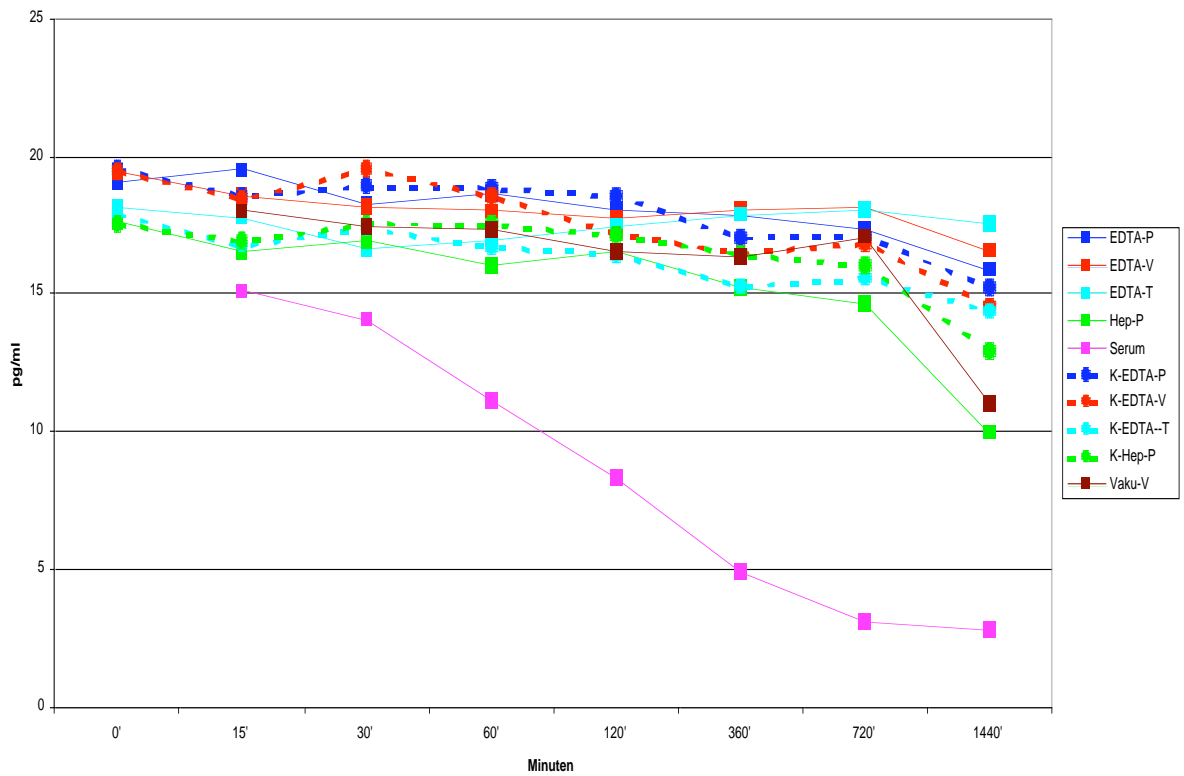


Abbildung 9: BNP-Messung bei einem Gesunden

4.2 Statistische Auswertungen der BNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)

Es wurden die Mittelwerte aus einem Probandenkollektiv gebildet und dann der Konzentrationsabfall im jeweiligen Blutentnahmesystem graphisch dargestellt. Die x-Achse zeigt die Messzeitpunkte in Minuten, die y-Achse die Mittelwerte in pg/ml.

Sehr stabil war BNP in EDTA-Vollblut bei Raumtemperatur. Der Abfall betrug hier durchschnittlich 1,9% (von anfangs durchschnittlich 73,51 pg/ml auf durchschnittlich 72,09 pg/ml nach 24 Stunden). Bei Aufbewahrung bei 4°C betrug der Abfall durchschnittlich 14,3% (von anfangs durchschnittlich 92,93 pg/ml auf durchschnittlich 79,65 pg/ml nach 24 Stunden).

n=10

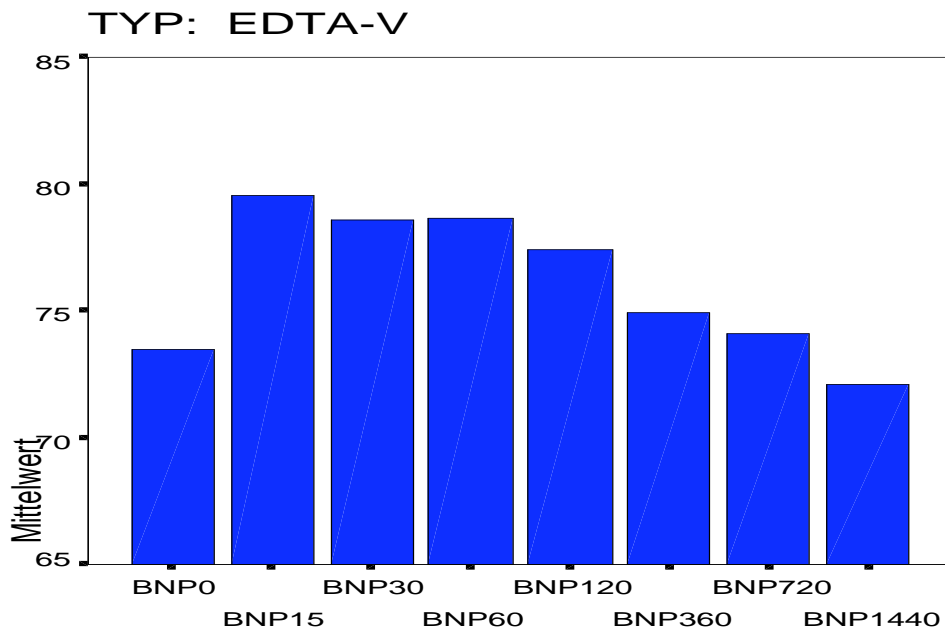


Abbildung 10: BNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (Raumtemperatur)

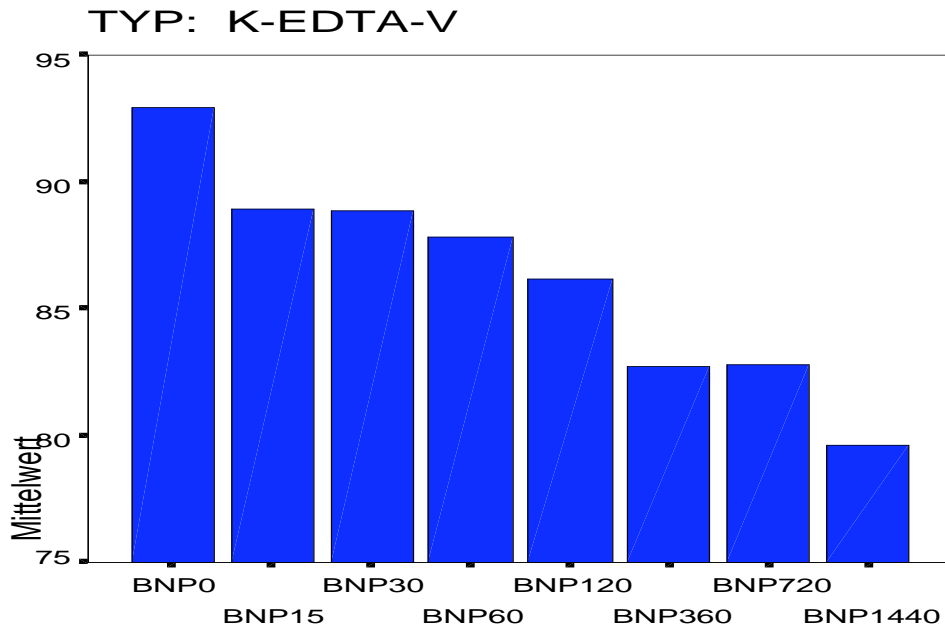


Abbildung 11: BNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (4°C)

In EDTA-Vollblut mit Trasyloil fiel die BNP-Konzentration durchschnittlich um 3,6% ab (von anfangs durchschnittlich 80,55 pg/ml auf durchschnittlich 77,65 pg/ml nach 24 Stunden). Wurden die Röhrchen mit gleichem Inhalt bei 4°C aufbewahrt, betrug der Abfall hingegen durchschnittlich 7,1% (von anfangs durchschnittlich 89,21 pg/ml auf durchschnittlich 82,85 pg/ml nach 24 Stunden). n=10

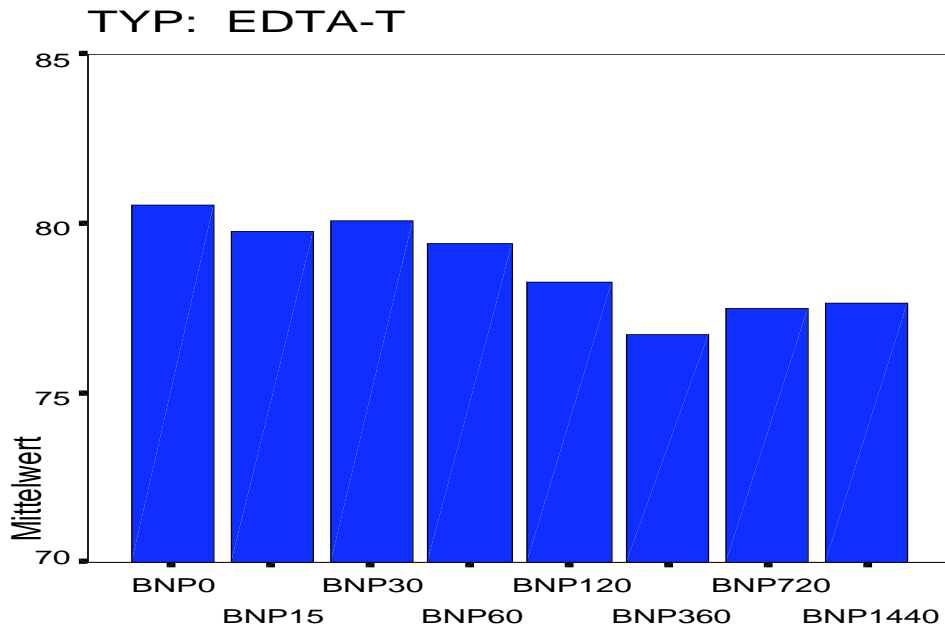


Abbildung 12: BNP-Ergebnis EDTA-Trasyloil (Raumtemperatur)

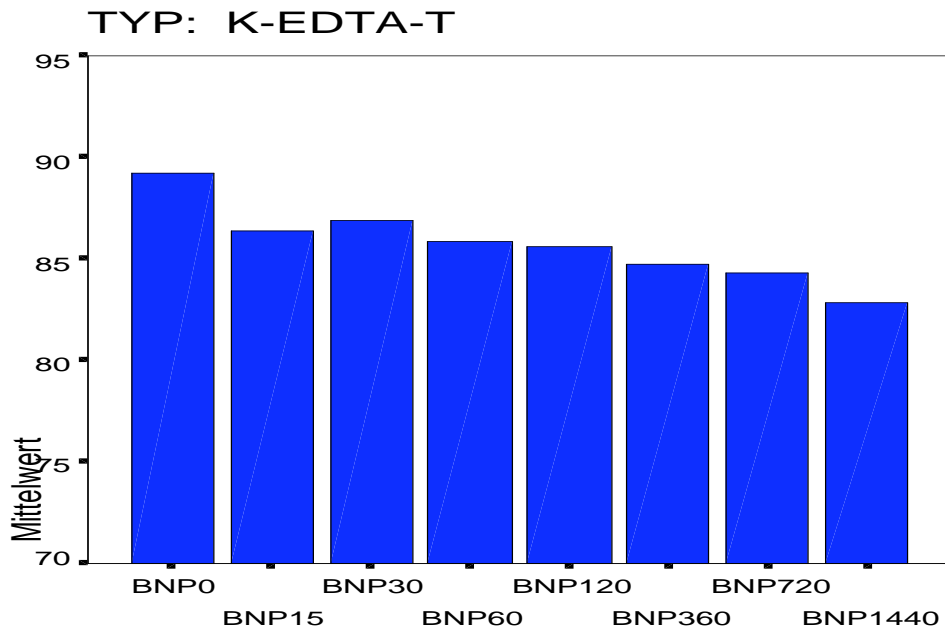


Abbildung 13: BNP-Ergebnis EDTA-TrasyloI (4°C)

In EDTA-Plasma zeigte sich ein Abfall von BNP um durchschnittlich 14,1% (von anfangs durchschnittlich 86,54 pg/ml auf durchschnittlich 74,38 pg/ml nach 24 Stunden). In diesem Entnahmesystem war der Konzentrationsabfall in der bei 4°C gekühlten Probe geringer. Er betrug durchschnittlich 11,1% (von anfangs durchschnittlich 92,36 pg/ml auf durchschnittlich 82,10 pg/ml nach 24 Stunden). n=10

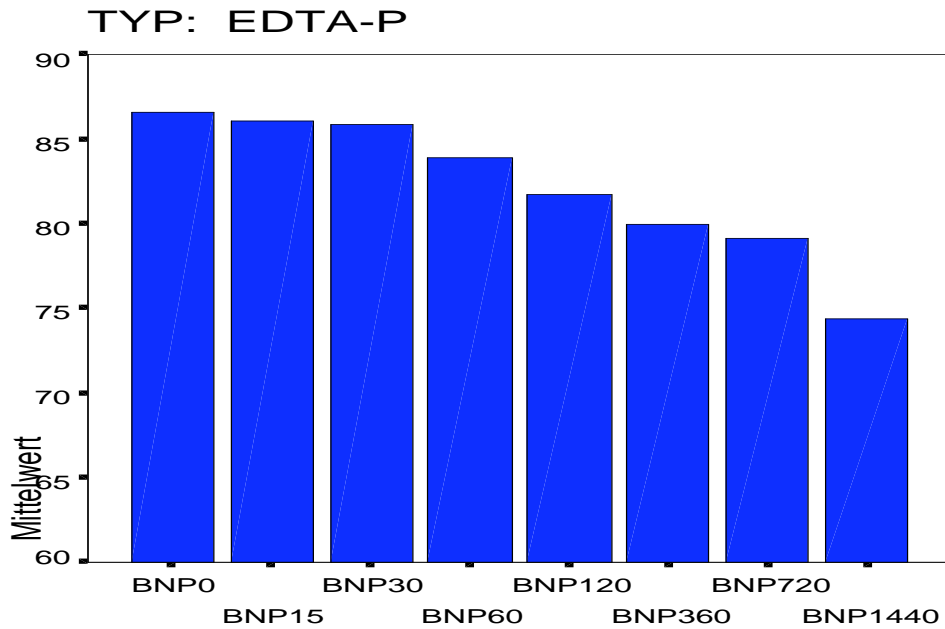


Abbildung 14: BNP-Ergebnis EDTA-Plasma (Raumtemperatur)

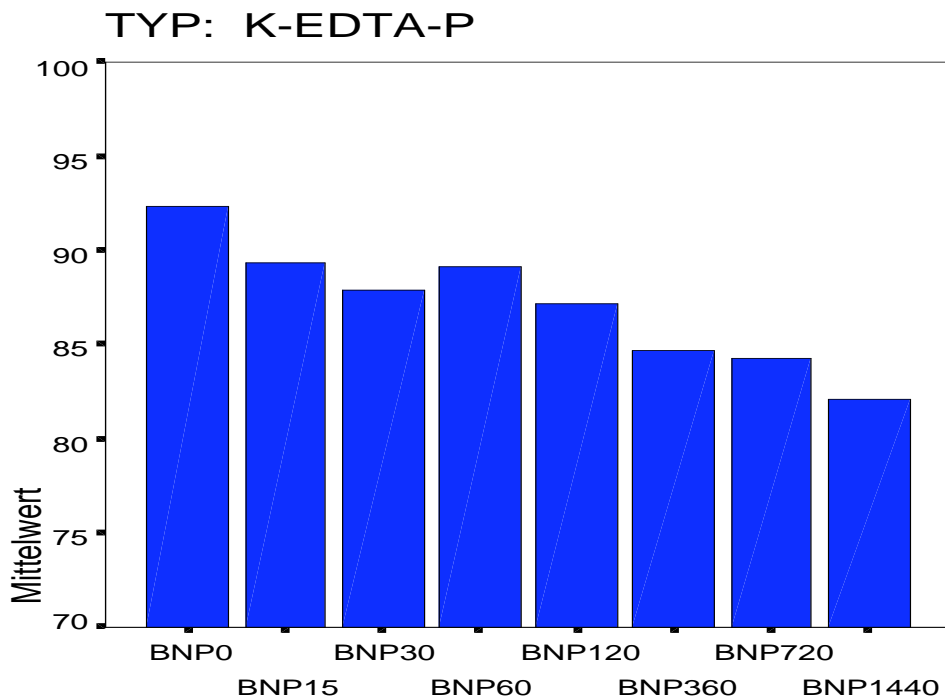


Abbildung 15: BNP-Ergebnis EDTA-Plasma (4°C)

Ein sehr deutlicher Abfall der BNP-Konzentration war in Heparin-Plasma sichtbar: durchschnittlich um 49% (von anfangs durchschnittlich 64,04 pg/ml auf durchschnittlich 32,68

pg/ml nach 24 Stunden). In K-Heparin-Plasma bei 4°C gekühlt fiel die Konzentration nur um 38,9% (von anfangs durchschnittlich 68,29 pg/ml auf durchschnittlich 41,74 pg/ml nach 24 Stunden). n=10

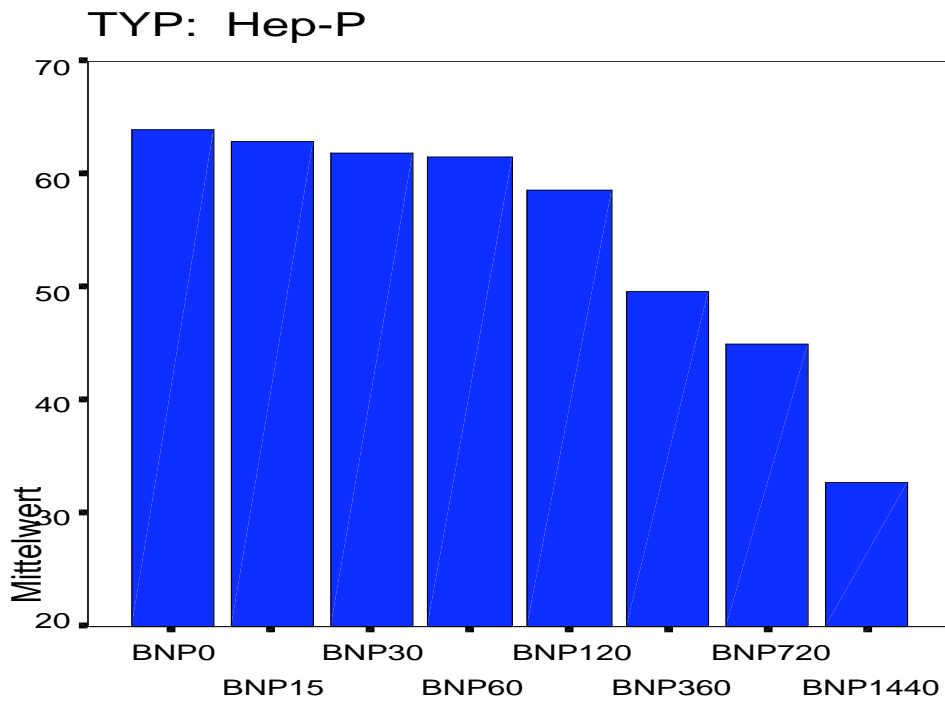


Abbildung 16: BNP-Ergebnis Heparin-Plasma (Raumtemperatur)

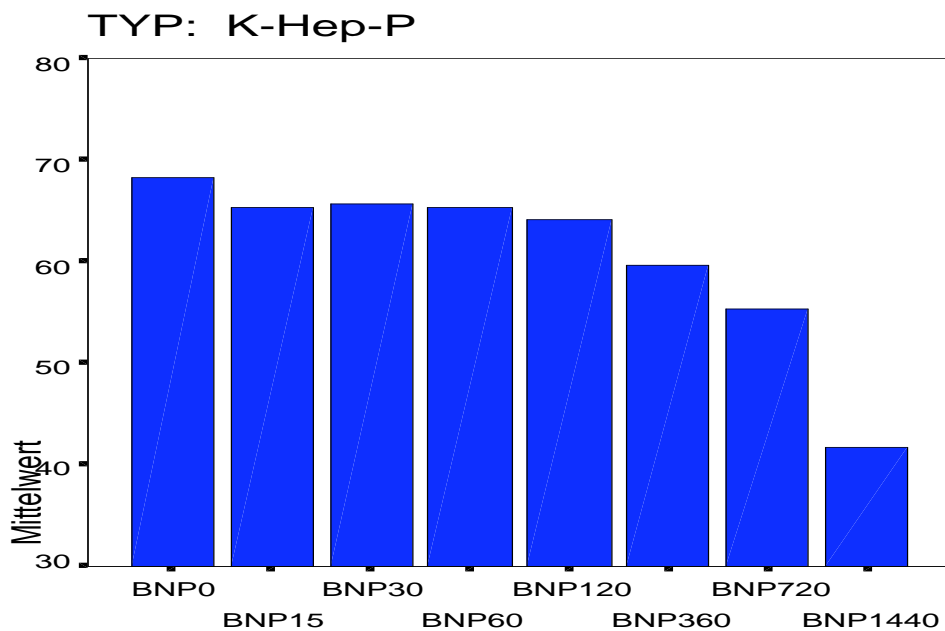


Abbildung 17: BNP-Ergebnis Heparin-Plasma (4°C)

Der größte Abfall konnte im Serum beobachtet werden, wo sich BNP um durchschnittlich 84,6% verringerte (von durchschnittlich 61,11 pg/ml bei der geschätzten 0 min.-Messung auf durchschnittlich 9,44 pg/ml nach 24 Stunden). Bei der ersten Versuchsperson wurde außerdem ein Serum-Röhrchen bei 4°C gekühlt aufbewahrt. Darin fiel BNP um 82,3% (von 56,92 pg/ml bei der 15 min.-Messung auf 10,09 pg/ml nach 24 Stunden). n=9 bzw. n=1 für Serum bei 4°C

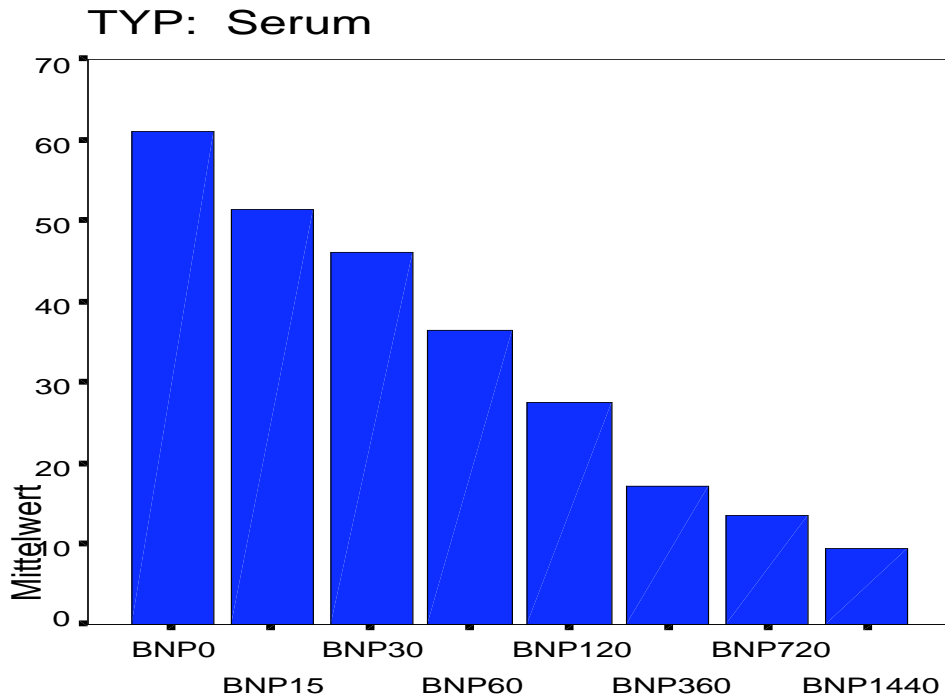


Abbildung 22: BNP-Ergebnis Serum (Raumtemperatur)

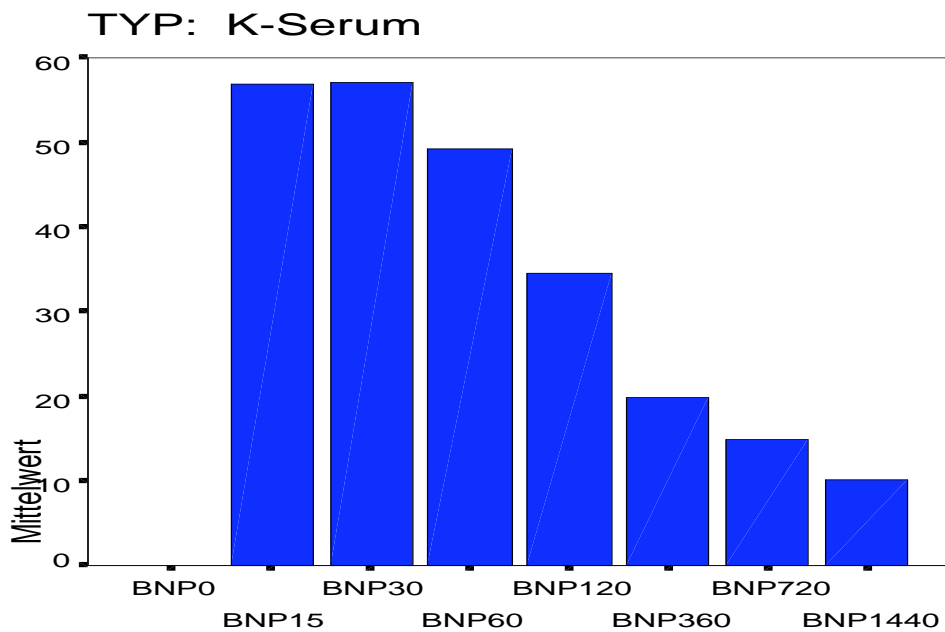


Abbildung 23: BNP-Ergebnis Serum (4°C)

Bei drei Versuchen wurde auch ein Vacutainer aus Glas verwendet, der bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. Hier war der Abfall besonders deutlich: um durchschnittlich 67,8% (von anfangs durchschnittlich 53,84 pg/ml auf durchschnittlich 17,33 pg/ml nach 24 Stunden).

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Monovetten zum Zeitpunkt 0 im Überblick.

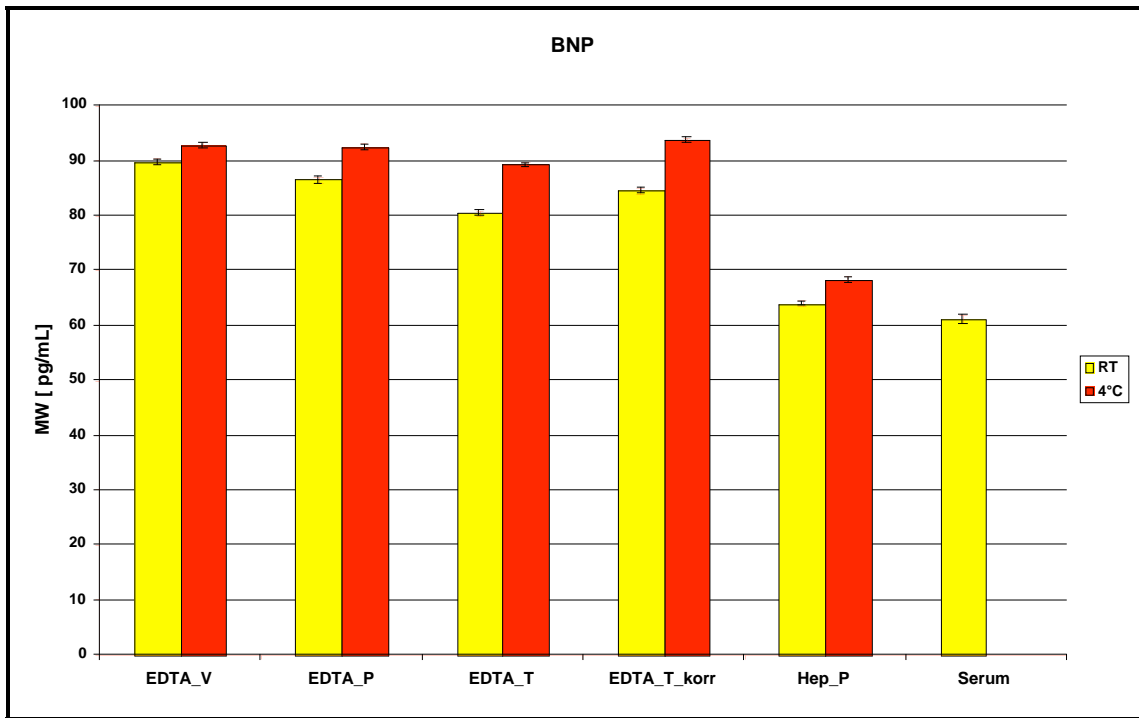


Abbildung 24: BNP-Ergebnisse aller Monovetten (Raumtemperatur und 4°C)

4.3 NTproBNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)

Insgesamt zeigen NTproBNP-Messungen eine größere Konstanz als die von BNP. Außer im Vacutainer finden sich zu Anfang keine Entnahmegefäße, in denen die NTproBNP-Konzentrationen auffallend höher oder niedriger gemessen werden. In dem Glasgefäß wurden durchgehend etwas niedrigere Konzentrationen gemessen als in den übrigen Plastikgefäßen. Im Vergleich zu BNP kann man vielmehr einen leichten Anstieg der NTproBNP-Werte beobachten.

Die Serum-Werte der 0 min.-Messungen wurden auch für NTproBNP anhand von Liniendiagrammen geschätzt und ergänzt. Aus technischen Gründen fehlende Werte wurden aus dem voranstehenden und dem nachfolgenden Wert als Mittelwert der beiden errechnet und ergänzt.

Die Aufbewahrungstemperatur hat einen Effekt auf die Stabilität von NTproBNP. Denn sowohl in K-EDTA-Plasma, K-EDTA-TrasyloI, K-EDTA-Vollblut als auch in K-Heparin-Plasma steigen die Konzentrationen mehr an als in den Proben der gleichen, bei Raumtemperatur aufbewahrten Gefäße.

Der Levene-Test zeigt Varianzhomogenität für die Messzeitpunkte 0 min. bis 1440 min ($p > 0,05$). Die Pillai-Spur ergibt einen nicht signifikanten Einfluss der Zeit ($p > 0,05$).

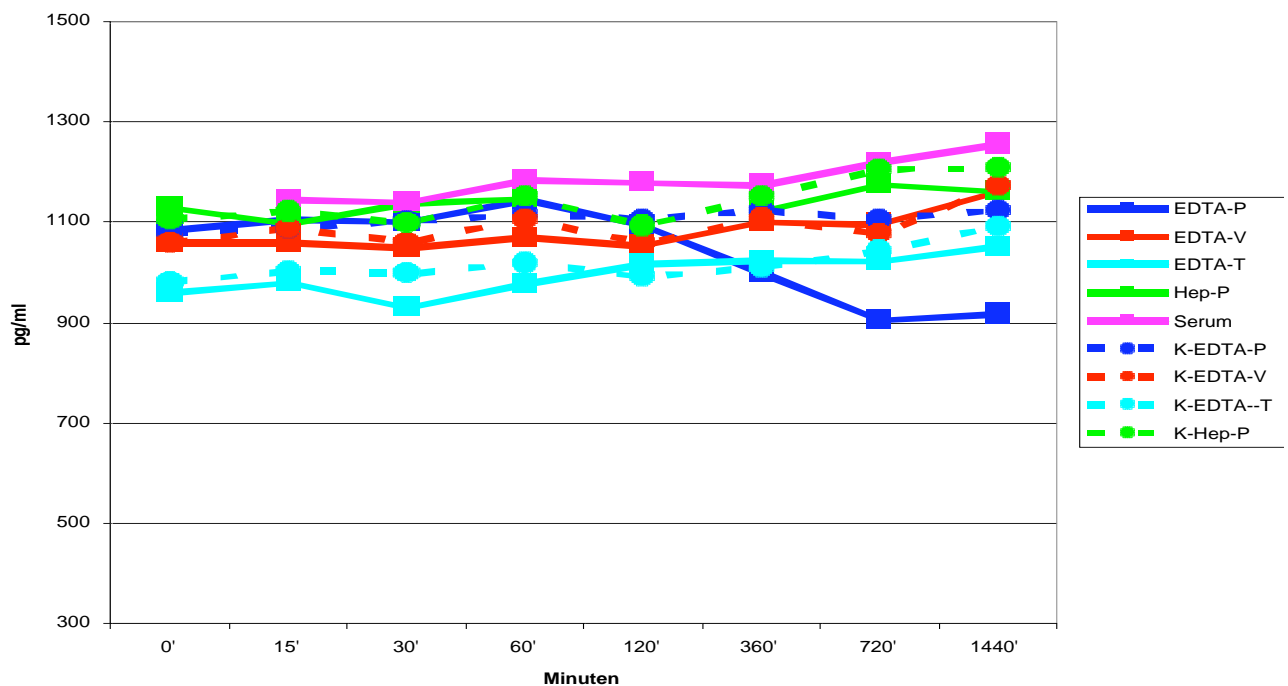


Abbildung 25: NTproBNP-Messung bei Patient mit Herzinsuffizienz

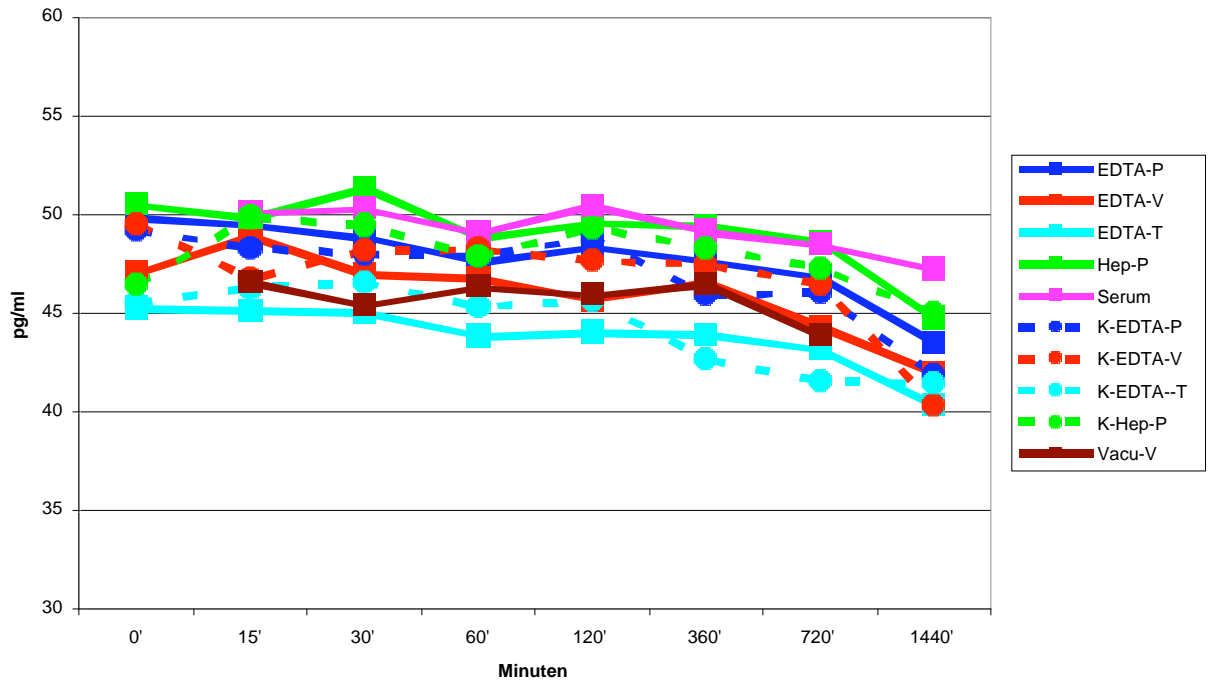


Abbildung 18: NTproBNP-Messung bei Patient ohne kardiale Symptomatik

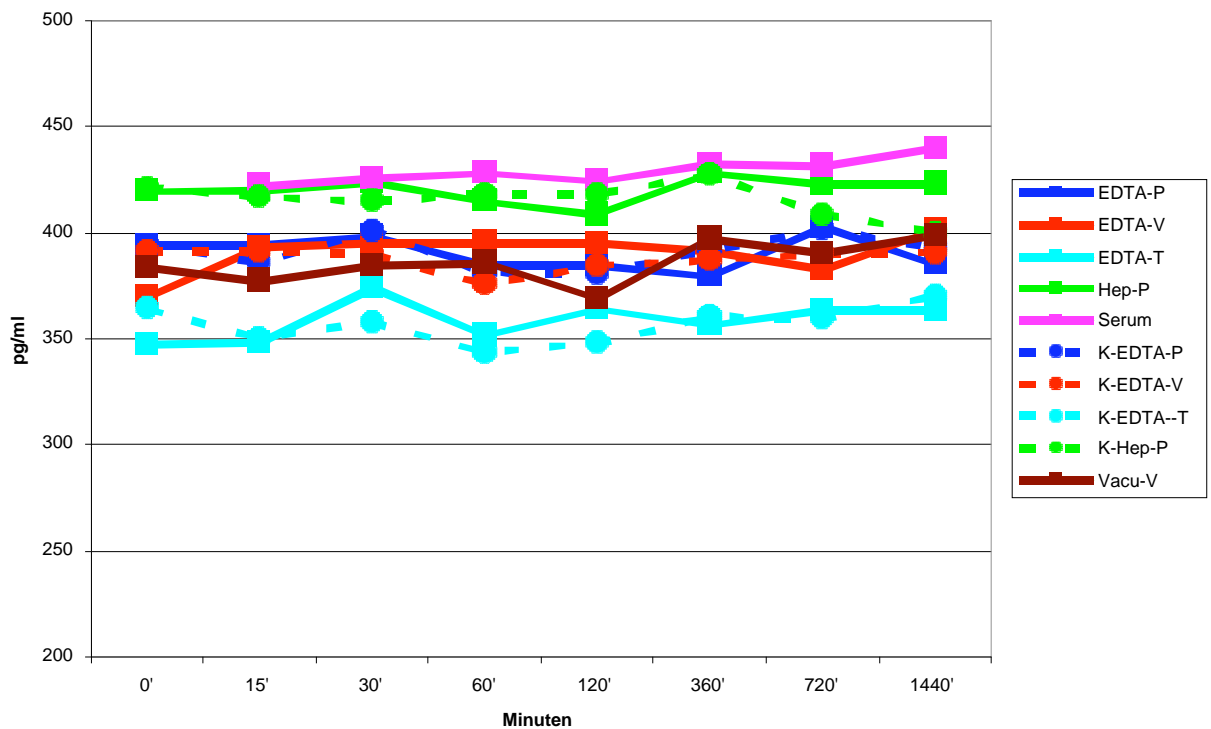


Abbildung 19: NTproBNP-Messung bei einem Gesunden

4.4 Statistische Auswertungen der NTproBNP-Messungen (ohne Intensiv- und Dialysepatienten)

Es wurden Mittelwerte aus einem Probandenkollektiv gebildet und dann die Konzentrationsschwankungen im jeweiligen Blutentnahmesystem graphisch dargestellt. Die x-Achse zeigt die Messzeitpunkte in Minuten, die y-Achse die Mittelwerte in pg/ml.

Der geringsten durchschnittlichen Veränderung war die NTproBNP-Konzentration im Vacutainer aus Glas unterworfen. Sie stieg durchschnittlich um 0,5% an (von anfangs durchschnittlich 231,07 pg/ml auf durchschnittlich 232,23 pg/ml nach 24 Stunden). n=3

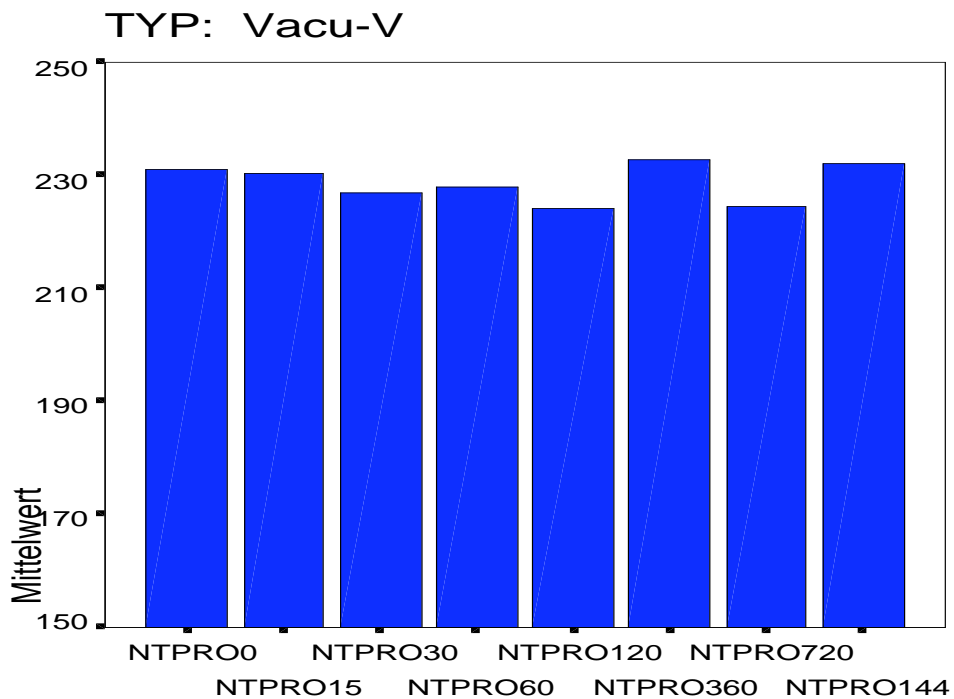


Abbildung 20: NTproBNP-Ergebnis Vacutainer-Vollblut (Raumtemperatur)

Der durchschnittliche NTproBNP-Anstieg war in Heparin-Plasma 0,7% (von anfangs durchschnittlich 353,63 pg/ml auf durchschnittlich 356,13 pg/ml nach 24 Stunden). Im gekühlten K-Heparin-Plasma beobachtete man einen größeren Anstieg der NTproBNP-Konzentration von durchschnittlich 4,4% (von anfangs durchschnittlich 346,74 pg/ml auf durchschnittlich 361,90 pg/ml nach 24 Stunden). n=9

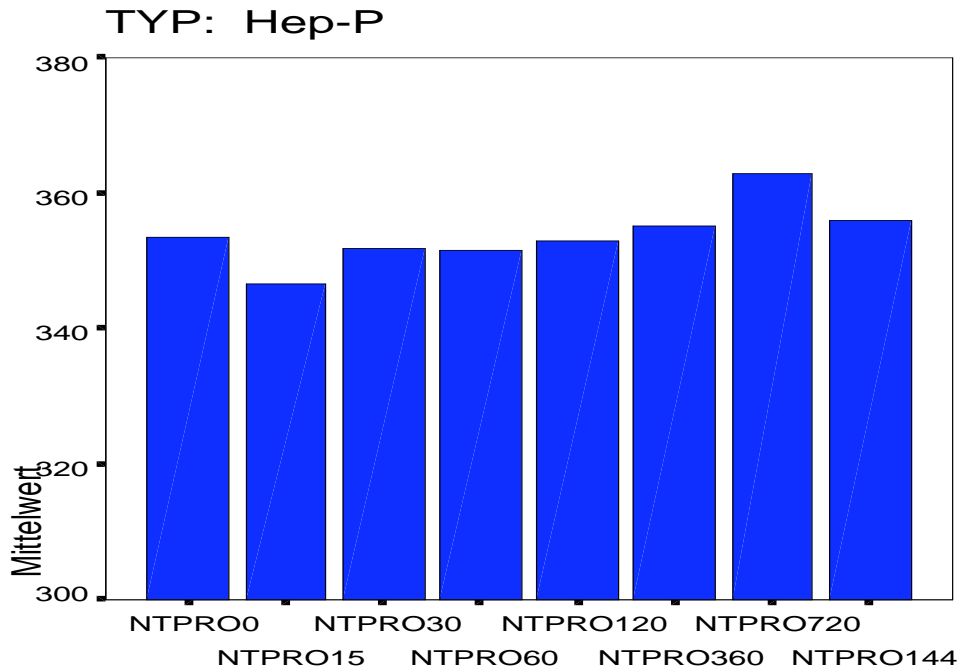


Abbildung 21: NTproBNP-Ergebnis Heparin-Plasma (Raumtemperatur)

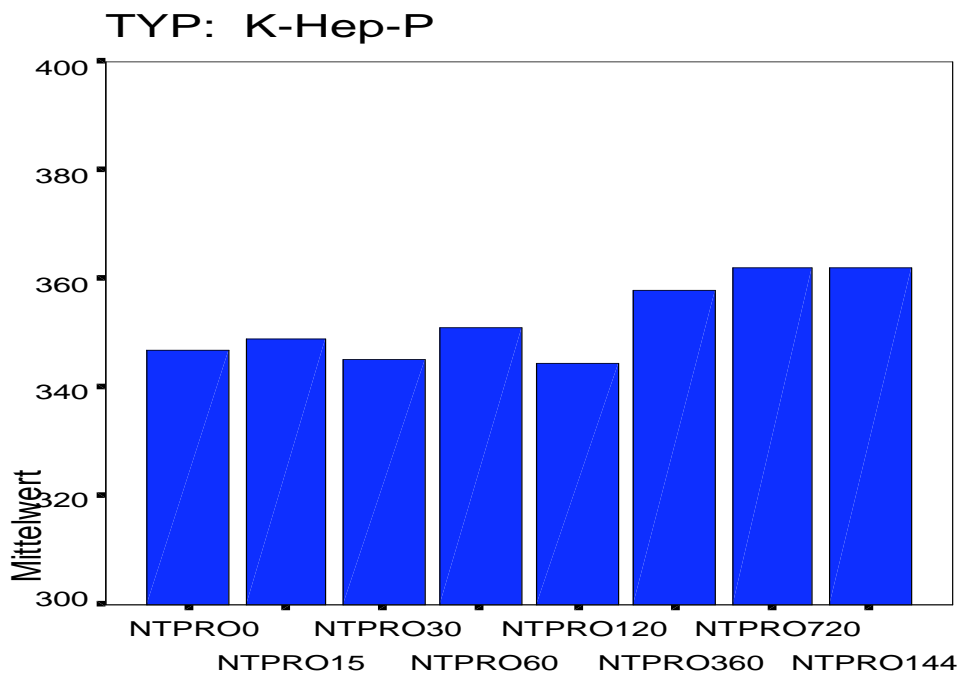


Abbildung 22: NTproBNP-Ergebnis Heparin-Plasma (4°C)

Ein leichter Anstieg der NTproBNP-Werte um durchschnittlich 1,8% konnte in EDTA-TrasyloI beobachtet werden (von anfangs durchschnittlich 354,27 pg/ml auf durchschnittlich 360,56 pg/ml nach 24 Stunden). Von allen Entnahmegefäßen am höchsten stieg NTproBNP in K-EDTA-TrasyloI um durchschnittlich 5,5% (von anfangs durchschnittlich 307,49 pg/ml auf durchschnittlich 324,38 pg/ml nach 24 Stunden). n=9

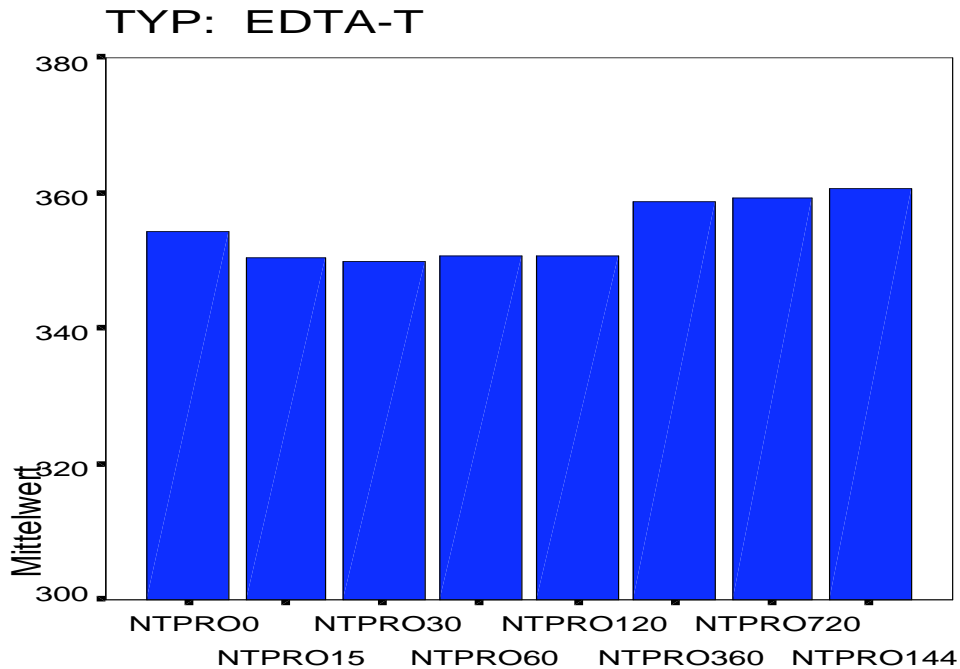


Abbildung 23: NTproBNP-Ergebnis EDTA-TrasyloI (Raumtemperatur)

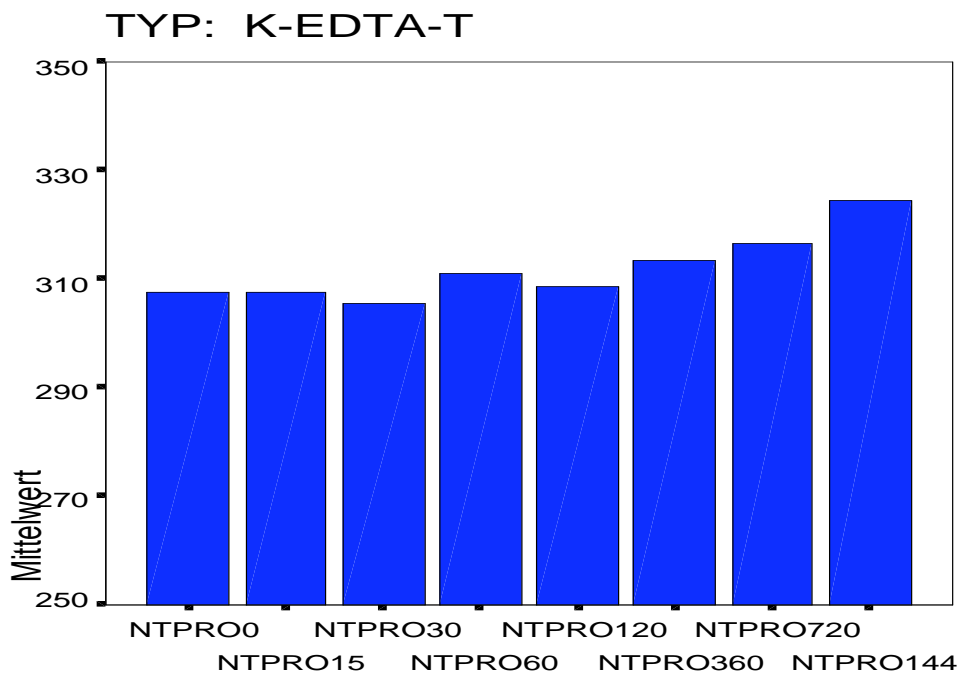


Abbildung 24: NTproBNP-Ergebnis EDTA-TrasyloI (4°C)

Allein in EDTA-Plasma ist ein NTproBNP-Abfall zu beobachten: durchschnittlich um 5,1% (von anfangs durchschnittlich 335,88 pg/ml auf durchschnittlich 318,77 pg/ml nach 24 Stunden). In K-EDTA-Plasma hingegen steigt die Konzentration um durchschnittlich 2,9% (von anfangs durchschnittlich 336,70 pg/ml auf durchschnittlich 346,41 pg/ml nach 24 Stunden). n=9

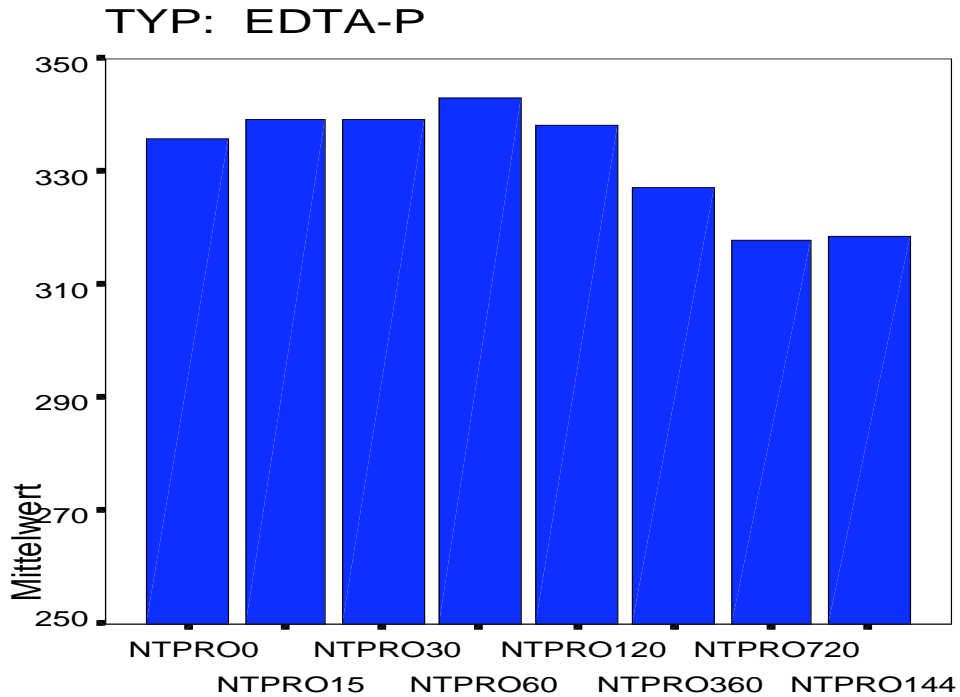


Abbildung 25: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Plasma (Raumtemperatur)

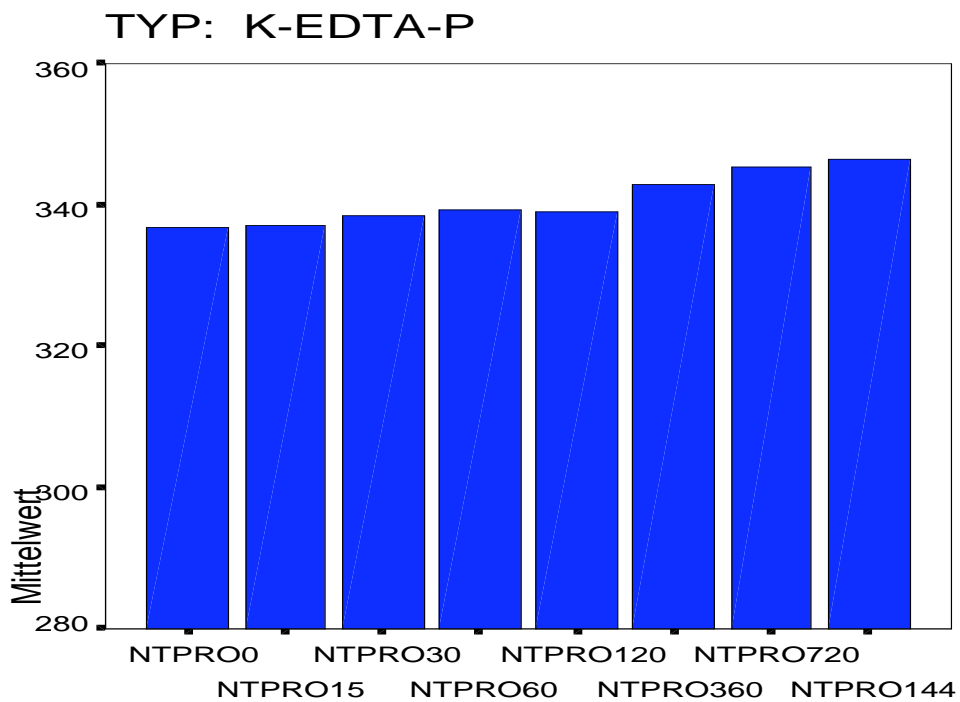


Abbildung 26: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Plasma (4°C)

NTproBNP steigt im Serum bei Raumtemperatur um durchschnittlich 3,2% (von anfangs durchschnittlich 364,13 pg/ml auf durchschnittlich 375,86 pg/ml nach 24 Stunden). n=8

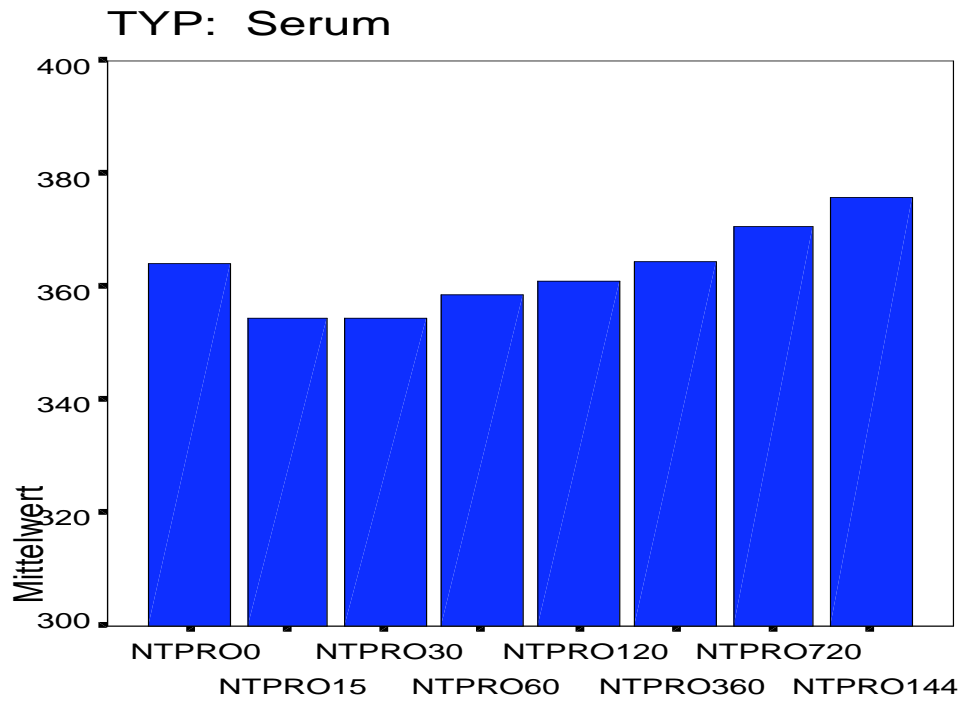


Abbildung 27: NTproBNP-Ergebnis Serum (Raumtemperatur)

Auch in EDTA-Vollblut steigen die NTproBNP-Werte um durchschnittlich 3,6% (von anfangs durchschnittlich 378,35 pg/ml auf durchschnittlich 391,85 pg/ml nach 24 Stunden). Etwas größer ist der durchschnittliche Anstieg der Werte in K-EDTA-Vollblut um 4,2% (von anfangs durchschnittlich 329,48 pg/ml auf durchschnittlich 343,23 pg/ml nach 24 Stunden). n=9

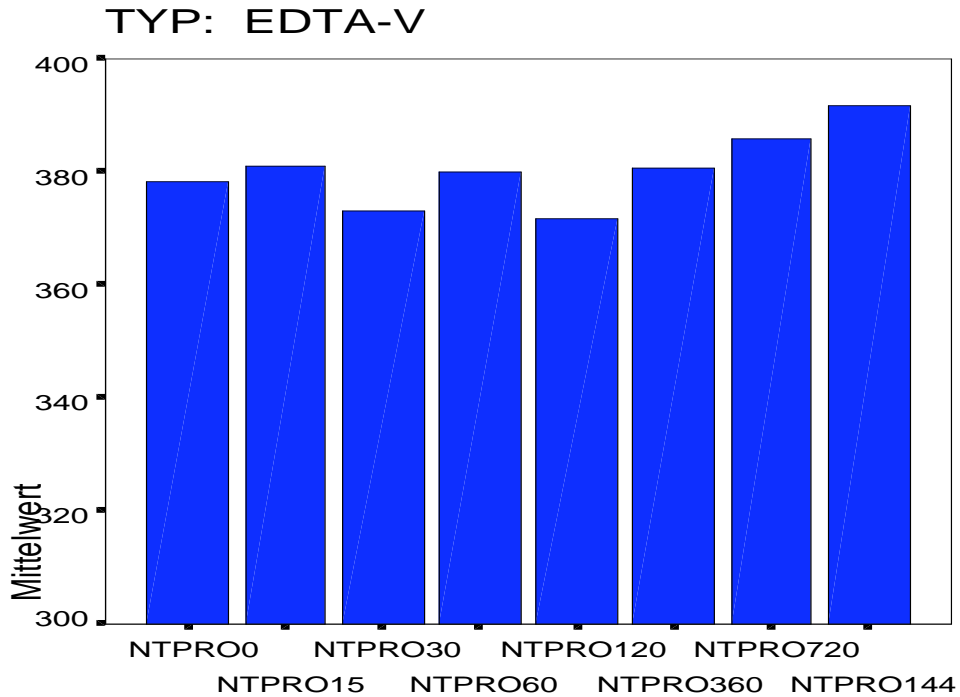


Abbildung 28: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (Raumtemperatur)

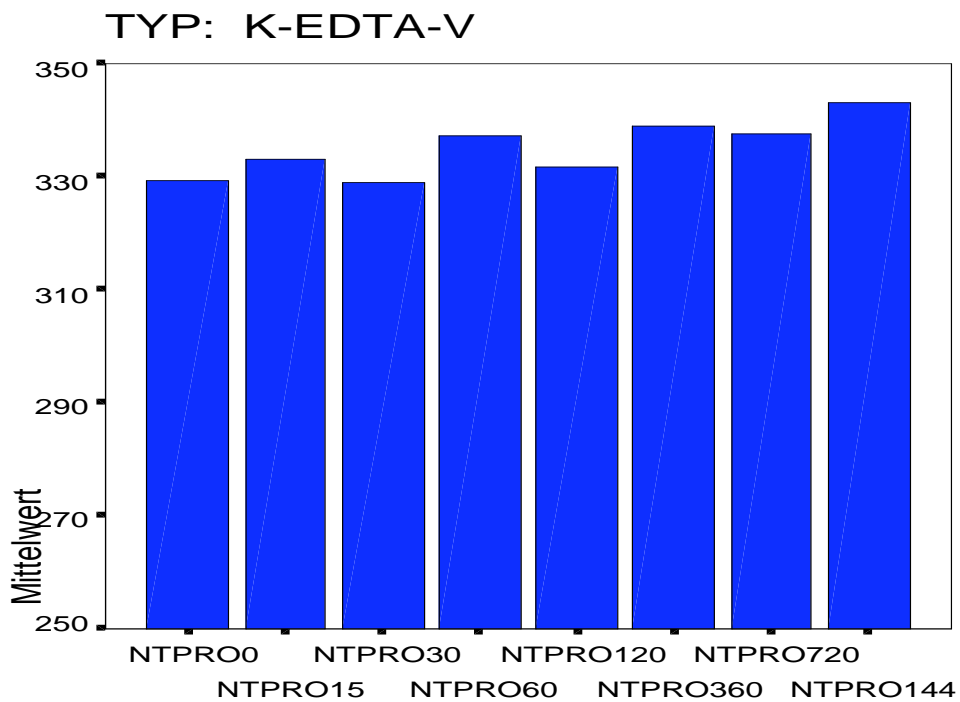


Abbildung 29: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (4°C)

4.5 BNP-Messungen bei Intensiv- und Dialysepatienten

Das Probandenkollektiv aus Dialysepatienten und Patienten der Intensivstation wird hier gesondert behandelt. Ihnen wurden nur zwei Röhrchen Blut entnommen (EDTA-Vollblut und EDTA-Vollblut-Trasylo), um ihren Kreislauf nicht unnötig zu belasten.

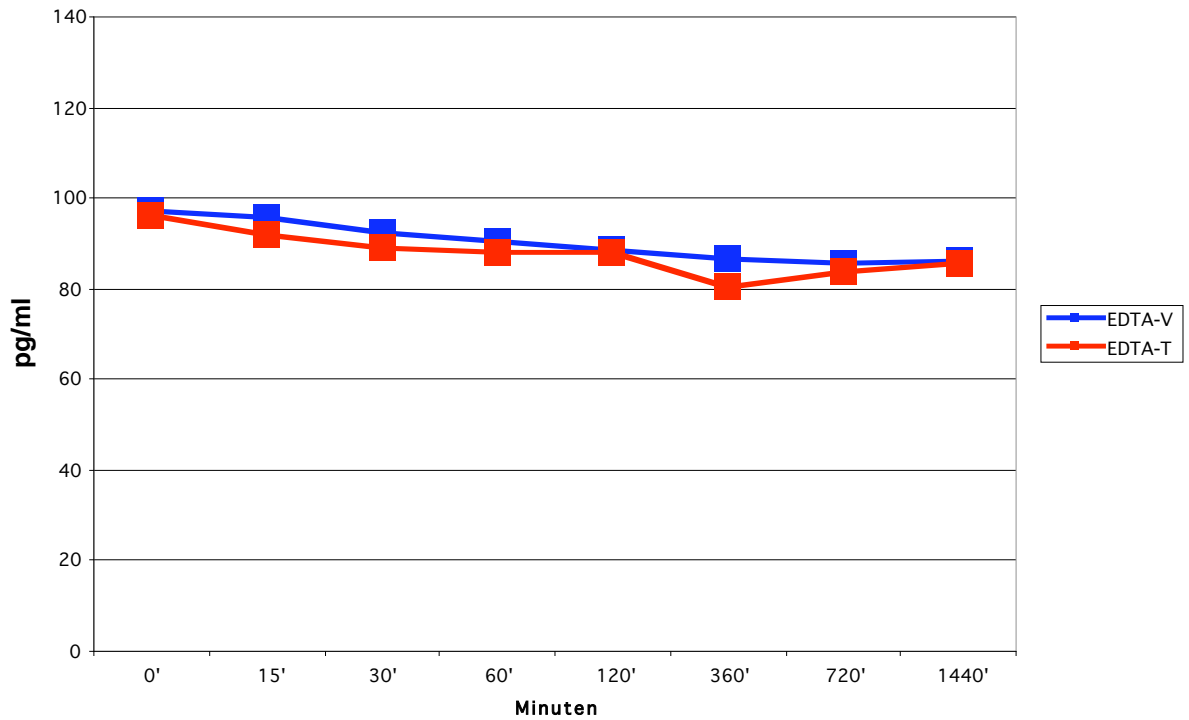


Abbildung 30: BNP-Messung bei einem Intensivpatienten

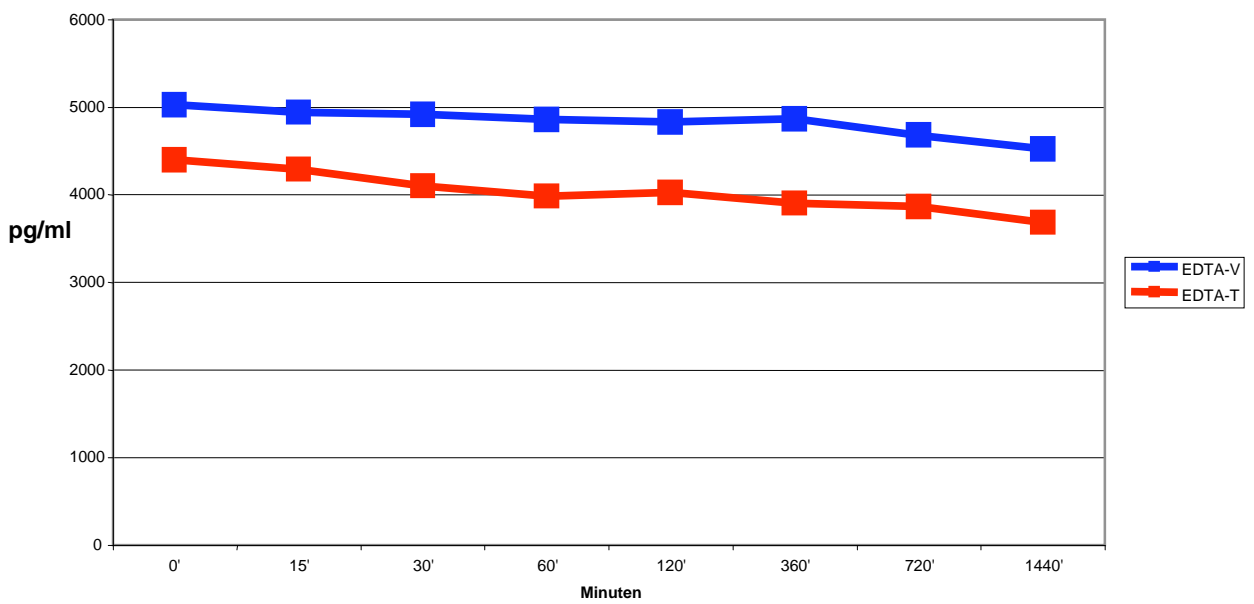


Abbildung 31: BNP-Messung bei einem Dialysepatienten

4 ERGEBNISSE

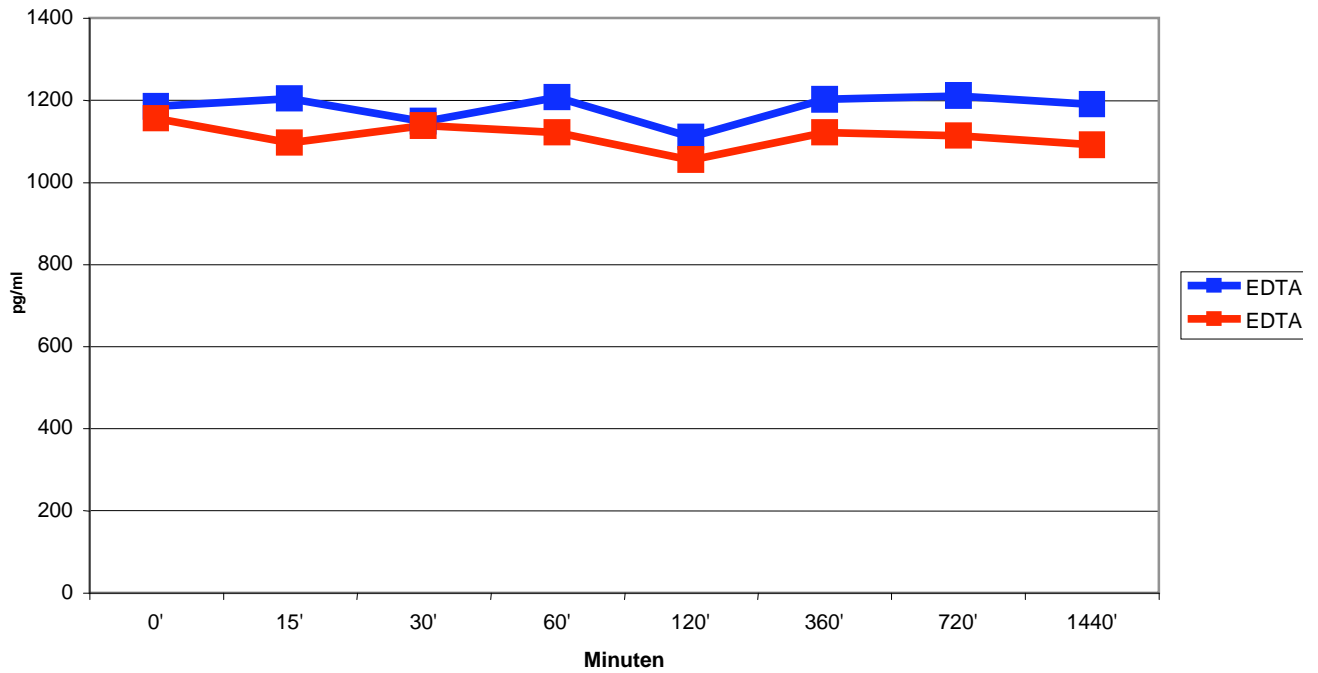


Abbildung 32: NTproBNP-Messung bei einem Intensivpatienten

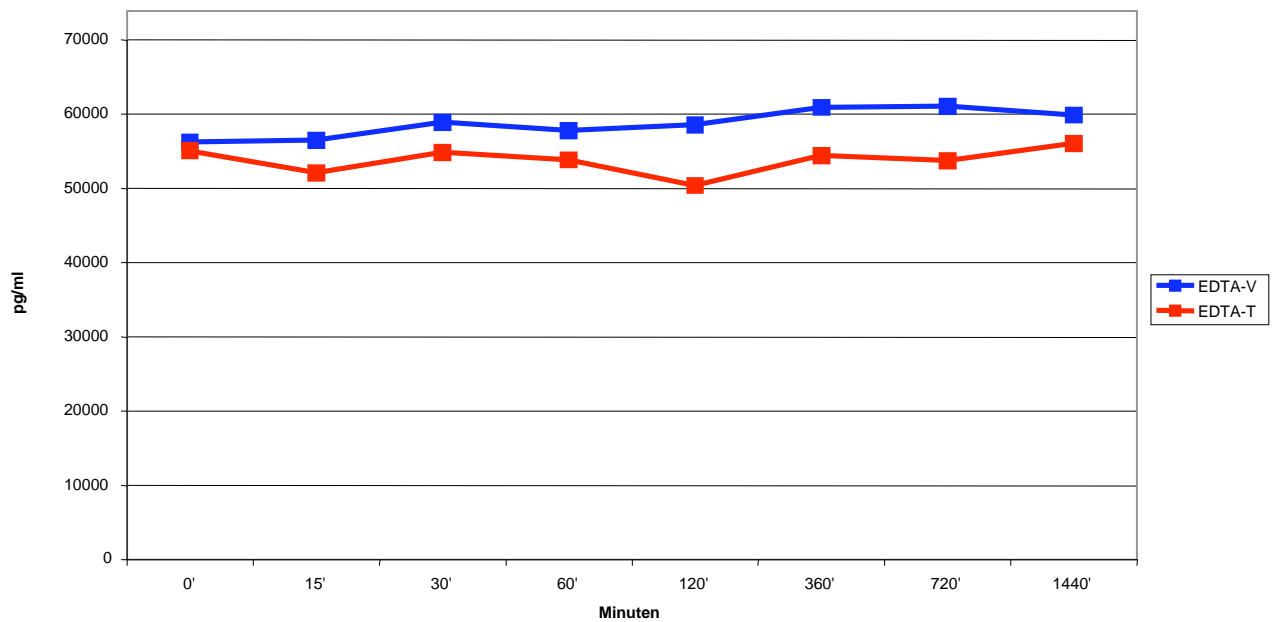


Abbildung 33: NTproBNP-Messung bei einem Dialysepatienten

In EDTA-Vollblut sowie in EDTA-Trasylol zeigt sich auch in diesem Kollektiv ein ähnlicher Konzentrationsverlauf für BNP und NTproBNP. Die NTproBNP-Werte steigen an, allerdings weitaus mehr als bei den übrigen Probanden. Der Levene-Test auf Gleichheit der Varianzen zeigt Varianzhomogenität für die Messzeitpunkte 0 min. bis 1440 min ($p > 0,05$). Die Pillai-Spur ergibt keinen signifikanten Einfluss der Zeit ($p = 0,032$ für BNP, $p = 0,042$ für NTproBNP).

4.6 Statistische Auswertungen der BNP- und NTproBNP-Messungen bei Intensiv- und Dialysepatienten

Es wurden wieder Mittelwerte aus einem Probandenkollektiv gebildet und dann die Konzentrationsschwankungen graphisch dargestellt. Die x-Achse zeigt die Messzeitpunkte in Minuten, die y-Achse die Mittelwerte in pg/ml.

Betrachtet man die Ergebnisse der Intensiv- und Dialysepatienten für sich, ergibt sich in EDTA-Vollblut verglichen mit den anderen Probanden ein stärkerer Abfall der BNP-Konzentration um durchschnittlich 12,1% (von anfangs durchschnittlich 3002,63 pg/ml auf durchschnittlich 2639,94 pg/ml nach 24 Stunden). n=14

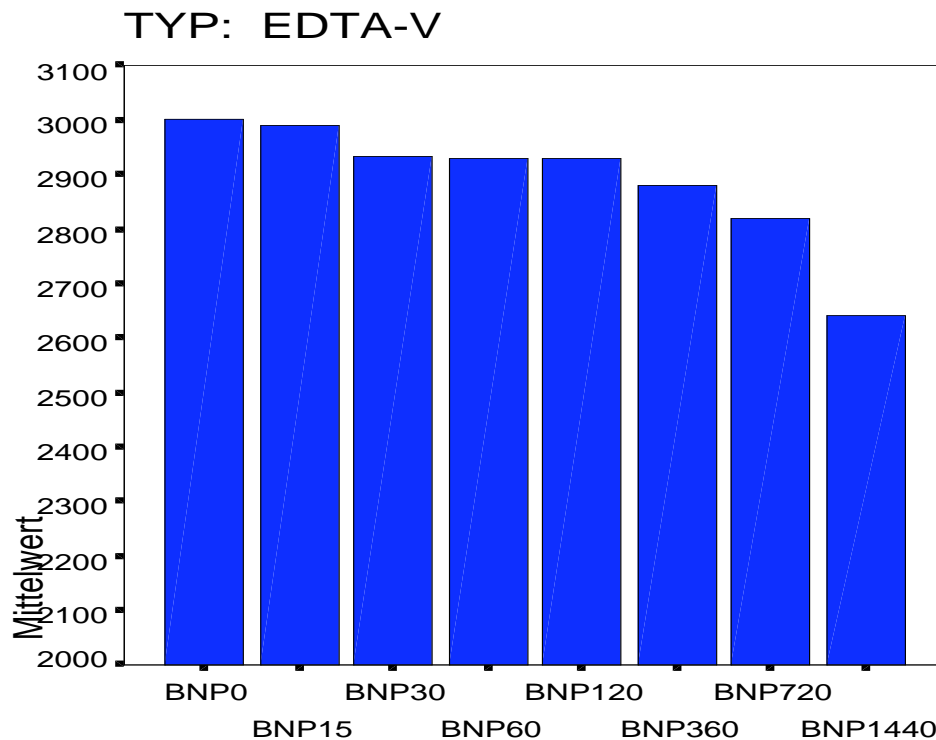


Abbildung 34: BNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-Vollblut

In EDTA-Trasylool beobachtet man gleichfalls einen größeren Abfall von BNP um durchschnittlich 11,8% (von anfangs durchschnittlich 2798,03 pg/ml auf durchschnittlich 2468,98 pg/ml nach 24 Stunden). n=14

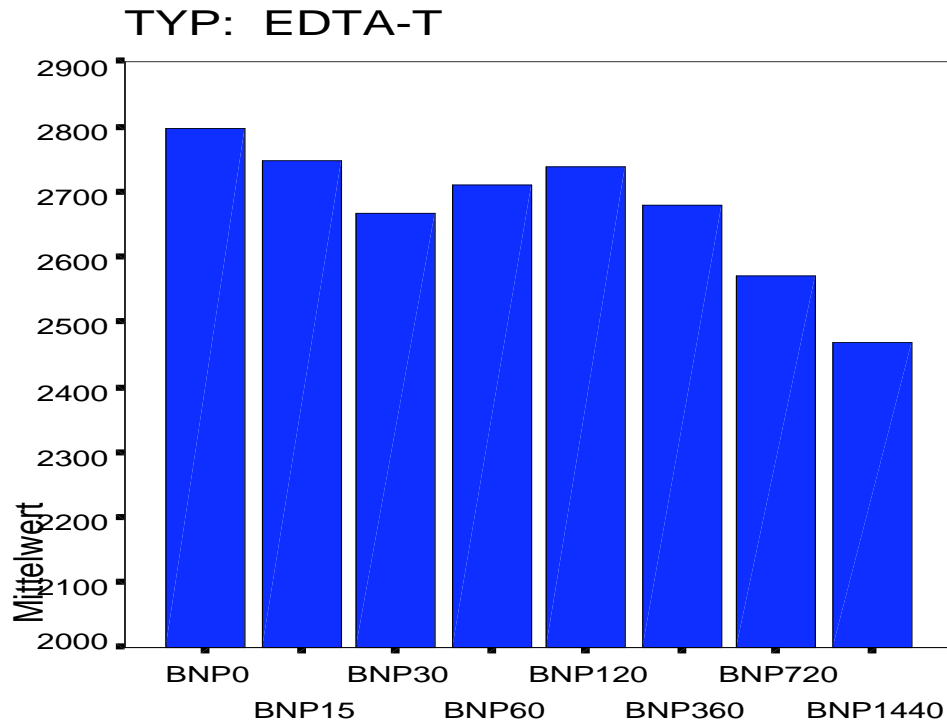


Abbildung 35: BNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-Trasylool

In EDTA-Vollblut liegt der Anstieg von NTproBNP bei durchschnittlich 19,6% (von anfangs durchschnittlich 64161,09 pg/ml auf durchschnittlich 76742,55 pg/ml nach 24 Stunden). Dieser ergibt sich vor allem durch den sehr hohen Anstieg bei der letzten Messung (fraglicher Kalibrierungsfehler). Vergleicht man die 0 min.-Messung mit der vorletzten (720 min.-Messung: durchschnittlich 67945,73 pg/ml), sieht man einen geringeren NTproBNP-Anstieg von durchschnittlich 5,9%. n=14

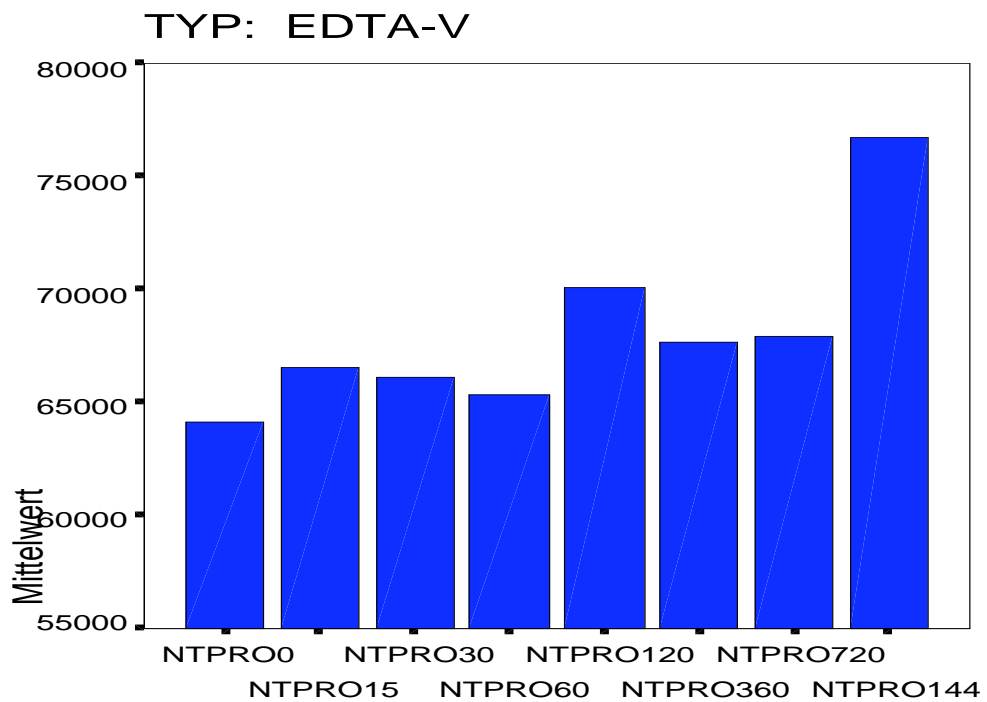


Abbildung 36: NTproBNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-Vollblut

NTproBNP aus Proben von Dialysepatienten steigt in EDTA-TrasyloI noch stärker an: um durchschnittlich 27,9% (von anfangs durchschnittlich 57060,27 pg/ml auf durchschnittlich 72974,09 pg/ml nach 24 Stunden). Auch hier ist die letzte Messung dafür ausschlaggebend (fraglicher Kalibrierungsfehler). Zwischen der 0 min.- und der 720 min. Messung steigt NTproBNP dementsprechend nur um 10%. n=14

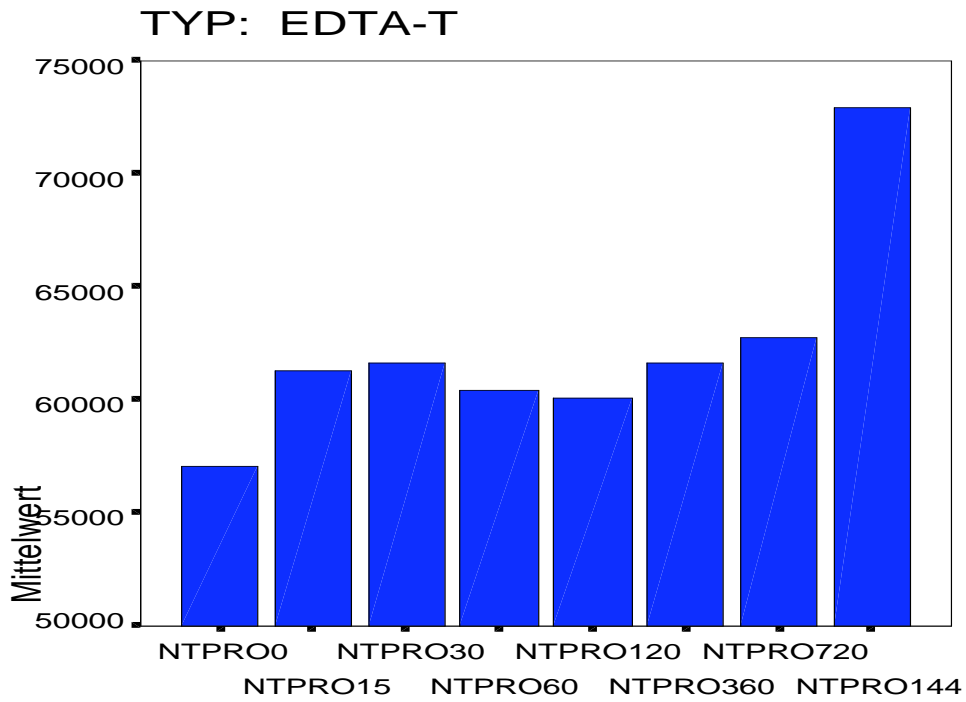


Abbildung 37: NTproBNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-TrasyloI

5 DISKUSSION

Wegen ihrer großen Bedeutung bei der Diagnostik der symptomatischen Herzinsuffizienz wird von verschiedenen Autoren empfohlen, BNP- und NTproBNP-Messungen in die Routinediagnostik aufzunehmen [40 - 42, 45, 65]. Dies erfordert genauere Kenntnisse über die In-vitro-Stabilität von BNP und NTproBNP, da zwischen Blutentnahme und Blutuntersuchung im Labor unterschiedlich viel Zeit vergehen kann. Im stationären Bereich werden vom Zeitpunkt der Probenentnahme bis zur Verarbeitung im Labor Stunden, im ambulanten Bereich zum Teil Tage benötigt. Außerdem wird das zu untersuchende Material selten kühl gelagert, was ebenfalls zu Stabilitätsunterschieden führen kann. Damit wird die Relevanz von eventuell einsetzbaren Stabilisatoren für BNP und NTproBNP hervorgehoben. Bisher wird in der Literatur nur über die Langzeitstabilität der Peptide berichtet, das heißt ab einer Stunde bis zu mehreren Tagen nach Blutentnahme. Diese wurde mit und ohne Zugabe von Aprotinin als Stabilisator überprüft [10, 17, 54, 62].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit, welche Blutentnahmesysteme beziehungsweise –gefäße und welche Lagerungstemperatur für die routinemäßige BNP- oder NTproBNP-Bestimmung am sinnvollsten sind, um die untersuchten Werte stabil zu halten. Außerdem wird die Wirkung eines möglichen Stabilisators geprüft.

5.1 Stabilitätsmessungen: BNP

Zur Stabilität des B-Typ natriuretischen Peptids und des N-terminalen proBNPs nach Blutentnahme in vitro gibt es bereits eine Reihe von Arbeiten. H. Shimizu et al. fand im Jahre 2001 heraus, dass BNP in PET-Röhrchen stabiler ist als in Glasröhrchen. Dies wird auf die höhere Enzymaktivität in letzteren zurückgeführt. Proteasen werden durch die Glasoberfläche aktiviert. So kann in Vollblutproben, die in Glasröhrchen aufbewahrt werden, bereits nach sechs Stunden über 50% weniger BNP-Konzentration nachgewiesen werden. In PET-Röhrchen sind dagegen nach 72 Stunden noch circa 60% der anfänglichen BNP-Konzentration dokumentierbar [55]. Auch die vorliegende Arbeit zeigt einen Abfall der BNP-Konzentration um durchschnittlich 67,8% innerhalb von 24 Stunden in Vacutainern aus Glas. Aber auch in Serum- und Heparin-Plasma-Monovetten zeigte sich ein starker Konzentrationsabfall. Der Abbauprozess von BNP scheint also auch durch andere Faktoren beschleunigt zu werden. Dabei könnte es sich um das längere Zentrifugieren handeln, dem die Serum- und Plasmaproben ausgesetzt waren. Auch die Verwendung eines Ventil-Filters zur Separation der Zellbestandteile vom Plasma könnte durch seine Oberfläche und damit verbundene Enzymaktivierung den Peptidabbau vorantreiben.

In verschiedenen anderen Tests wurde jeweils mit Plastikmonovetten gearbeitet. Sie ergaben, dass BNP bei Raumtemperatur nach 24 Stunden in EDTA-Vollblut noch zu ungefähr 93% messbar ist [54, 68]. Nach Lagerung bei 4°C lassen sich nach 24 Stunden noch über 95% des ursprünglichen BNP-Wertes messen. In EDTA-Plasma ist BNP nach der gleichen Zeit und bei Raumtemperatur noch zu circa 90% nachweisbar. Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls einen geringen Konzentrationsverlust im EDTA-Vollblut von 1,9% bei Raumtemperatur, sowie von 14,3% bei 4°C gekühlt. Im EDTA-Plasma wurde ein BNP-Abfall von 14,1% bei Raumtemperatur und von 11,1% bei 4°C nachgewiesen. Anzumerken ist, dass für die Untersuchungen von H. Shimizu und seinen Mitarbeitern synthetisch hergestelltes BNP (ca. 200 ng/l) verwendet wurde [16, 55]. Dies könnte einen negativen Effekt auf die Stabilität haben, da beispielsweise T. Tsuji et al. schon beim Zeitpunkt 0 nur noch 25% des zugesetzten BNP nachweisen konnten. In seinem Labor wurde ebenfalls mit synthetischem BNP gearbeitet, das man EDTA-Vollblut hinzufügte [62]. Da für diese Arbeit ausschließlich Probandenblut ohne künstliche Peptidzusätze verwendet wurde, sind die Ergebnisse für den routinemäßigen Gebrauch von größerer Bedeutung. Man muss bedenken, dass synthetisches BNP offensichtlich in einer anderen Geschwindigkeit abgebaut wird, als natürliches BNP.

Es gibt auch einige Angaben zu Stabilitätsmessungen von BNP in verschiedenen anderen Blutentnahmesystemen. Die Arbeitsgruppe von H. B. Wu fand heraus, dass BNP in Zitrat-Plasma nach 48 Stunden noch zu 60% messbar ist. Nach der gleichen Zeit lassen sich in Heparin-Plasma noch 30% und in Serum noch 48% des Ausgangswertes bestimmen [68]. In unseren Messungen zeigt sich nach 24 Stunden in Heparin-Plasma bei Raumtemperatur eine BNP-Konzentration, die 51% des Ausgangswertes entspricht, und bei 4°C eine BNP-Konzentration, die 61,1% des Ausgangswertes entspricht. In unseren Serumproben ist der höchste Konzentrationsabfall von BNP zu messen: in 24 Stunden um durchschnittlich 84,6% bei Raumtemperatur. Wie zuvor bereits angedeutet, ist zu überlegen, ob durch das längere Zentrifugieren und die Verwendung von Ventil-Filtern der Abbau oder sogar Zerfall der Peptide initiiert wird.

Einige Autoren berichten auch über die Zugabe von Aprotinin, einem polyvalenten Proteinaseinhibitor, wodurch die Peptidstabilität erhöht werden soll. T. Tsuji und H. Shimizu et al. liefern widersprüchliche Ergebnisse über die Zugabe von 500 kKIU/l in EDTA-Vollblut. Tsuji et al. berichten von nur noch 10% des bei Raumtemperatur gelagerten und 30% des bei 4°C gelagerten Ausgangs-BNP nach 24 Stunden [62]. Shimizu fand bei Raumtemperatur nach 24 Stunden noch über 95% des Ausgangswertes [54].

Andere Arbeiten berichten von der Aprotinin-Wirkung auf BNP in EDTA-Plasma, haben aber mit verschiedenen Methoden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. T. Tsuji et al. fanden mit einem IRMA (= immunoradiometric assay), dass BNP stabil ist, wenn die Proben bei -20°C oder tiefer gefroren aufbewahrt werden [62]. M. G. Buckley et al. entdeckten mittels eines RIA nach 48 Stunden bei Raumtemperatur noch 86% des Initial-BNP [10]. Und A. Belenky et al. zeigten, dass nach 6 Tagen bei 4°C noch 20% BNP nachweisbar waren [5]. Auch wir untersuchten BNP-Konzentrationen in EDTA-Vollblut-Proben mit Aprotinin (Trasylo). Nach 24 Stunden

können bei Raumtemperatur noch 96,4% des Ausgangswertes und bei 4°C noch 92,9% des Ausgangswertes nachgewiesen werden. Dies bedeutet eine Stabilisierung der Peptidkonzentration vor allem der bei 4°C gekühlten Proben. Der Prozess, der in den gekühlten Vollblut-Proben zum Konzentrationsabfall führt, wird durch Aprotinin verlangsamt. Nach unseren Messungen zeigt sich durch den Zusatz des Proteinaseinhibitors ein Abfall um 7,1% statt 14,3%. Bei Raumtemperatur scheint Aprotinin keinen stabilisierenden Effekt auf BNP in Vollblut-Proben zu haben. Mit Proteinaseinhibitor beträgt der Abfall 3,6% statt 1,9%. Dies könnte allerdings daran liegen, dass für den Volumeneffekt, den die Zugabe von 450 µl Aprotinin ausmacht, keine Korrektur vorgenommen wurde. Bei einer 9 ml fassenden Monovette wären dies immerhin 5%. Nichts desto trotz sind BNP-Messungen in EDTA-Vollblut weitgehend stabil und daher für die Routinediagnostik geeignet.

Einheitliche Untersuchungsergebnisse zur Stabilität des natriuretischen Peptids Typ-B liegen also noch nicht vor. Auch gibt es außer der vorliegenden Arbeit noch keine Aufzeichnungen, die die Stabilität von BNP während der ersten Stunde nach Blutentnahme untersuchen. Lediglich zum Zeitpunkt Null und dann 60 Minuten nach Abnahme des Blutes wurden Messung von anderen Autoren durchgeführt.

5.2 Stabilitätsmessungen: NTproBNP

Über die Stabilität von NTproBNP gibt es deutlich weniger Arbeiten als über die von BNP. M. J. Evans et al. legten folgende Ergebnisse vor: bei Raumtemperatur war NTproBNP in EDTA-Vollblut fünf Stunden, in EDTA-Plasma sieben Stunden, in Heparin-Vollblut vier Stunden und in Heparin-Plasma acht Stunden stabil [19]. Unsere Resultate zeigen Ähnliches nach 24 Stunden bei Raumtemperatur: die NTproBNP-Konzentrationen in EDTA-Vollblut stiegen um 3,6%, in EDTA-Plasma fielen sie um 5,1% und in Heparin-Plasma stiegen sie um 0,7%. Bei 4°C aufbewahrt ergaben sich folgende Messungen: ein Anstieg in K-EDTA-Vollblut um 4,2%, in K-EDTA-Plasma um 2,9% und in K-Heparin-Plasma um 4,4%. Dies könnte darin begründet liegen, dass im Blut auch proBNP vorliegt, welches in NTproBNP und BNP gespalten wird. Warum dann aber nur die Konzentrationen von NTproBNP und nicht die von BNP im Verlauf ansteigen, wäre noch zu klären. Bemerkenswert ist dabei auch, dass es bei 4°C zu einem größeren Anstieg von NTproBNP kommt als bei Raumtemperatur. Bisher ist nur die Sekretion von BNP und NTproBNP aus Myozyten bekannt. Eine mögliche Bildung der Peptide in zirkulierenden Blutzellen wäre noch zu untersuchen. In unseren Ergebnissen zeigen sich zudem höhere Anstiege von NTproBNP-Konzentrationen in den Proben von Dialyse- und intensivpflichtigen Patienten. Durch den vermehrten Stress, dem die Kreisläufe solcher Patienten ausgesetzt sind, wird eine mögliche proBNP-Konversion scheinbar beschleunigt oder zumindest verstärkt. Hierbei könnten bestimmte Stresshormone oder Akute Phase Proteine eine Rolle spielen. Die Tatsache, dass NTproBNP bei Raumtemperatur in den Plasmaproben nicht oder nur geringfügig ansteigt, könnte bedeuten, dass eine Konversion oder Sekretion der

Peptide durch das Zentrifugieren der Proben verhindert oder verlangsamt wird. Der zu Grunde liegende Prozess scheint außerdem temperaturabhängig zu sein.

Unsere zusätzlichen Messungen ergaben einen Anstieg um 1,8% in EDTA-Trasylol sowie um 0,5% im Vacutainer aus Glas. Es wäre zu diskutieren, ob durch den Proteinaseinhibitor die NTproBNP-Konzentration an sich stabiler gehalten wird, oder die Konversion von proBNP in NTproBNP und BNP gedrosselt wird. Wenn man von einer tatsächlichen Konversion von proBNP in die beiden untersuchten Peptide ausgeht, scheinen die im Vacutainer aktivierten Enzyme vermehrt BNP abzubauen. Aber auch NTproBNP wird durch sie zersetzt, wodurch der nur geringe Anstieg der NTproBNP-Konzentration in den Glasgefäßen erklärt würde.

Die Forschungsgruppe um A. Dasgupta bewahrte Serumproben in den ersten fünf Stunden bei Raumtemperatur und danach bei 4°C auf, wodurch NTproBNP gemessen mit dem Elecsys 2010 von Roche für 48 Stunden stabil blieb [17]. Wir konnten nach 24 Stunden in Serum bei Raumtemperatur aufbewahrt einen Konzentrationsanstieg von 3,2% nachweisen. Dies würde wieder gegen die Theorie sprechen, dass das Zentrifugieren einen Anstieg der Peptidkonzentrationen verhindert. Allerdings wäre zu überlegen, ob der Anstieg in den Serumproben damit zusammen hängt, dass diese vor dem Bearbeiten in der Zentrifuge 15 Minuten ruhen. In dieser Zeit könnte es zu einer Konversion oder Sekretion von NTproBNP kommen.

Auch Van der Merwe et al. beschrieben, welche Bedeutung der Zeitpunkt des Zentrifugierens für die Untersuchung von NTproBNP in Blutproben hat. Geschieht dies erst kurz vor den Messungen, wird für NTproBNP in Heparin-Plasma und Serum ein Verlust von 4,4% nach 24 Stunden und von 6,9% nach 48 Stunden ermittelt. Zentrifugiert man hingegen das Untersuchungsmaterial sofort nach Blutentnahme beziehungsweise bei Serum 15 Minuten danach, dann liegt der Verlust nur bei 0,2% nach 24 Stunden und bei 0,8% nach 48 Stunden [63]. Es scheinen also bestimmte Prozesse inhibiert beziehungsweise initialisiert zu werden.

Ein Konzentrationsanstieg, der durch Verdunstung von Probenmaterial bedingt wäre, ist auszuschließen, da die Probengefäße stets verschlossen waren. Sie wurden lediglich zur Entnahme von Untersuchungsmaterial kurzzeitig geöffnet.

Die spärlichen Angaben zur Kurzzeitstabilität von NTproBNP machen eine Überprüfung der Ergebnisse bei Raumtemperatur und bei 4°C erforderlich. Allerdings sind in der Literatur auch beim N-terminalen BNP keine Messungen in den ersten 60 Minuten nach der Probenentnahme beschrieben, wodurch auch hier noch Klärungsbedarf besteht.

In den zitierten Arbeiten wurde über keinen Stabilisator für NTproBNP berichtet.

5.3 Diagnostische Relevanz

Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass BNP und NTproBNP gute Marker bei der Diagnostik einer Herzinsuffizienz beziehungsweise kardialer Dysfunktion im Erwachsenen- und Kindesalter sind. Durch die ventrikuläre Hypertrophie, die erhöhte Dehnung der insuffizienten Myozyten und das stimulierte Renin-Angiotensin-System, dem sie entgegen wirken, werden die Peptide vermehrt ausgeschüttet [14, 38, 41, 46, 58, 66]. Bei Dyspnoe-Symptomatik gestatten sie eine Differenzierung zwischen pulmonaler und kardialer Genese. Denn der BNP-Spiegel bei dekompensierter Herzinsuffizienz übersteigt den bei pulmonalen Erkrankungen wie beispielsweise Lungenembolie, Bronchialkarzinom oder Tuberkulose bei weitem [34, 40, 51, 65]. Karpaliotis et al. zeigten in ihrer Arbeit 2007, dass bei akuter Dyspnoe eine BNP-Konzentration ≤ 200 pg/ml mit einer Spezifität von 91% für eine akute Atemwegserkrankung spricht. Bei einem Wert ≥ 1200 pg/ml hingegen ergab sich bei bestehender Dyspnoe eine 92%ige Spezifität, wenn die Diagnose kardial bedingtes Lungenödem lautete [30]. Außerdem gibt die Höhe der gemessenen Werte Auskunft über die Schwere einer Herzinsuffizienz [7, 24, 44]. Der Zusammenhang zwischen eingeschränkter beziehungsweise pathologischer linksventrikulärer Pumpfunktion und signifikant erhöhten NTproBNP- und BNP-Werten im Vergleich zu Patienten mit normwertigen hämodynamischen Parametern wurde in der Literatur schon verschiedentlich hervorgehoben [49].

Es zeichnen sich vor allem die hohe Sensitivität und der noch höhere negative prädiktive Wert von BNP bei der Beurteilung einer Funktionsstörung der Herzkammer aus. Neben anderen haben P. A. McCullough et al. für die Diagnose Herzinsuffizienz für Erwachsene einen BNP-Grenzwert von 100 pg/ml festgesetzt, womit eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 76% erreicht werden. Legt man den Grenzwert auf 50 pg/ml, erhält man einen negativen prädiktiven Wert von 96%. Das heißt, dass bei niedrigerer BNP-Konzentration eine akut dekompensierte Herzinsuffizienz mit 96%-iger Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 6: Zusammenhang von cut-off- und prädiktiven Werten [39]

BNP (pg/ml)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	positiv	negativ
			prädiktiver Wert (%)	prädiktiver Wert (%)
50	97	62	71	96
100	90	76	79	89
150	85	83	83	85

BNP-Werte über 500 pg/ml sind für die Diagnose einer Herzinsuffizienz nahezu beweisend. McCullough et al. zufolge kann eine derart hohe Konzentration den kardiovaskulär bedingten Tod voraussagen [41]. Die Vergleichskontrollen erfolgten mittels Dopplersonographie beziehungsweise Echokardiographie. Beide Methoden erwiesen sich der Messung der natriuretischen Peptide Typ-B und NTproBNP zur Ermittlung einer Herzinsuffizienz als

unterlegen [2]. Durch den Einsatz der BNP- und NTproBNP-Bestimmung in der Diagnostik von Dyspnoepatienten könnten damit in der Praxis reduzierte Behandlungszeiten und -kosten erreicht werden [39, 42, 45, 49, 50, 68].

BNP und NTproBNP korrelieren gut mit der NYHA-Klassifizierung der Herzfunktion (= New York Heart Association). Das Patientenkontingent der NYHA-Klasse I, die noch sowohl in Ruhe als auch unter Belastung beschwerdefrei sind, hat die geringsten Plasmakonzentrationen sowohl an BNP von durchschnittlich 83,1 pg/ml als auch an NTproBNP von 342 +/- 145 pg/ml. Patienten in der NYHA-Klasse IV, die bereits in Ruhe Beschwerden haben, weisen auch die höchsten BNP und NTproBNP-Werte auf. Diese liegen im Mittel um 1119 pg/ml bzw. um 1707 +/- 753 pg/ml. Die Korrelation zur NYHA-Klassifikation ist bei der NTproBNP-Messung besser als bei der von BNP. Berücksichtigt werden muss, dass die beiden Parameter altersabhängig zu interpretieren sind [41, 49, 53, 67].

Bei der Interpretation von Messwerten darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bei Patienten mit Dyspnoe das Plasma-BNP auch durch andere Faktoren erhöht sein kann, wie zum Beispiel eine eingeschränkte Nierenfunktion, einen Myokardinfarkt, eine Lungenerkrankung mit rechtsseitiger Belastung, eine akute Lungenembolie oder eine Sepsis [41]. Keinen relevanten Einfluss hat dagegen körperliche Anstrengung [43]. Erhöhte BNP-Werte sollten daher nie alleine, sondern immer unter Berücksichtigung der Symptomatik und der klinischen Befunde beurteilt werden. Hierdurch lässt sich die diagnostische Sicherheit steigern.

5.4 Therapeutische Relevanz

In akuten Situationen kann durch die Bestimmung der natriuretischen Peptide ein schnellerer und gezielterer Therapiebeginn erreicht werden. Durch die im Vergleich zu NTproBNP kürzere Halbwertszeit kann mit der BNP-Messung eine kurzfristige Änderung der Herzfunktion besser erkannt werden [20]. Auch eine Therapiesteuerung ist durch BNP-Spiegel-Messungen möglich [40, 50]. Der Erfolg einer Langzeittherapie lässt sich anhand der natriuretischen Peptide kontrollieren. Bei einer β -Blocker-Gabe ist zum Beispiel schon nach sechs Monaten eine signifikante BNP-Reduktion erkennbar, wodurch ein Ansprechen des Medikaments bestätigt wird [31]. Das Gleiche gilt für die Anwendung von ACE-Hemmern, Angiotensin II-Rezeptorblockern, Diuretika und Nitraten, welche BNP proportional zur verbesserten Hämodynamik senken können [8, 14]. R. W. Troughton et al. demonstrierten, dass durch eine NTproBNP-kontrollierte Therapie Patienten mit Herzinsuffizienz zweckmäßiger behandelt werden konnten, als durch die Behandlung gemäß dem bisherigen Standard [61].

Die Bedeutung der Messung von BNP und NTproBNP während einer Therapie zur Verbesserung der Herzleistung ist mittlerweile allgemein anerkannt. Auch die Krankheitsprognose lässt sich besser beurteilen, da für Patienten mit höheren BNP-Werten ein

höheres Risiko für Rehospitalisierung und eine erhöhte Mortalitätsrate nachgewiesen wurden [6 - 8]. Niedrige Messwerte der natriuretischen Peptide vor dem Entlassungstermin aus dem Krankenhaus versprechen dagegen einen günstigeren Verlauf.

5.5 Relevanz der in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse

BNP ist dank eines negativen prädiktiven Werts von 96% ein hervorragender diagnostischer Parameter für die Diagnose der Herzinsuffizienz [39]. Auch zur Therapiekontrolle eignet er sich besonders gut. Für NTproBNP gelten ähnliche Vorteile. Allein die längere Halbwertszeit macht es für die Routine interessanter.

Die vorliegende Arbeit referiert über die Messergebnisse der Halbwertszeit von BNP und NTproBNP über 24 Stunden in EDTA-Vollblut, EDTA-Vollblut mit Trasytol, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma, Serum sowie in einem Vacutainer aus Glas bei Raumtemperatur und bei 4°C aufbewahrt.

Die Stabilität der natriuretischen Peptide hängt vom verwendeten Blutentnahmegefäß bzw. -system ab. Am stabilsten zeigte sich BNP in EDTA-Plasma, EDTA-Vollblut, und EDTA-Vollblut mit Trasytol sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C aufbewahrt. In diesen Gefäßen betrug der Konzentrationsabfall durchschnittlich weniger als 30%. In EDTA-Vollblut, EDTA-Trasytol und gekühlt aufbewahrtem EDTA-Trasytol lag er im Mittel sogar unter 10%.

Noch unter 50%, aber für die Routinediagnostik damit schon nicht mehr tragbar, lag der durchschnittliche Konzentrationsabfall in Heparin-Plasma und gekühlt aufbewahrtem Heparin-Plasma. Nach unseren Erkenntnissen nicht verwendet werden sollten Serum-Röhrchen und Vacutainer aus Glas. In ihnen fiel die BNP-Konzentration zwischen 65 und 85% ab.

Bei den Intensiv- und Dialysepatienten fiel ein prozentual etwas höherer Konzentrationsverlust nach 24 Stunden auf, der sich in EDTA-Vollblut und EDTA-Trasytol sehr ähnlich verhielt. Er blieb durchschnittlich allerdings unter 15%.

Die NTproBNP-Konzentrationen waren insgesamt stabiler. Lediglich in EDTA-Plasma zeigte sich ein leichter mittlerer Abfall von unter 6%. In den übrigen Entnahmesystemen stiegen die Konzentrationen leicht an, aber durchschnittlich nie über 5,5%.

In Blutproben von Intensiv- und Dialysepatienten waren die NTproBNP-Konzentrationen größeren Schwankungen unterworfen. Sie stiegen im Mittel bis zu 20% in EDTA-Vollblut und bis zu 30% in EDTA-Trasytol an.

Die Lagerungstemperatur hat nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität. Nur in K-EDTA-Plasma und K-Heparin-Plasma waren sowohl die BNP- als auch die NTproBNP-Konzentrationen bei 4°C gekühlt etwas stabiler als bei Raumtemperatur aufbewahrt. In den

anderen Entnahmesystemen war es umgekehrt. Aus Gründen der Praktikabilität ist daher eine Kühlung der zu untersuchenden Proben nicht zu empfehlen.

Zur Bestimmung der beiden Parameter sollten in jedem Fall PET-Röhrchen verwendet werden, da in den Vacutainern aus Glas die Stabilität nachweislich geringer ist.

Durch die Beimengung von Trasylol zu EDTA-Vollblut wird in den ungekühlten Entnahmegefäßen keine bessere Stabilität von BNP erreicht. Im Gegenteil, in EDTA-Vollblut bei Raumtemperatur ist BNP sogar stabiler als in EDTA-Trasylol. Werden die Proben bei 4°C gekühlt aufbewahrt, scheint jedoch der Zusatz von Trasylol BNP etwas zu stabilisieren, denn der Konzentrationsabfall ist in K-EDTA-Vollblut im Mittel etwa doppelt so hoch wie in K-EDTA-Trasylol (7,1% gegen 14,3%). Auch bei den Intensiv- und Dialysepatienten fällt die BNP-Konzentration in EDTA-Trasylol etwas geringer ab als in EDTA-Vollblut. Die NTproBNP-Konzentrationen werden in den bei Raumtemperatur gelagerten Proben durch Trasylol leicht stabilisiert (Anstieg nach 24 Stunden um 3,6% in EDTA-Vollblut gegen 1,8% in EDTA-Trasylol). Umgekehrt verhält es sich bei den gekühlten Proben: in K-EDTA-Trasylol steigen die NTproBNP-Werte geringfügig mehr an als in EDTA-Vollblut. Die NTproBNP-Konzentrationen der Intensiv- und Dialysepatienten steigen durch die Zugabe von Trasylol durchschnittlich um fast 10% mehr an als in EDTA-Vollblut.

Für die Sicherung der Qualität im Labor ist also zu schlussfolgern, dass zur BNP-Bestimmung EDTA-Röhrchen verwendet werden sollten. In diesen fallen bei Aufbewahrung über 24 Stunden die Konzentrationen der natriuretischen Peptide nur geringfügig ab. Eine Kühlung auf 4°C oder die Zugabe von Trasylol ist dabei nicht notwendig. Die NTproBNP-Konzentrationen dagegen zeigten sich in allen untersuchten Blutentnahmesystemen als sehr stabil.

6 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: BNP- und NTproBNP-Konzentrationen bei akuter Dyspnoe

Tabelle 2: Referenzgruppe Männer

Tabelle 3: Referenzgruppe Frauen

Tabelle 4: NTproBNP-Klassifizierung

Tabelle 5: EDTA-TrasyloI (bei Raumtemperatur und bei 4°C), Messergebnis und Korrektur

Tabelle 6: Zusammenhang von cut-off- und prädiktiven Werten

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur der natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP [16, 38, 39]	2
Abbildung 2: Synthese von BNP und NTproBNP (schematisch) [40, 38, 39, 41]	3
Abbildung 3: Natriuretische-Peptid-Rezeptoren A und B [38, 43, 56]	4
Abbildung 4: Natriuretischer-Peptid-Rezeptor C [38]	5
Abbildung 5: RIA	10
Abbildung 6: BNP bei Männern und Frauen verschiedener Altersgruppen [14]	13
Abbildung 7: ADVIA Centaur Messprinzip	19
Abbildung 8: Funktionsweise des ADVIA Centaur	20
Abbildung 9: Elecsys 2010 Messprinzip	22
Abbildung 10: Funktionsweise des Elecsys 2010	23
Abbildung 11: BNP-Messung bei Patient mit Herzinsuffizienz	26
Abbildung 12: BNP-Messung bei Patient ohne kardiale Symptomatik	27
Abbildung 13: BNP-Messung bei einem Gesunden	27
Abbildung 14: BNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (Raumtemperatur)	29
Abbildung 15: BNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (4°C)	28
Abbildung 16: BNP-Ergebnis EDTA-Trasytol (Raumtemperatur)	29
Abbildung 17: BNP-Ergebnis K-EDTA-Trasytol (4°C)	30
Abbildung 18: BNP-Ergebnis EDTA-Plasma (Raumtemperatur)	31
Abbildung 19: BNP-Ergebnis EDTA-Plasma (4°C)	31
Abbildung 20: BNP-Ergebnis Heparin-Plasma (Raumtemperatur)	32
Abbildung 21: BNP-Ergebnis Heparin-Plasma (4°C)	32
Abbildung 22: BNP-Ergebnis Serum (Raumtemperatur)	35
Abbildung 23: BNP-Ergebnis Serum (4°C)	35
Abbildung 24: BNP-Ergebnisse aller Monovetten (Raumtemperatur und 4°C)	36
Abbildung 25: NTproBNP-Messung bei Patient mit Herzinsuffizienz	35
Abbildung 26: NTproBNP-Messung bei Patient ohne kardiale Symptomatik	36
Abbildung 27: NTproBNP-Messung bei einem Gesunden	36
Abbildung 28: NTproBNP-Ergebnis Vacutainer-Vollblut	37
Abbildung 29: NTproBNP-Ergebnis Heparin-Plasma (Raumtemperatur)	38
Abbildung 30: NTproBNP-Ergebnis Heparin-Plasma (4°C)	38
Abbildung 31: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Trasytol (Raumtemperatur)	39
Abbildung 32: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Trasytol (4°C)	39
Abbildung 33: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Plasma (Raumtemperatur)	40
Abbildung 34: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Plasma (4°C)	40
Abbildung 35: NTproBNP-Ergebnis Serum	41
Abbildung 36: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (Raumtemperatur)	42
Abbildung 37: NTproBNP-Ergebnis EDTA-Vollblut (4°C)	42
Abbildung 38: BNP-Messung bei einem Intensivpatienten	43
Abbildung 39: BNP-Messung bei einem Dialysepatienten	43

[Abbildung 40: NTproBNP-Messung bei einem Intensivpatienten](#).....44

[Abbildung 41: NTproBNP-Messung bei einem Dialysepatienten](#)44

[Abbildung 42: BNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-Vollblut](#)45

[Abbildung 43: BNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-Trasylo](#)46

[Abbildung 44: NTproBNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-Vollblut](#)47

[Abbildung 45: NTproBNP-Ergebnis Intensiv- und Dialysepatienten EDTA-Trasylo](#)48

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer
AG	Antigen
AK	Antikörper
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bzw.	beziehungsweise
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EZV	extrazelluläres Volumen
GTP	Guanosintriphosphat
I.E.	Internationale Einheiten
IRMA	Immunoradiometric assay
K	Kalium bzw. Kalt (Probenbezeichnung)
kda	kilo Dalton
KIE	Kallikrein Inhibitor Einheiten
KIU	Kallikrein Inhibitor Units
KKIU	kilo Kallikrein Inhibitor Units
l	Liter
LV	linksventrikulär
min.	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
N	Anzahl
ng	Nanogramm
NPR	Natriuretischer Peptidrezeptor
NT	N-terminal
NYHA	New York Heart Association
PET	Polyethylenterephthalat
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
RIA	Radioimmunoassay
RLU	Relative Light Units
RNA	Riboxynukleinsäure
SPSS	Superior Performing Software Systems
TPA	Tripopylamin

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Akiba, T., et al., *Plasma human brain natriuretic peptide in chronic renal failure*. Clin Nephrol, 1995. **44 Suppl 1**: p. S61-4.
2. Alehagen, U., et al., *Utility of the amino-terminal fragment of pro-brain natriuretic peptide in plasma for the evaluation of cardiac dysfunction in elderly patients in primary health care*. Clin Chem, 2003. **49(8)**: p. 1337-46.
3. Alexander, K., et al., *Thiemes Innere Medizin: TIM*. Vol. 1. 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 376ff.
4. Baxter, G.F., *The natriuretic peptides*. Basic Res Cardiol, 2004. **99(2)**: p. 71-5.
5. Belenky, A., et al., *The effect of class-specific protease inhibitors on the stabilization of B-type natriuretic peptide in human plasma*. Clin Chim Acta, 2004. **340(1-2)**: p. 163-72.
6. Bettencourt, P., et al., *N-terminal-pro-brain natriuretic peptide predicts outcome after hospital discharge in heart failure patients*. Circulation, 2004. **110(15)**: p. 2168-74.
7. Bettencourt, P., *NT-proBNP and BNP: biomarkers for heart failure management*. Eur J Heart Fail, 2004. **6(3)**: p. 359-63.
8. Bettencourt, P., et al., *Prognostic information provided by serial measurements of brain natriuretic peptide in heart failure*. Int J Cardiol, 2004. **93(1)**: p. 45-8.
9. Buchner, S., G. Riegger, and L. Andreas, *[Clinical utility of the cardiac markers BNP and NT-proBNP]*. Acta Med Austriaca, 2004. **31(4)**: p. 144-51.
10. Buckley, M.G., et al., *Prolonged stability of brain natriuretic peptide: importance for non-invasive assessment of cardiac function in clinical practice*. Clin Sci (Lond), 1998. **95(3)**: p. 235-9.
11. Charles, C.J., et al., *Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep*. Am J Physiol, 1996. **271(2 Pt 2)**: p. R373-80.
12. Chen, H.H., et al., *Equimolar doses of atrial and brain natriuretic peptides and urodilatin have differential renal actions in overt experimental heart failure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288(5)**: p. R1093-7.
13. Chung, T., et al., *Influence of history of heart failure on diagnostic performance and utility of b-type natriuretic peptide testing for acute dyspnea in the emergency department*. Am Heart J, 2006 Nov; **152(5)**: p. 949-55.
14. Clerico, A. and M. Emdin, *Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review*. Clin Chem, 2004. **50(1)**: p. 33-50.
15. Cosin Aguilar, J., et al., *[Value of NTproBNP concentration in an out-of-hospital adult population]*. Rev Esp Cardiol, 2003. **56(3)**: p. 236-44.
16. Czap, M. and H. Butz, *BNP by Bayer*, Bayer Health Care.
17. Dasgupta, A., et al., *Stability of NT-proBNP in serum specimens collected in Becton Dickinson Vacutainer (SST) tubes*. Clin Chem, 2003. **49(6 Pt 1)**: p. 958-60.

18. D'Souza, S.P., M. Davis, and G.F. Baxter, *Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart*. *Pharmacol Ther*, 2004. **101**(2): p. 113-29.
19. Evans, M.J., et al., *Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones*. *Clin Biochem*, 2001. **34**(2): p. 107-12.
20. Gegenhuber, A., et al., *Time course of B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP changes in patients with decompensated heart failure*. *Clin Chem*, 2004. **50**(2): p. 454-6.
21. Greten, H. and G. Schettler, *Innere Medizin*. 11. ed. 2002, Stuttgart: Thieme. 95.
22. Gruyter, d., *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch*. 258. ed. 1998, Berlin: Walter de Gruyter.
23. Herman, J.P., et al., *Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain*. *J Comp Neurol*, 1996. **369**(2): p. 165-87.
24. Hervas, I., et al., *Radioimmunoassay of natriuretic peptide type-B (BNP) in heart failure*. *Nucl Med Commun*, 2003. **24**(1): p. 61-9.
25. Hunt, P.J., et al., *Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(11): p. 3871-6.
26. Isselbacher, K., et al., *Harrisons Innere Medizin*. 13. (Dt. Ausgabe), ed. K.J.G. Schmailzl. Vol. 1. 1995, Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH. 1181-1184.
27. Itoh, H., R.E. Pratt, and V.J. Dzau, *Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(5): p. 1690-7.
28. Itoh, H., et al., *Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells*. *Hypertension*, 1992. **19**(6 Pt 2): p. 758-61
29. Jensen, K.T., J. Carstens, and E.B. Pedersen, *Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 2): p. F63-72.
30. Karpaliotis, D., et al., *Diagnostic and prognostic utility of brain natriuretic Peptide in subjects admitted to the ICU with hypoxic respiratory failure due to noncardiogenic and cardiogenic pulmonary edema*. *Chest*. 2007 Apr; **131**(4):964-71.
31. Kawai, K., et al., *Plasma brain natriuretic peptide as a novel therapeutic indicator in idiopathic dilated cardiomyopathy during beta-blocker therapy: a potential of hormone-guided treatment*. *Am Heart J*, 2001. **141**(6): p. 925-32.
32. Koch, A. and H. Singer, *Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents*. *Heart*, 2003. **89**(8): p. 875-8.
33. Kotaska, K., et al., *The relevance of brain natriuretic peptides investigation in various cardiovascular diseases*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006, **150**(2): p. 285-288.
34. Koulouri, S., et al., *Utility of B-type natriuretic peptide in differentiating congestive heart failure from lung disease in pediatric patients with respiratory distress*. *Pediatr Cardiol*, 2004. **25**(4): p. 341-6.
35. Kunii, Y., et al., *Plasma brain natriuretic peptide and the evaluation of volume overload in infants and children with congenital heart disease*. *Acta Med Okayama*, 2003. **57**(4): p. 191-7.

36. Langub, M.C., Jr., R.E. Watson, Jr., and J.P. Herman, *Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain*. J Comp Neurol, 1995. **356**(2): p. 183-99.
37. Levin, E.R. and H.J. Frank, *Natriuretic peptides inhibit rat astroglial proliferation: mediation by C receptor*. Am J Physiol, 1991. **261**(2 Pt 2): p. R453-7.
38. Levin, E.R., D.G. Gardner, and W.K. Samson, *Natriuretic peptides*. N Engl J Med, 1998. **339**(5): p. 321-8.
39. Luchner, A., et al., *Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NTproBNP für die Klinik*. Dtsch Arztebl, 2003. **100**(50): p. 3314-3321.
40. Maisel, A.S. and P.A. McCullough, *Cardiac natriuretic peptides: a proteomic window to cardiac function and clinical management*. Rev Cardiovasc Med, 2003. **4 Suppl 4**: p. S3-12.
41. McCullough, P.A., T. Omland, and A.S. Maisel, *B-type natriuretic peptides: a diagnostic breakthrough for clinicians*. Rev Cardiovasc Med, 2003. **4**(2): p. 72-80.
42. McCullough, P.A. and K.R. Sandberg, *Sorting out the evidence on natriuretic peptides*. Rev Cardiovasc Med, 2003. **4 Suppl 4**: p. S13-9.
43. McNairy, M., et al., *Stability of B-type natriuretic peptide levels during exercise in patients with congestive heart failure: implications for outpatient monitoring with B-type natriuretic peptide*. Am Heart J, 2002. **143**(3): p. 406-11.
44. Mir, T.S., et al., *Plasma concentrations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in control children from the neonatal to adolescent period and in children with congestive heart failure*. Pediatrics, 2002. **110**(6): p. e76.
45. Mueller, C., et al., *Use of B-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 647-54.
46. Nir, A., et al., *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide: reference plasma levels from birth to adolescence. Elevated levels at birth and in infants and children with heart diseases*. Acta Paediatr, 2004. **93**(5): p. 603-7.
47. Nishikimi, T., et al., *Plasma brain natriuretic peptide levels in chronic hemodialysis patients: influence of coronary artery disease*. Am J Kidney Dis, 2001. **37**(6): p. 1201-8.
48. Osajima, A., et al., *Clinical significance of natriuretic peptides and cyclic GMP in hemodialysis patients with coronary artery disease*. Am J Nephrol, 2001. **21**(2): p. 112-9.
49. Pfister, R., et al., *[The value of natriuretic peptides NT-pro-BNP and BNP for the assessment of left-ventricular volume and function. A prospective study of 150 patients]*. Dtsch Med Wochenschr, 2002. **127**(49): p. 2605-9.
50. Pfister, R., E. Erdmann, and C.A. Schneider, *[Natriuretic peptides BNP and NT-pro-BNP--the "new troponins" for estimation of heart failure?]*. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(18): p. 1007-12.
51. Redfield, M.M., et al., *Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(5): p. 976-82.
52. Schultz, H.D., et al., *Vagal C-fiber blockade abolishes sympathetic inhibition by atrial natriuretic factor*. Am J Physiol, 1988. **255**(1 Pt 2): p. R6-13.
53. Seino, Y., et al., *Application of NT-proBNP and BNP measurements in cardiac care: a more discerning marker for the detection and evaluation of heart failure*. Eur J Heart Fail, 2004. **6**(3): p. 295-300.

54. Shimizu, H., et al., *Stability of brain natriuretic peptide (BNP) in human blood samples*. Clin Chim Acta, 1999. **285**(1-2): p. 169-72.
55. Shimizu, H., et al., *Degradation of human brain natriuretic peptide (BNP) by contact activation of blood coagulation system*. Clin Chim Acta, 2001. **305**(1-2): p. 181-6.
56. Silbernagel, S. and A. Despopoulos, *Taschenatlas der Physiologie*. 5. ed. 2001, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 152, 170, 182, 268, 278.
57. Steele, M.K., et al., *Interactions between ANP and ANG II in regulating blood pressure and sympathetic outflow*. Am J Physiol, 1991. **260**(6 Pt 2): p. R1145-51.
58. Stoupakis, G. and M. Klapholz, *Natriuretic peptides: biochemistry, physiology, and therapeutic role in heart failure*. Heart Dis, 2003. **5**(3): p. 215-23.
59. Sudoh, T., et al., *A new natriuretic peptide in porcine brain*. Nature, 1988. **332**(6159): p. 78-81.
60. Takahashi, M., et al., *Plasma concentrations of natriuretic peptides in patients on hemodialysis*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1996. **92**(1): p. 19-30.
61. Troughton, R.W., et al., *Plasma amino-terminal B-type natriuretic peptide measured by Elecsys 2010 assay in a trial of hormone-guided treatment for heart failure*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1212-5.
62. Tsuji, T., et al., *Stabilization of human brain natriuretic peptide in blood samples*. Clin Chem, 1994. **40**(4): p. 672-3.
63. van der Merwe, D.E., et al., *Effect of different sample types and stability after blood collection of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as measured with Roche Elecsys system*. Clin Chem, 2004. **50**(4): p. 779-80.
64. Wahl, H.G., et al., *Elimination of the cardiac natriuretic peptides B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP by hemodialysis*. Clin Chem, 2004. **50**(6): p. 1071-4.
65. Wang, T.J., et al., *Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 655-63.
66. Westerlind, A., et al., *Clinical signs of heart failure are associated with increased levels of natriuretic peptide types B and A in children with congenital heart defects or cardiomyopathy*. Acta Paediatr, 2004. **93**(3): p. 340-5.
67. Wiecek, S.J., et al., *A rapid B-type natriuretic peptide assay accurately diagnoses left ventricular dysfunction and heart failure: a multicenter evaluation*. Am Heart J, 2002. **144**(5): p. 834-9.
68. Wu, A.H., et al., *Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study*. Clin Chem, 2004. **50**(5): p. 867-73.
69. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. J Clin Invest, 1960. **39**: p. 1157-75.
70. Yoshibayashi, M., et al., *Plasma brain natriuretic peptide concentrations in healthy children from birth to adolescence: marked and rapid increase after birth*. Eur J Endocrinol, 1995. **133**(2): p. 207-9.
71. Zoccali, C., et al., *Cardiac natriuretic peptides are related to left ventricular mass and function and predict mortality in dialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(7): p. 1508-15.

10 ANHANG

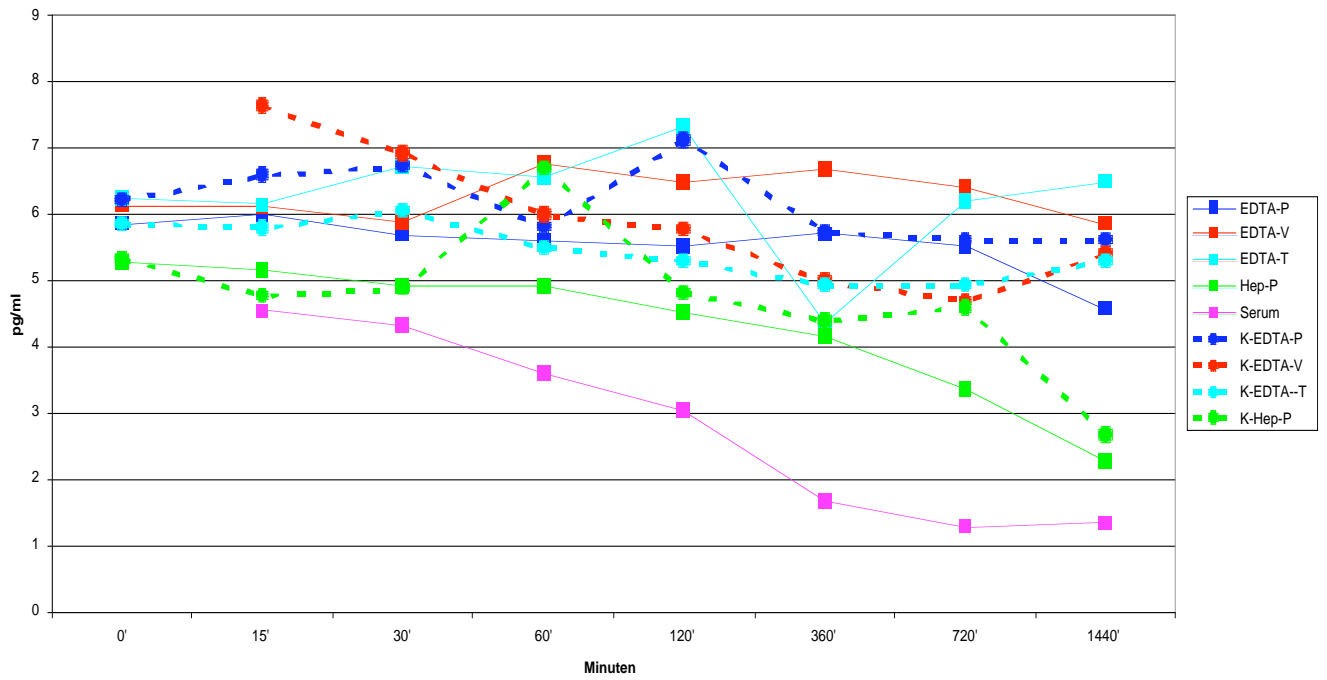
Diagramme der BNP-Messungen:

- 1 bis 4: Gesunde Probanden
- 5 bis 8: Probanden ohne kardiale Symptomatik
- 9 und 10: Herzinsuffizienzpatienten
- 11 bis 21: Dialysepatienten
- 22 bis 24: Intensivpflichtige Patienten

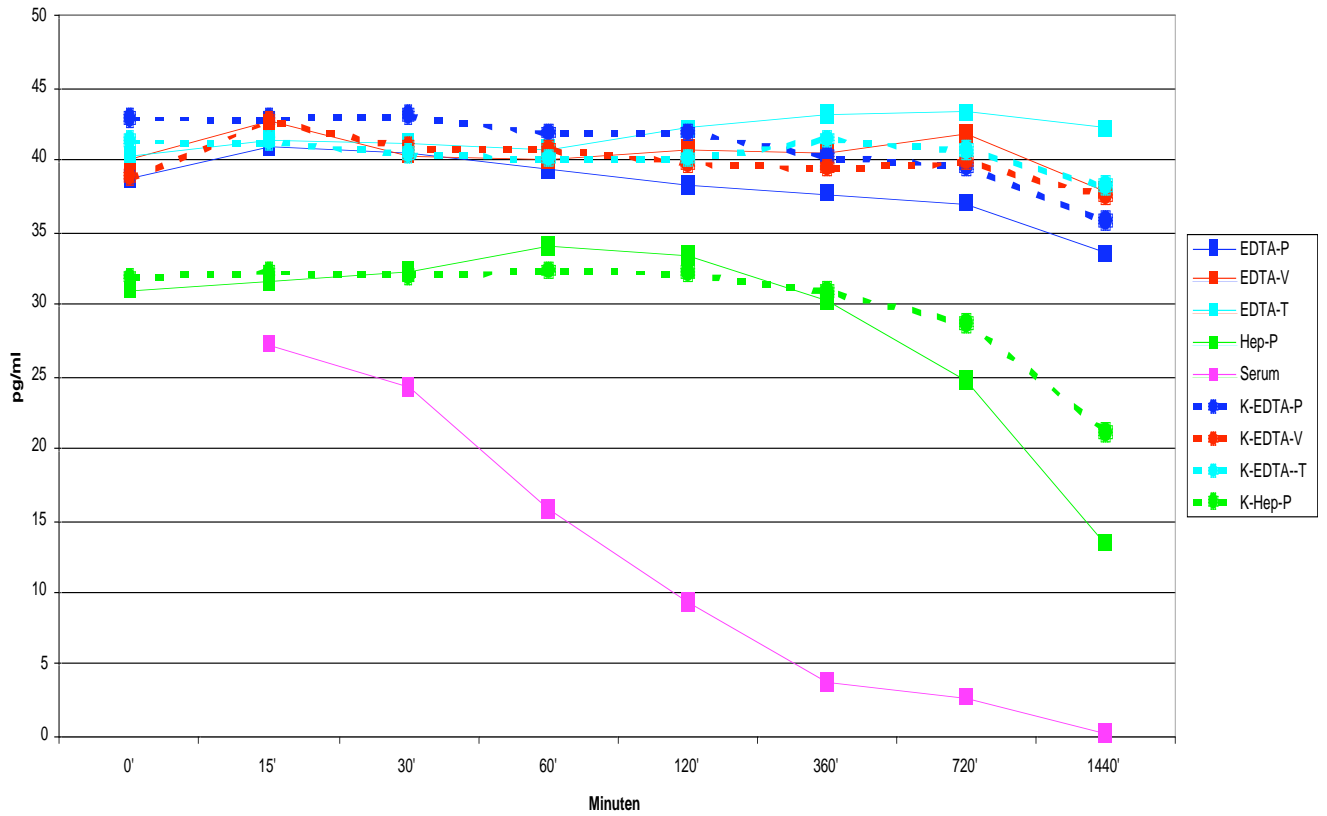
Diagramme der NTproBNP-Messungen:

- 3 und 4: Gesunde Probanden
- 5 bis 8: Probanden ohne kardiale Symptomatik (aus technischen Gründen wurden keine entsprechenden Messungen für 5 und 9 durchgeführt)
- 9 und 10: Herzinsuffizienzpatienten
- 11 bis 21: Dialysepatienten
- 22 bis 24: Intensivpflichtige Patienten

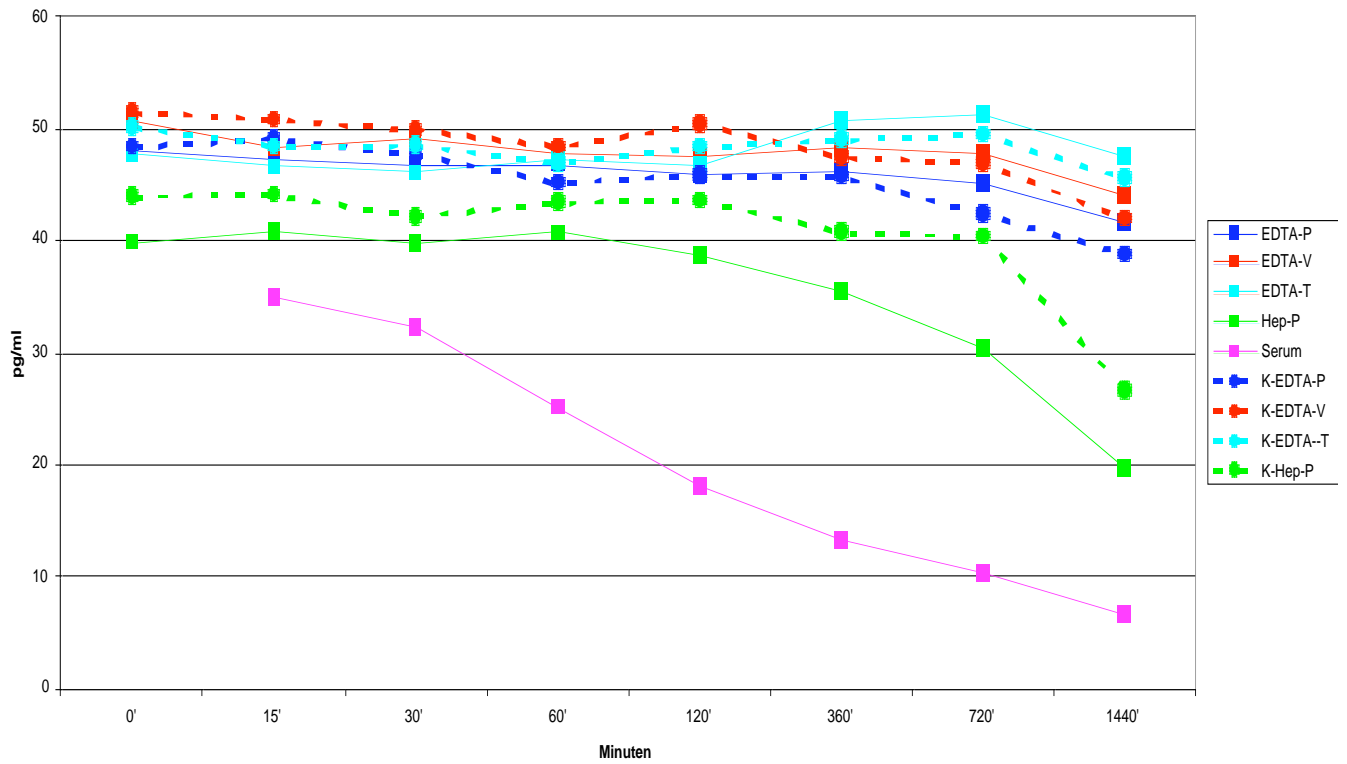
BNP-Diagramm 1



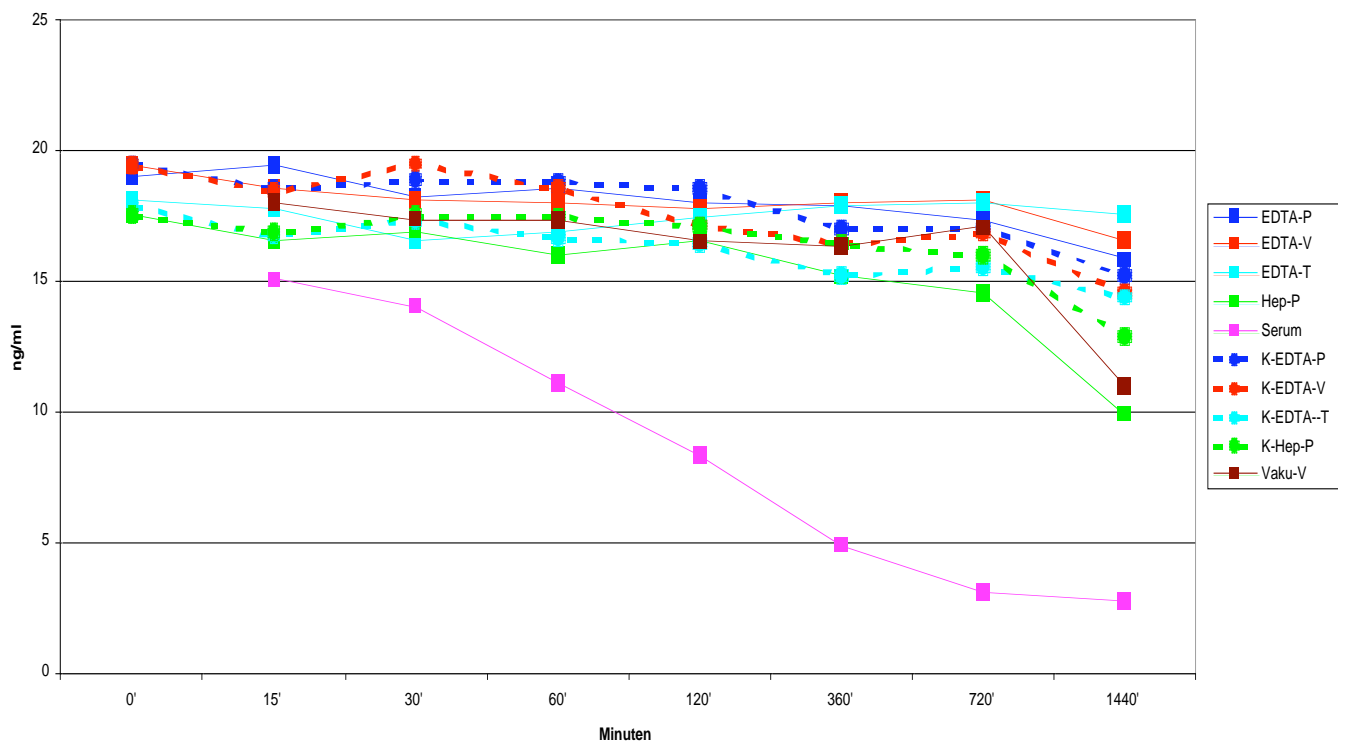
BNP-Diagramm 2



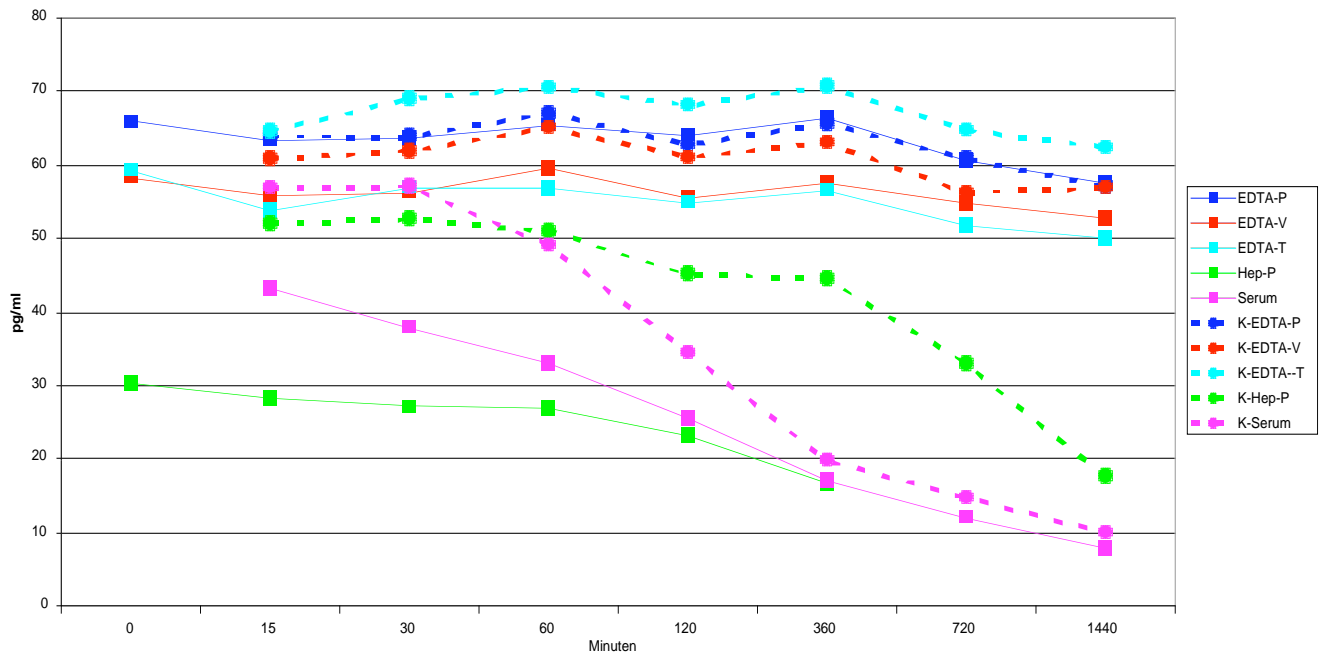
BNP-Diagramm 3



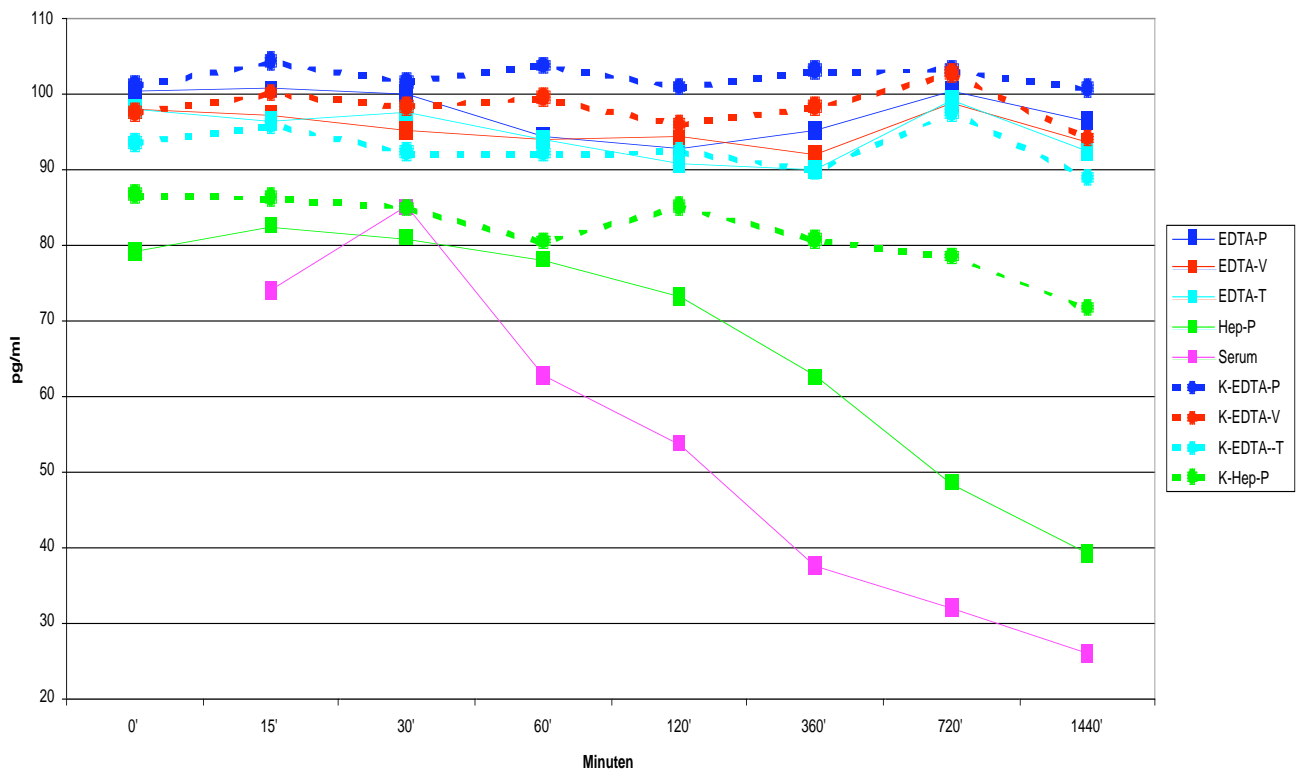
BNP-Diagramm 4



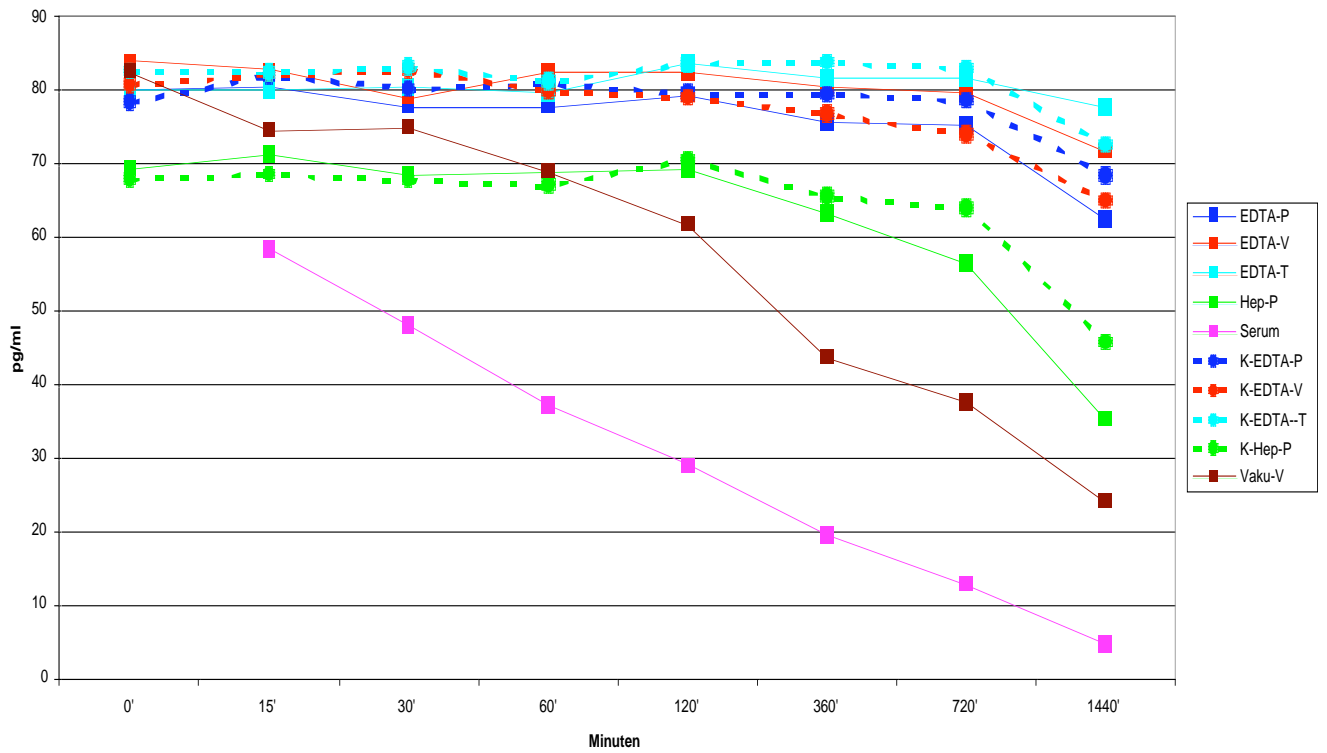
BNP-Diagramm 5



BNP-Diagramm 6



BNP-Diagramm 7



BNP-Diagramm 8

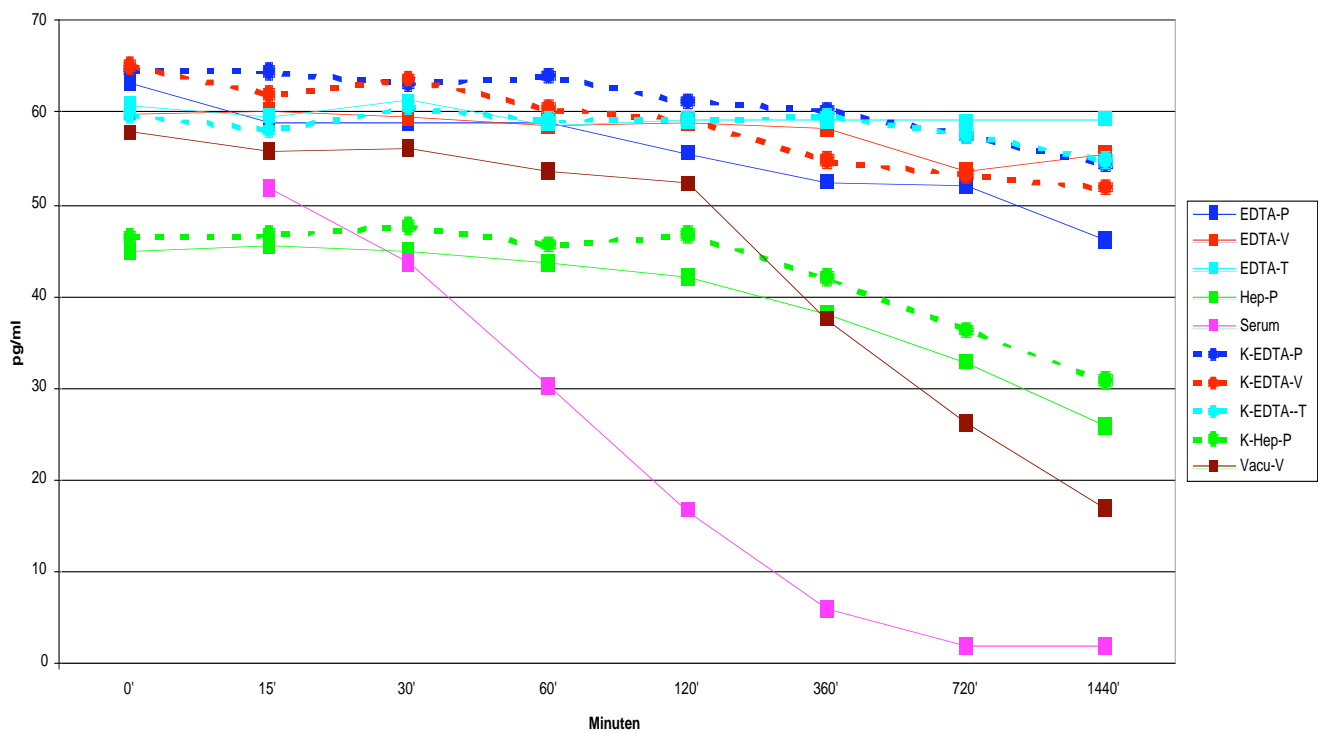
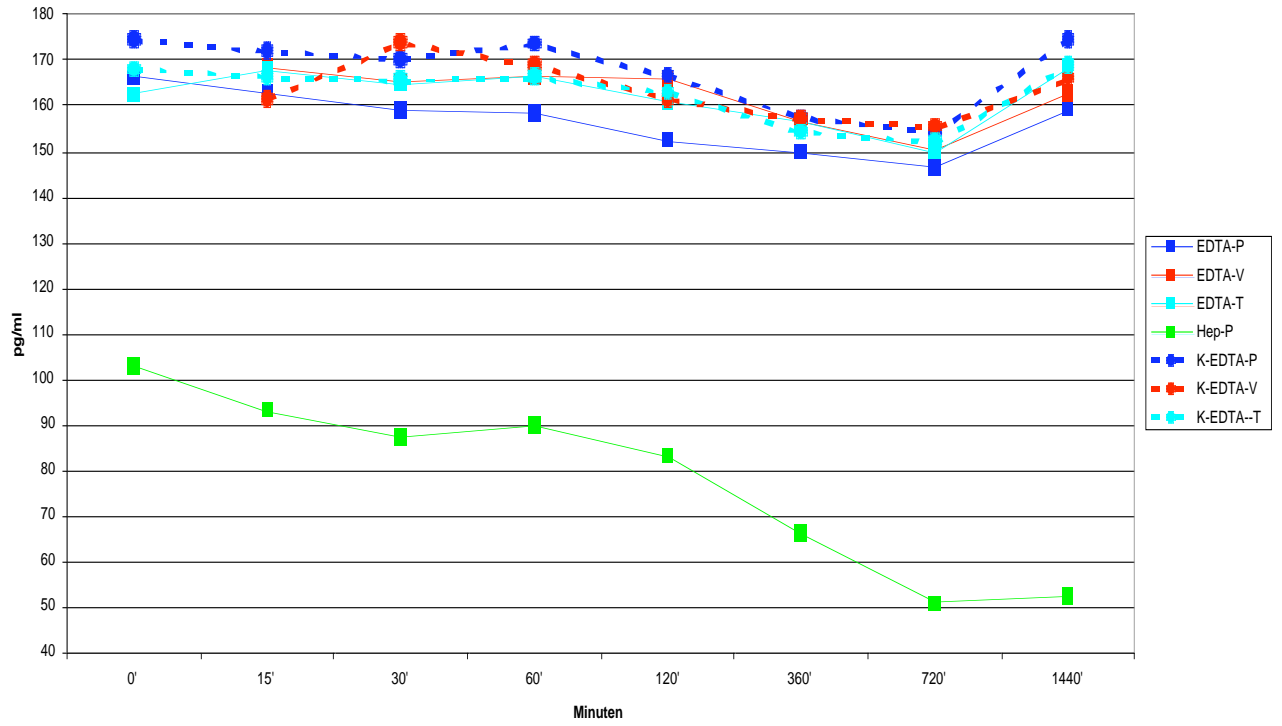
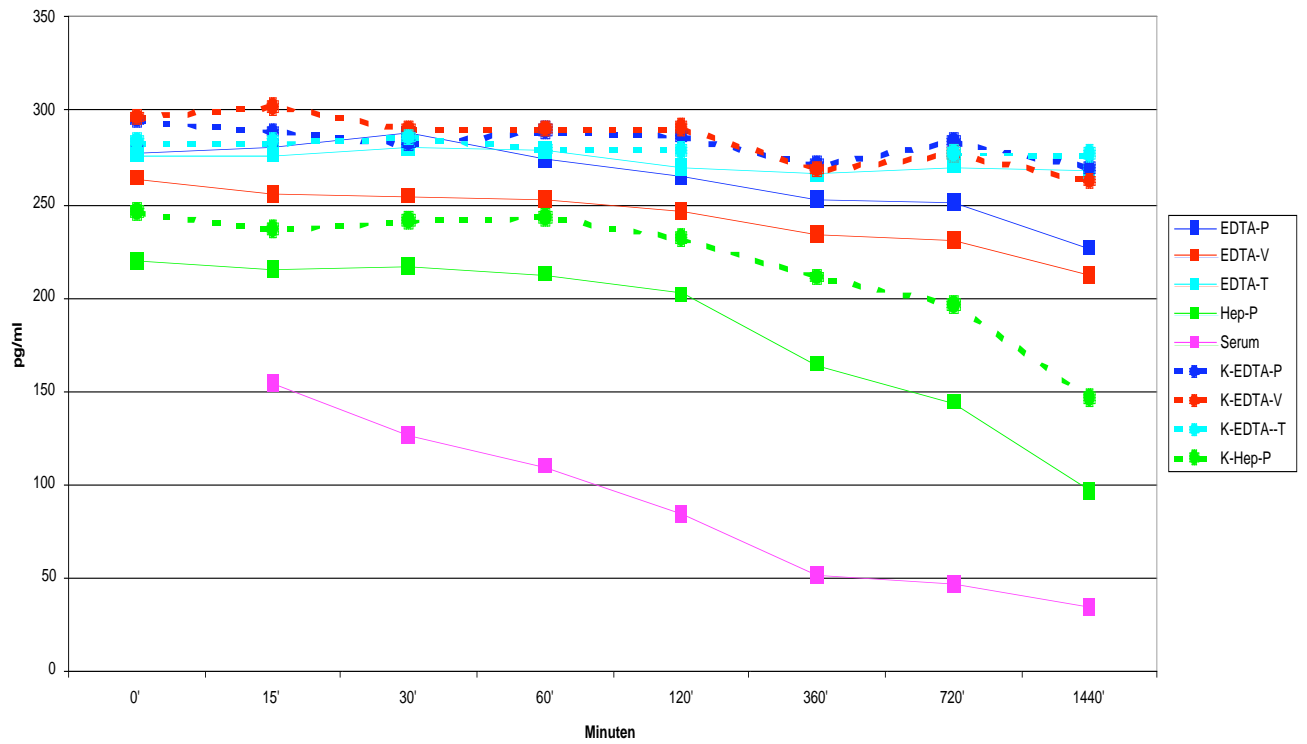


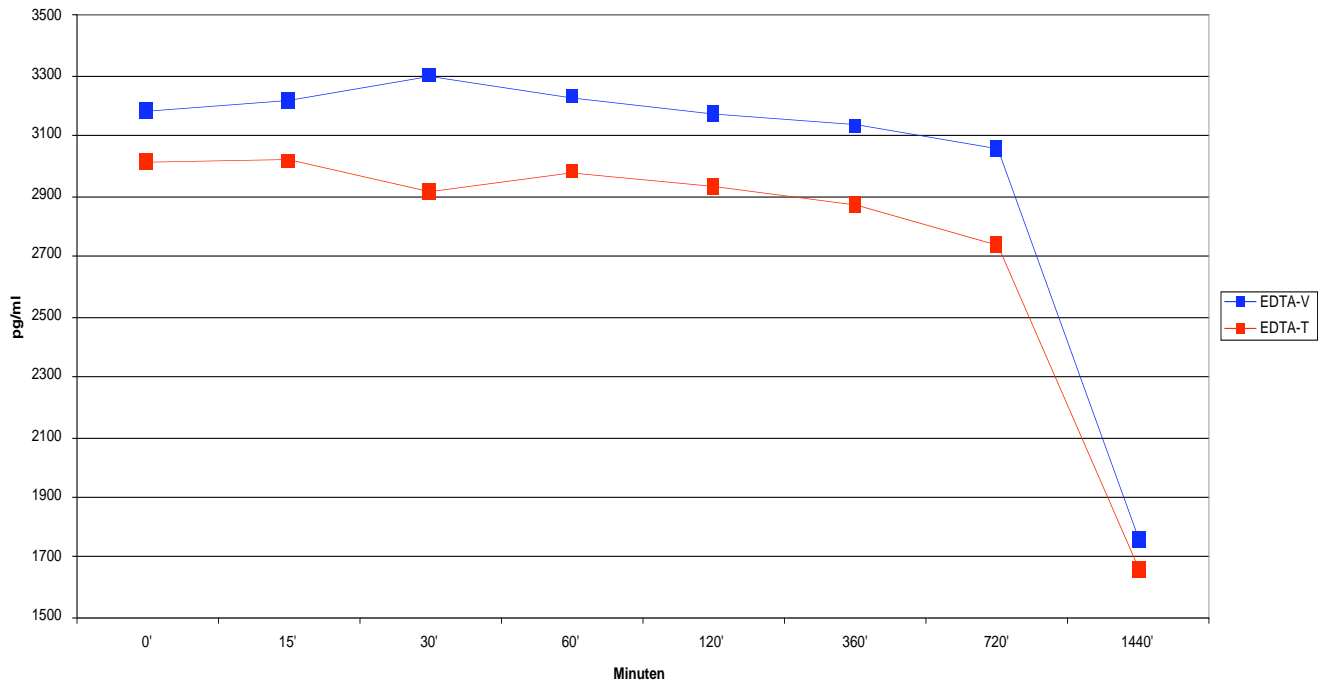
Diagramm 9



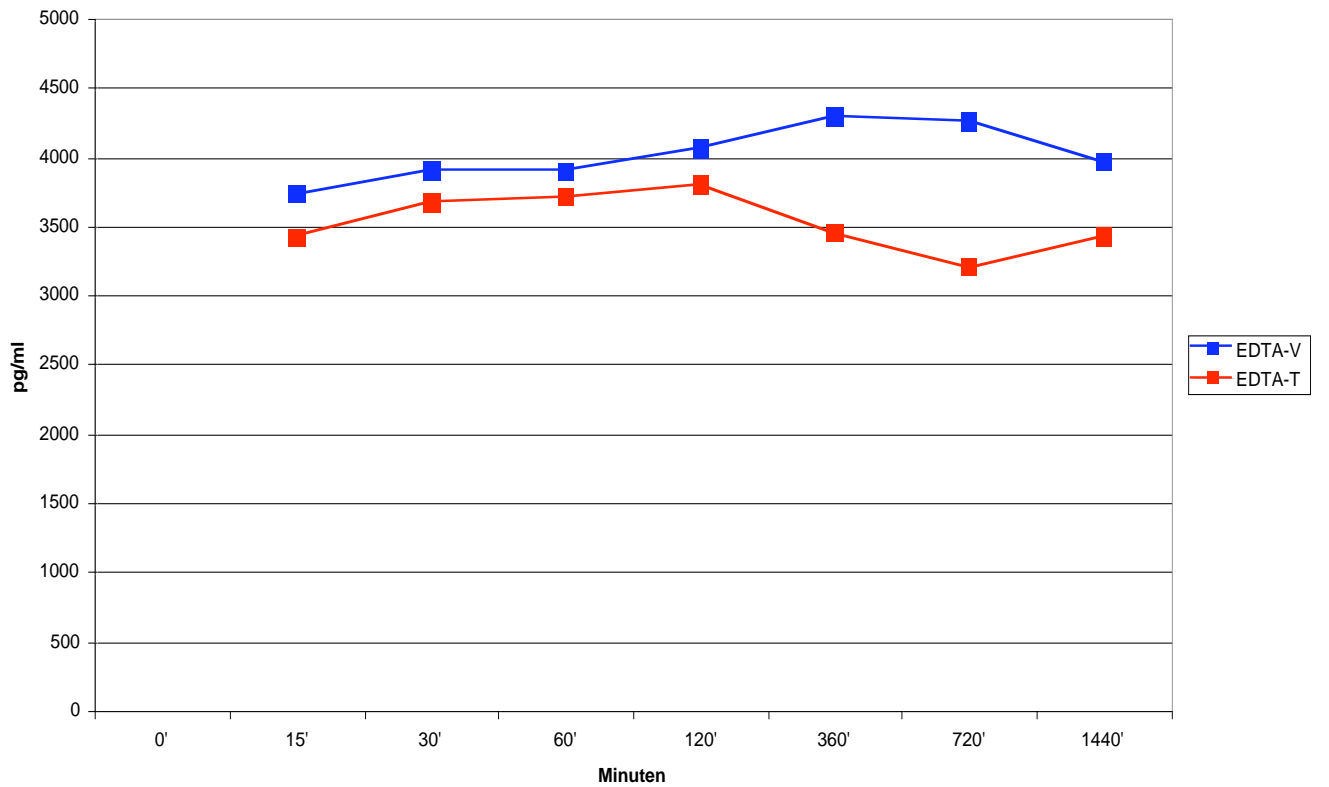
BNP-Diagramm 10



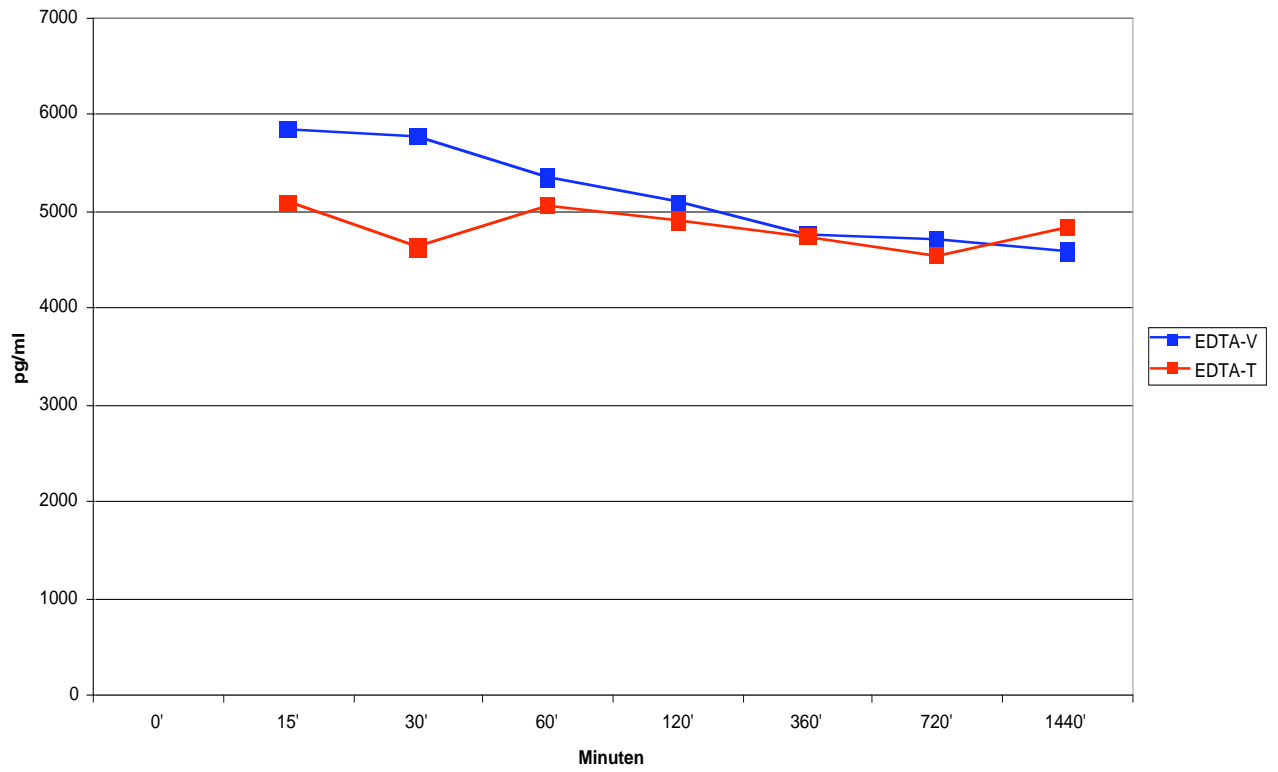
BNP-Diagramm11



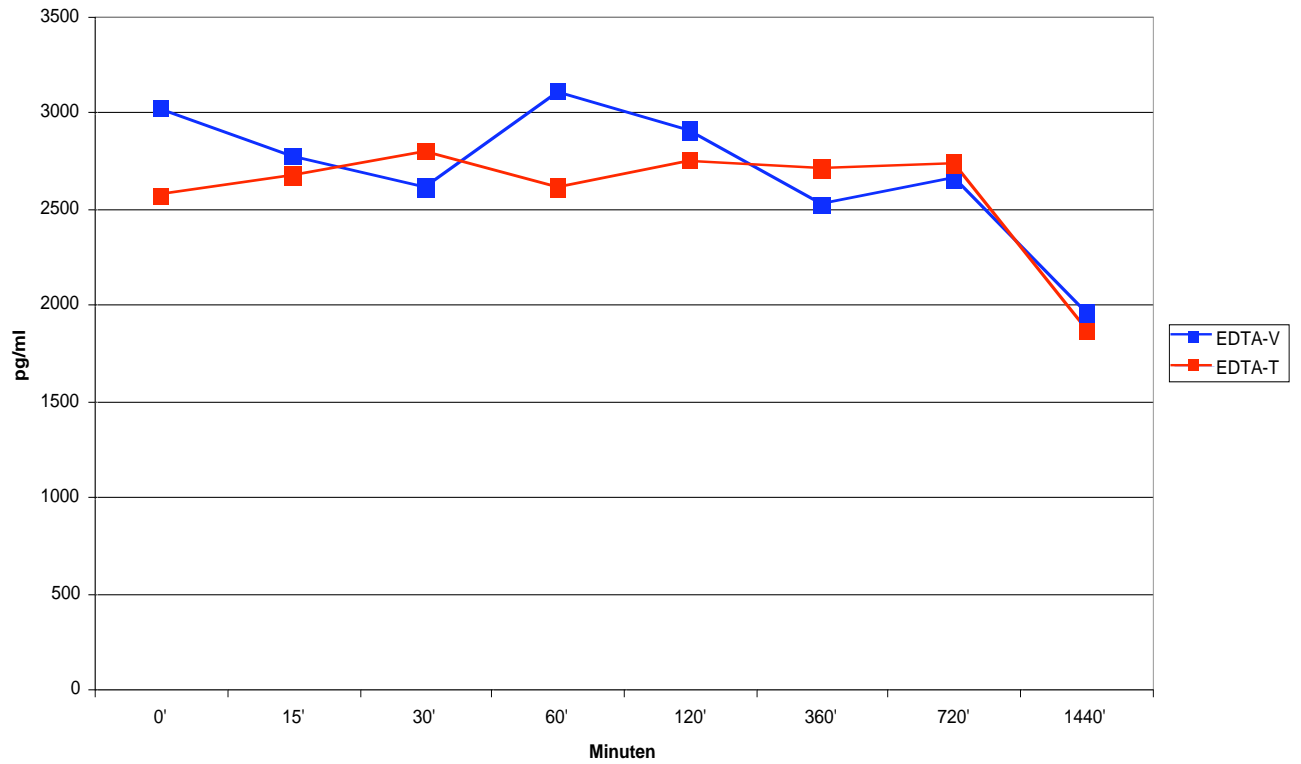
BNP-Diagramm12



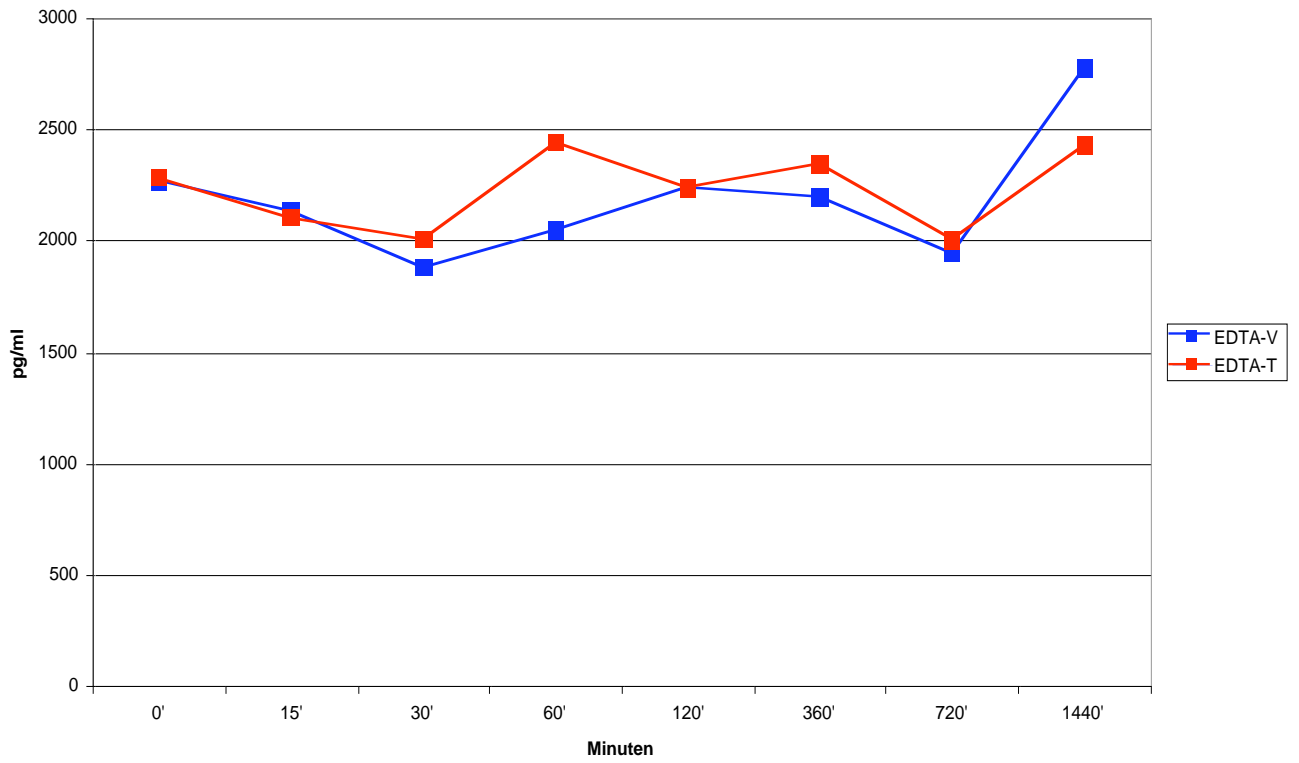
BNP-Diagramm13



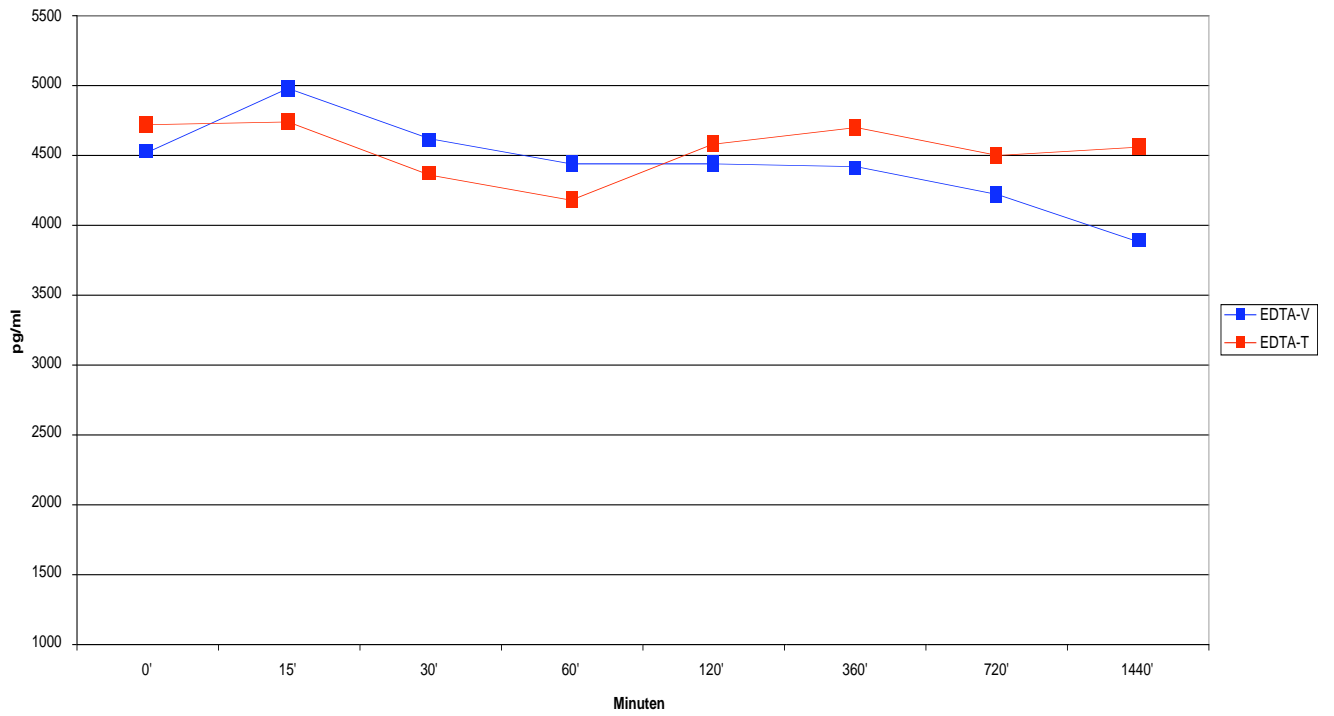
BNP-Diagramm14



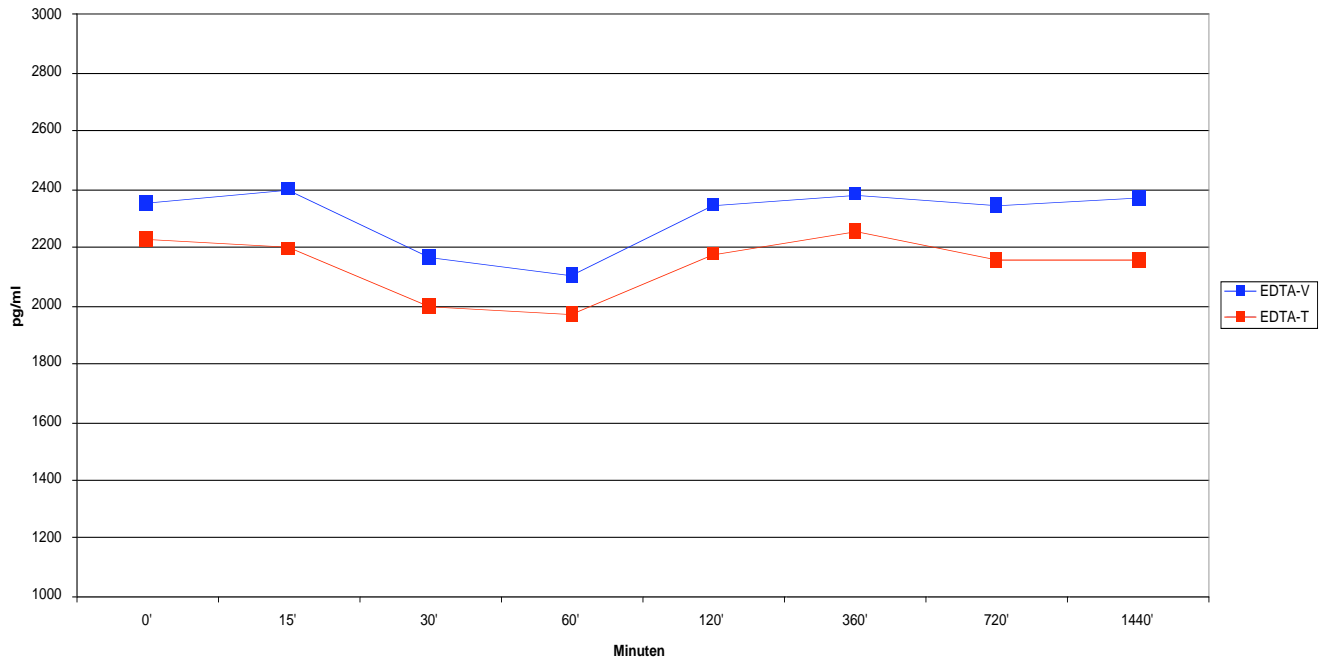
BNP-Diagramm15



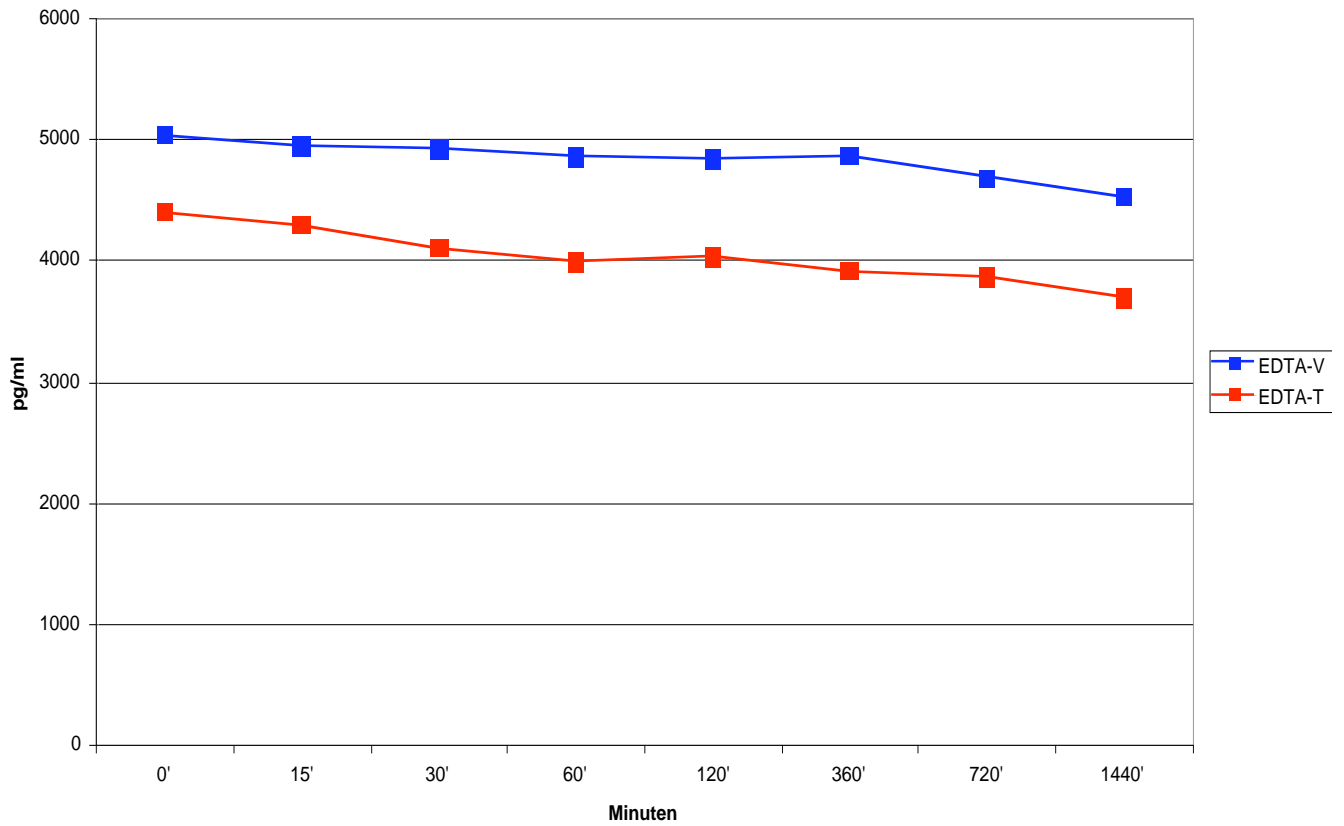
BNP-Diagramm16



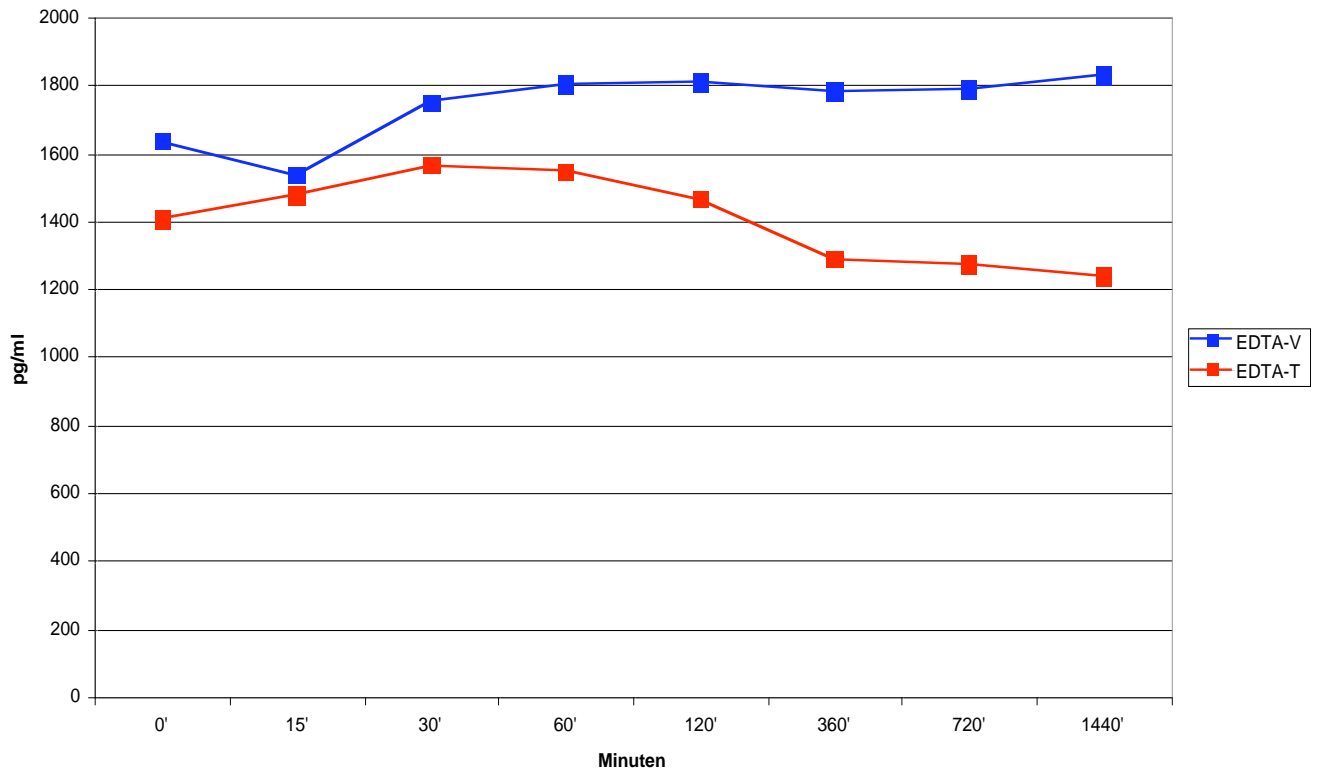
BNP-Diagramm17



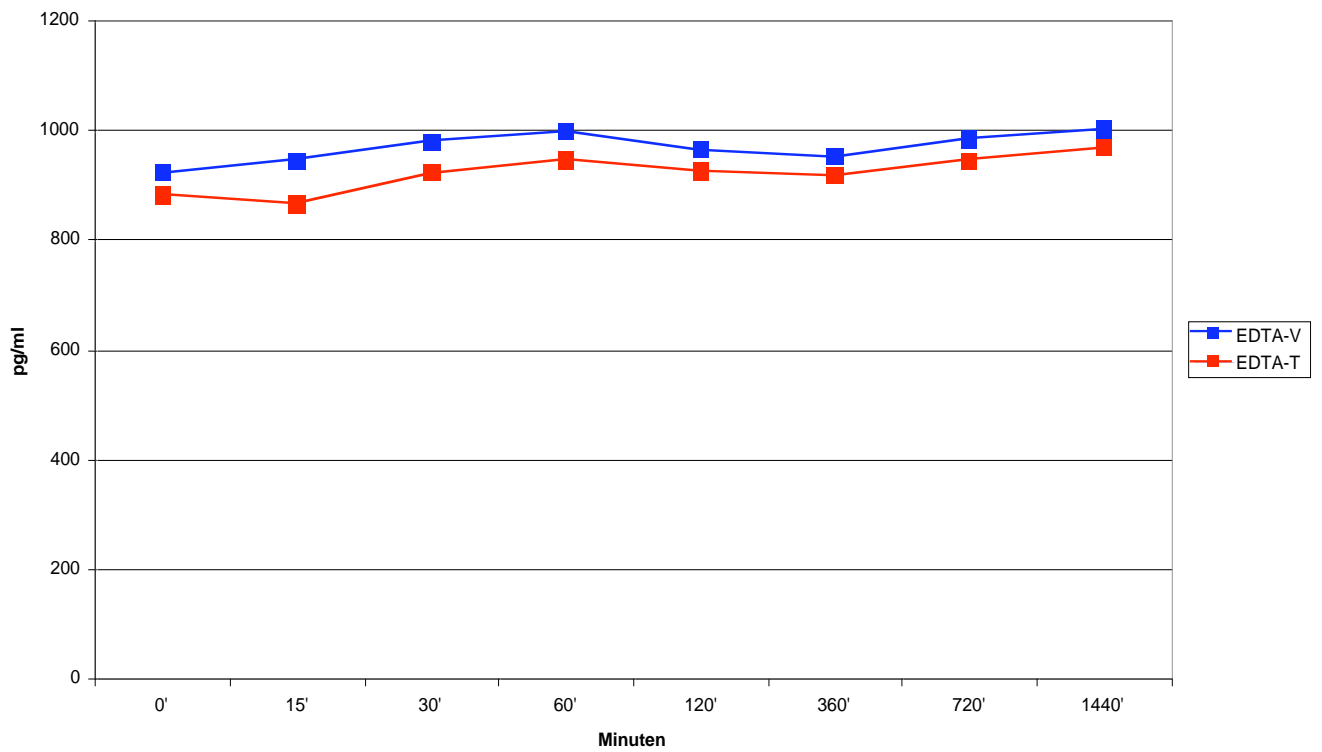
BNP-Diagramm18



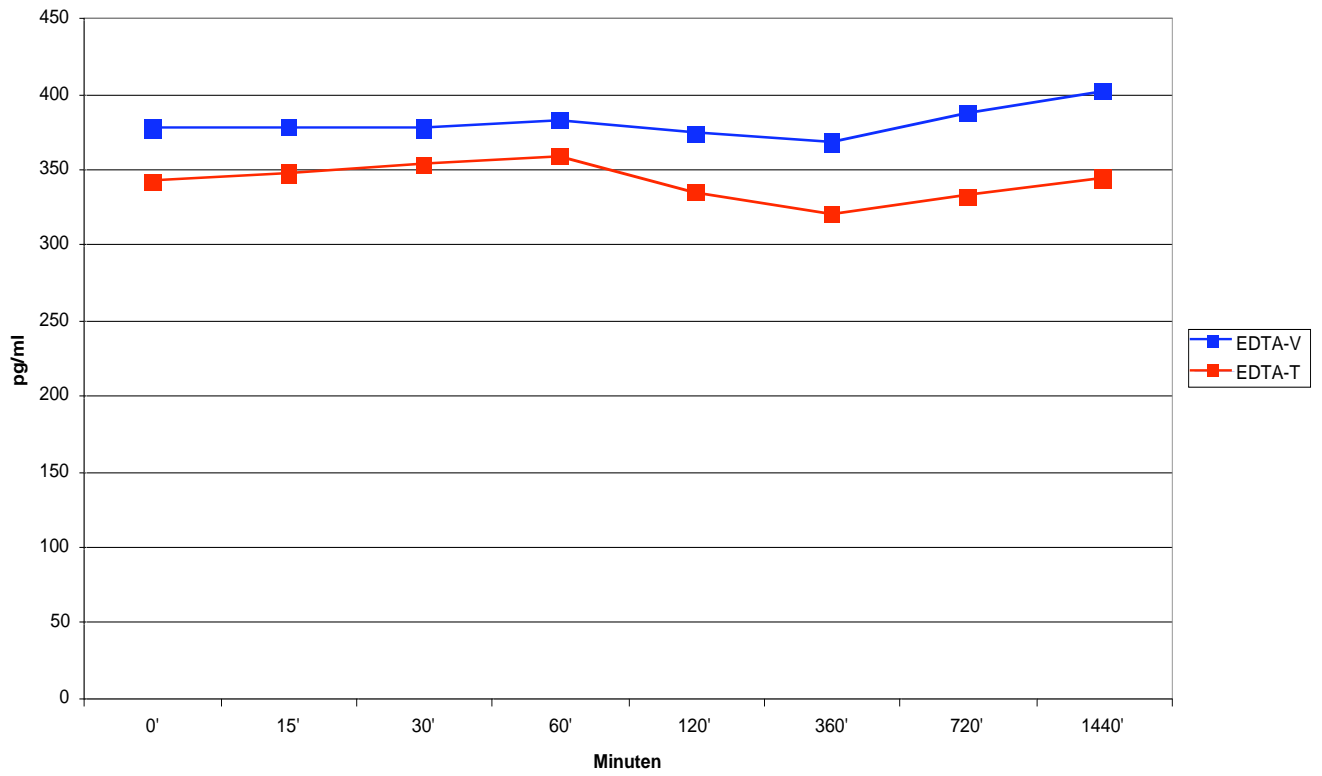
BNP-Diagramm19



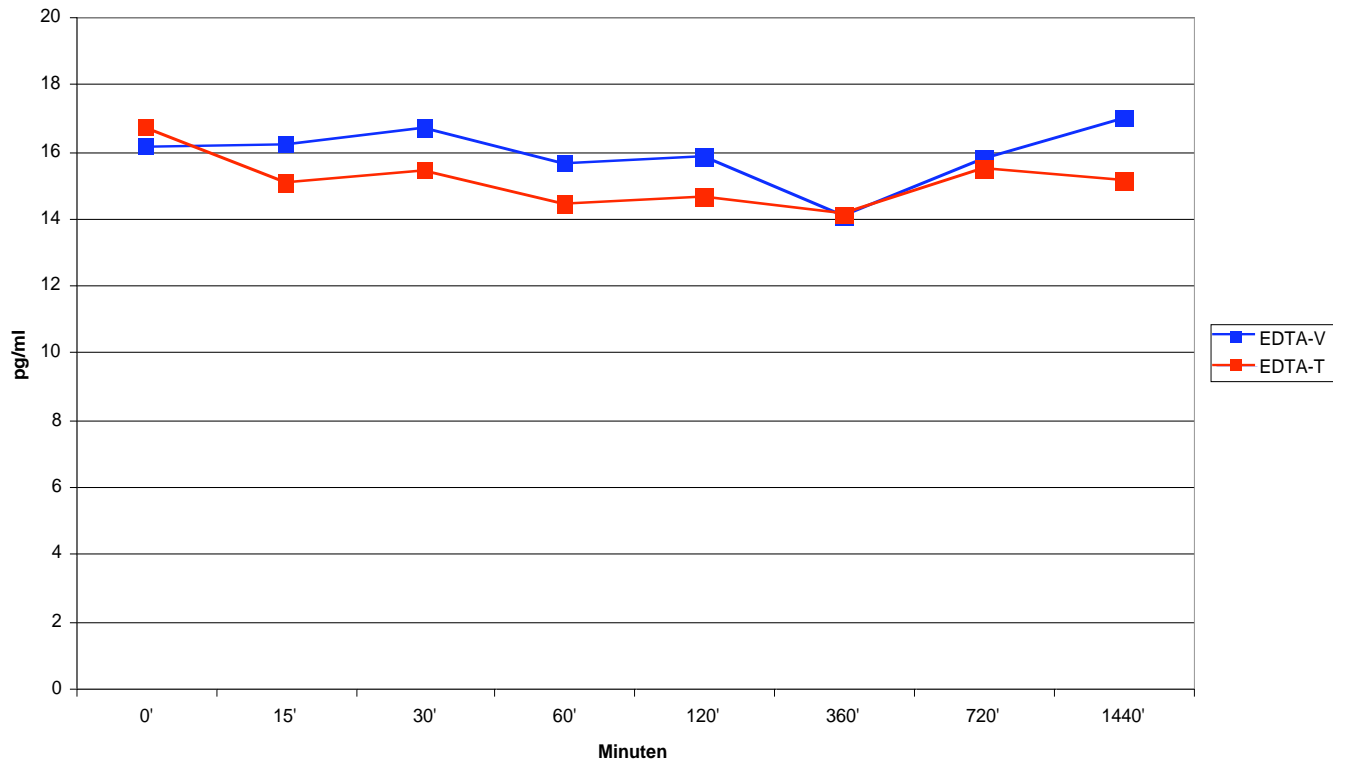
BNP-Diagramm20



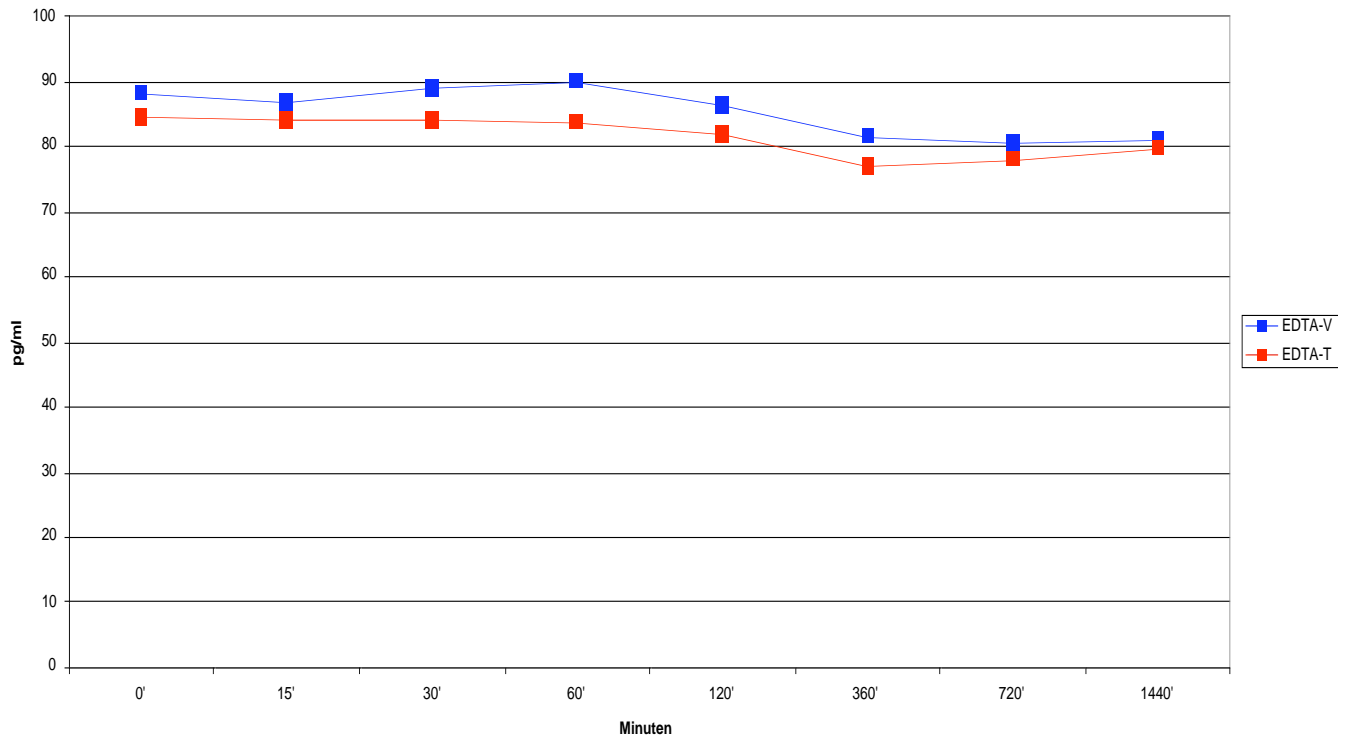
BNP-Diagramm21



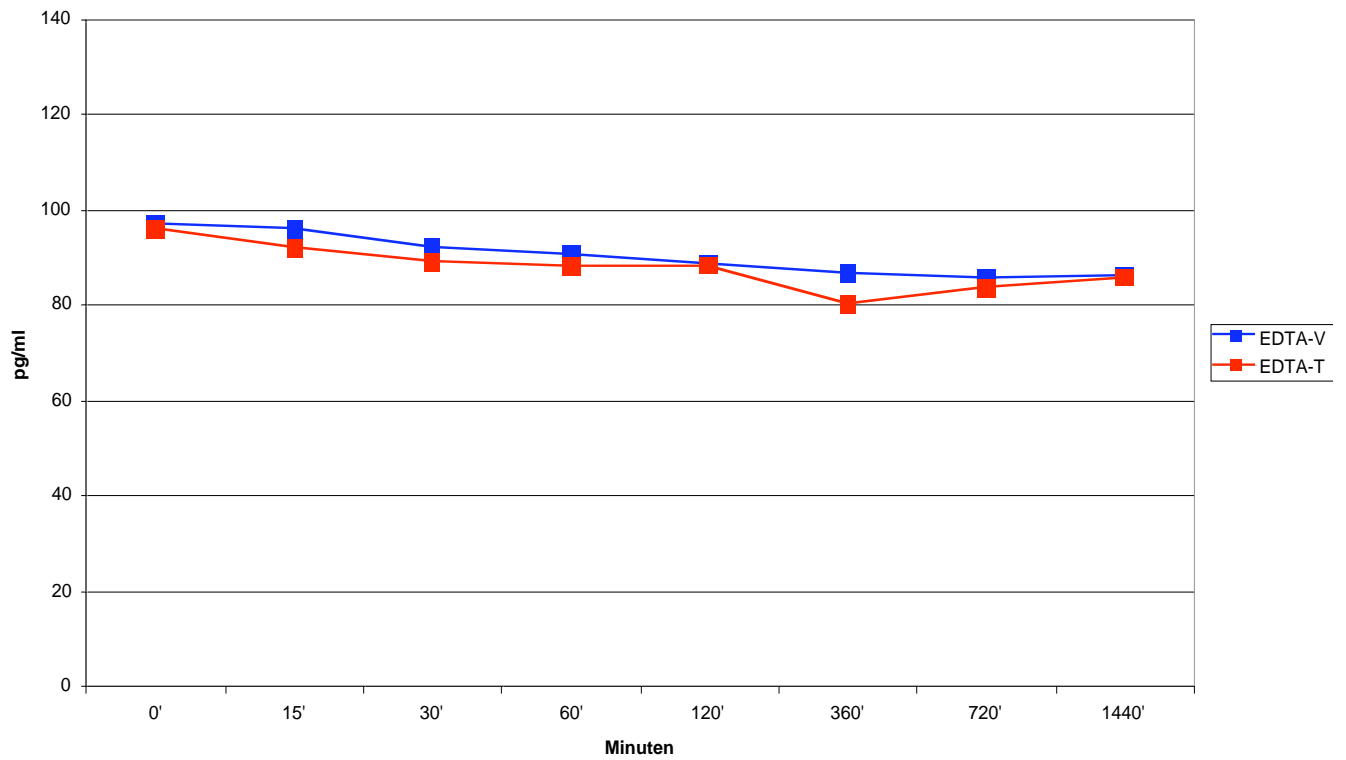
BNP-Diagramm22



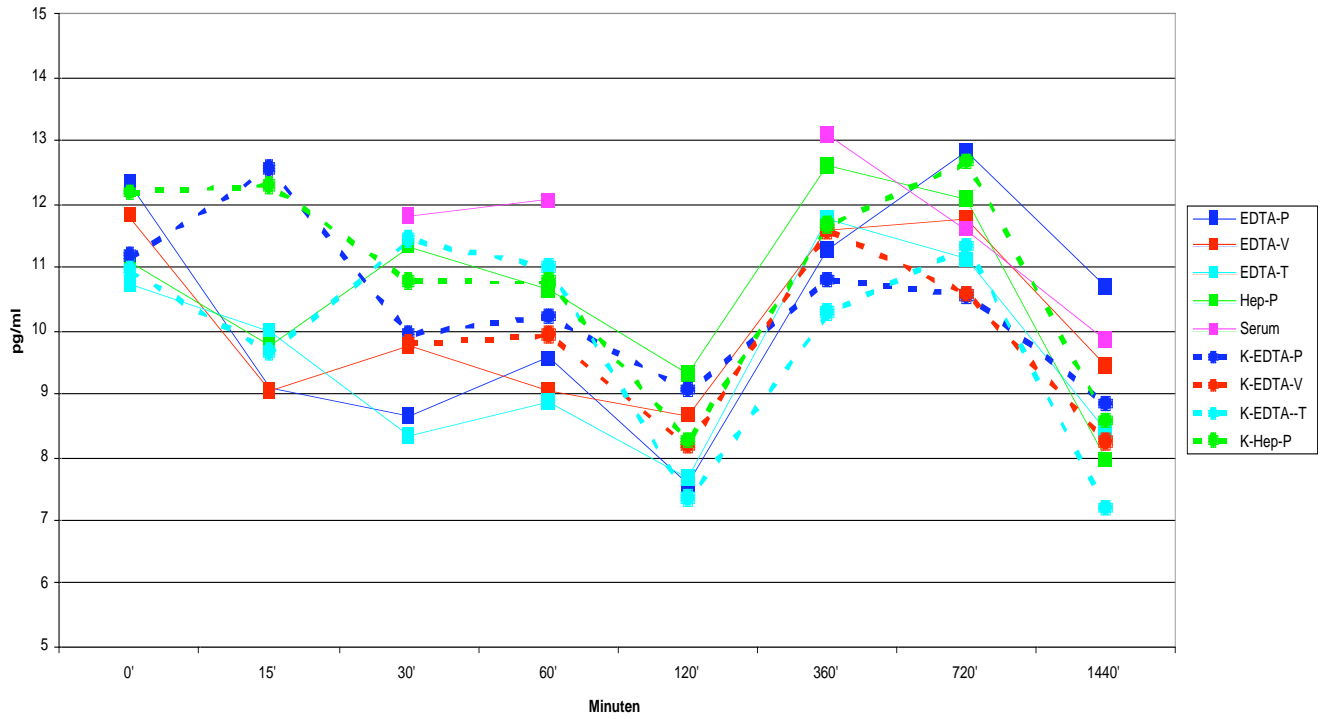
BNP-Diagramm23



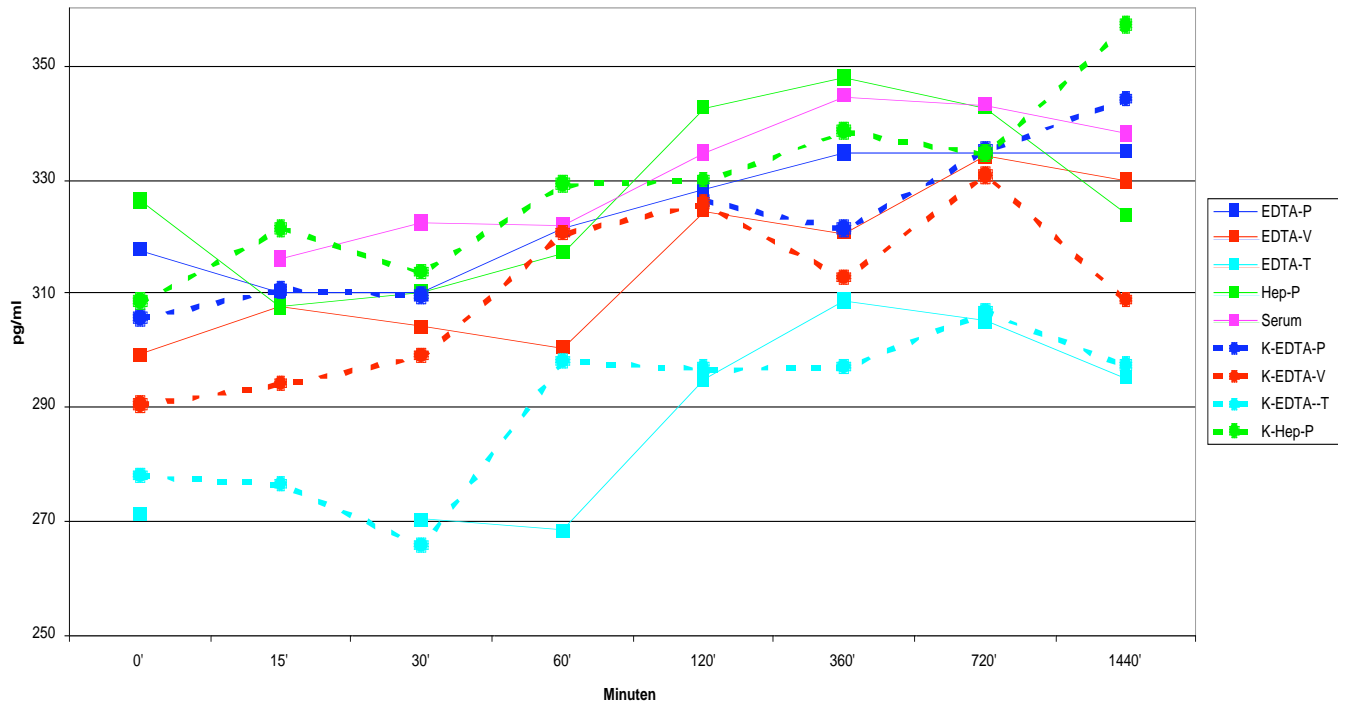
BNP-Diagramm24



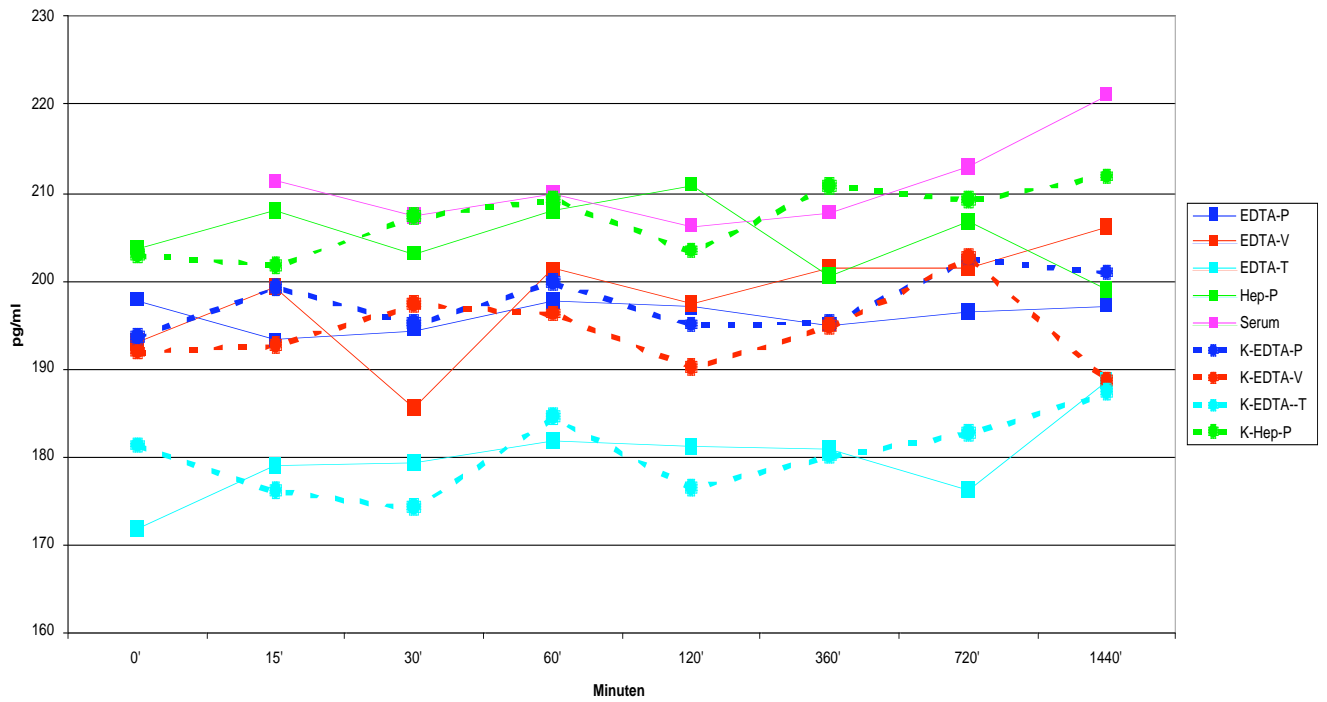
NTproBNP-Diagramm1



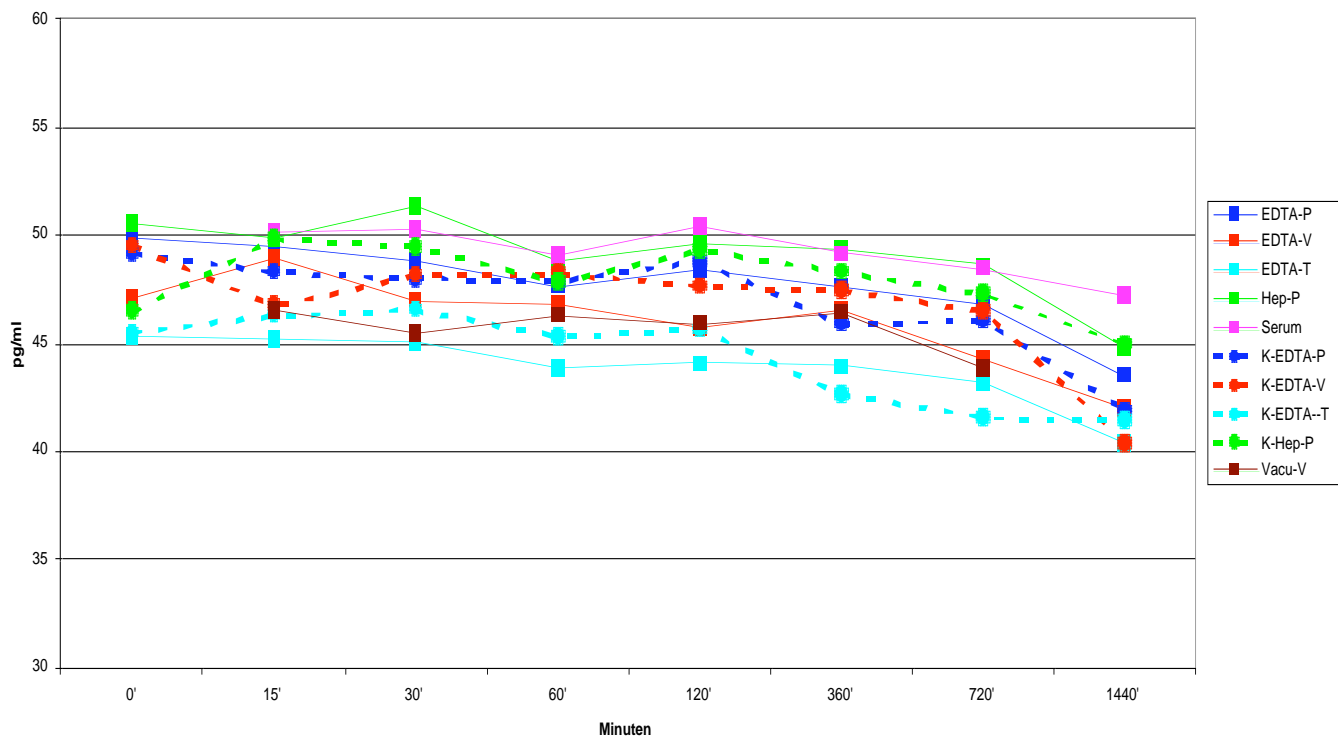
NTproBNP-Diagramm2



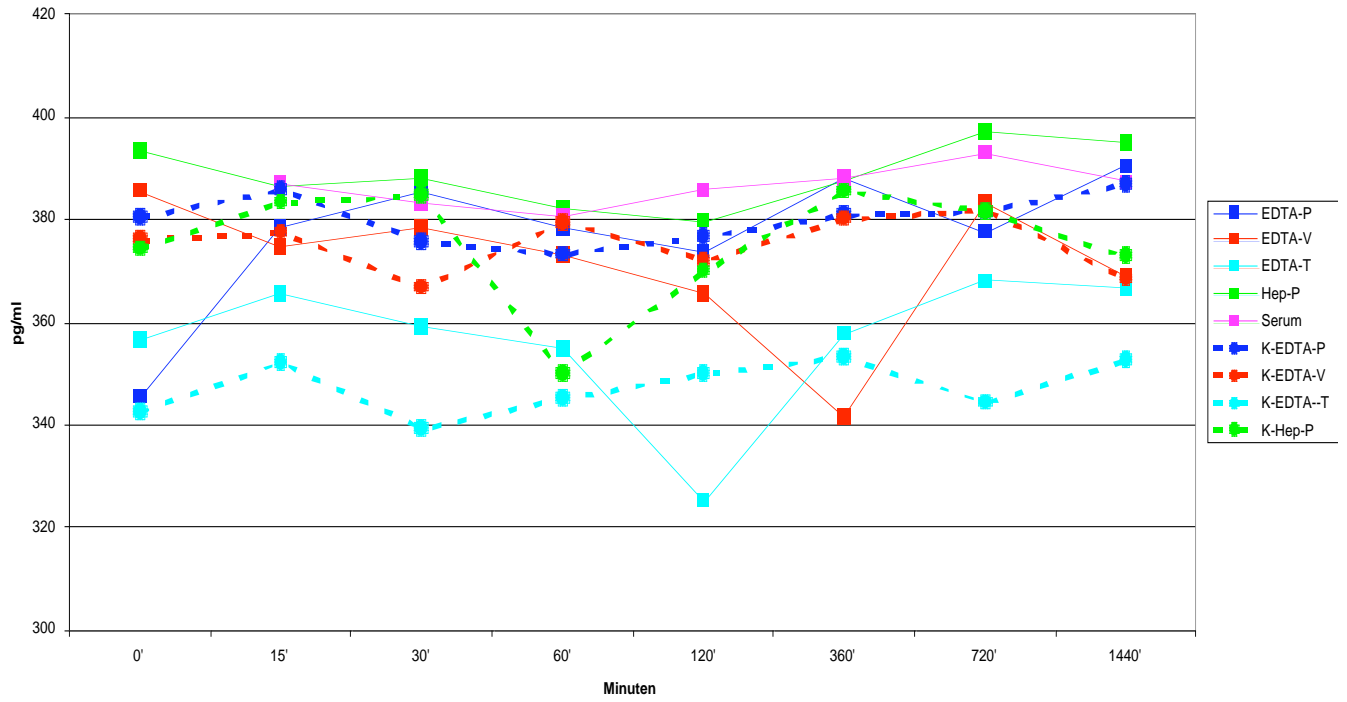
NTproBNP-Diagramm3



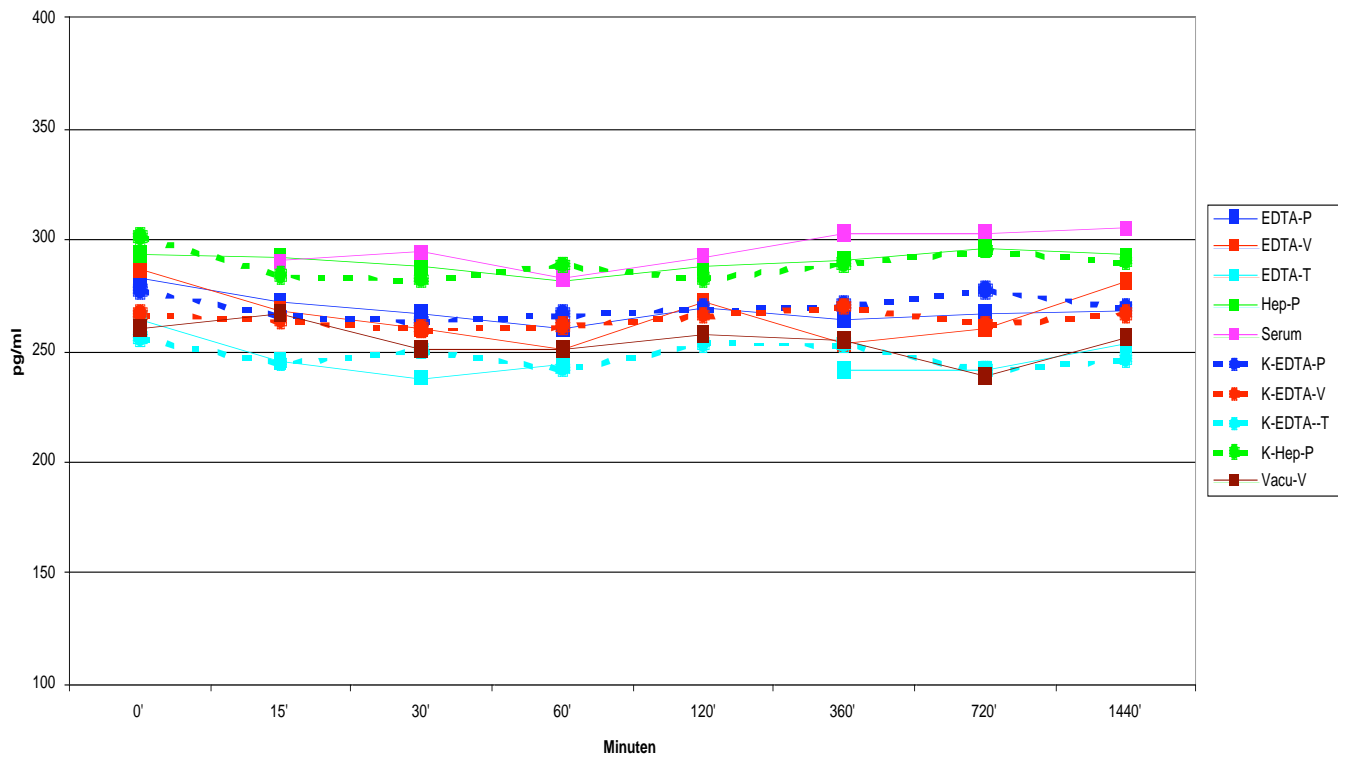
NTproBNP-Diagramm4



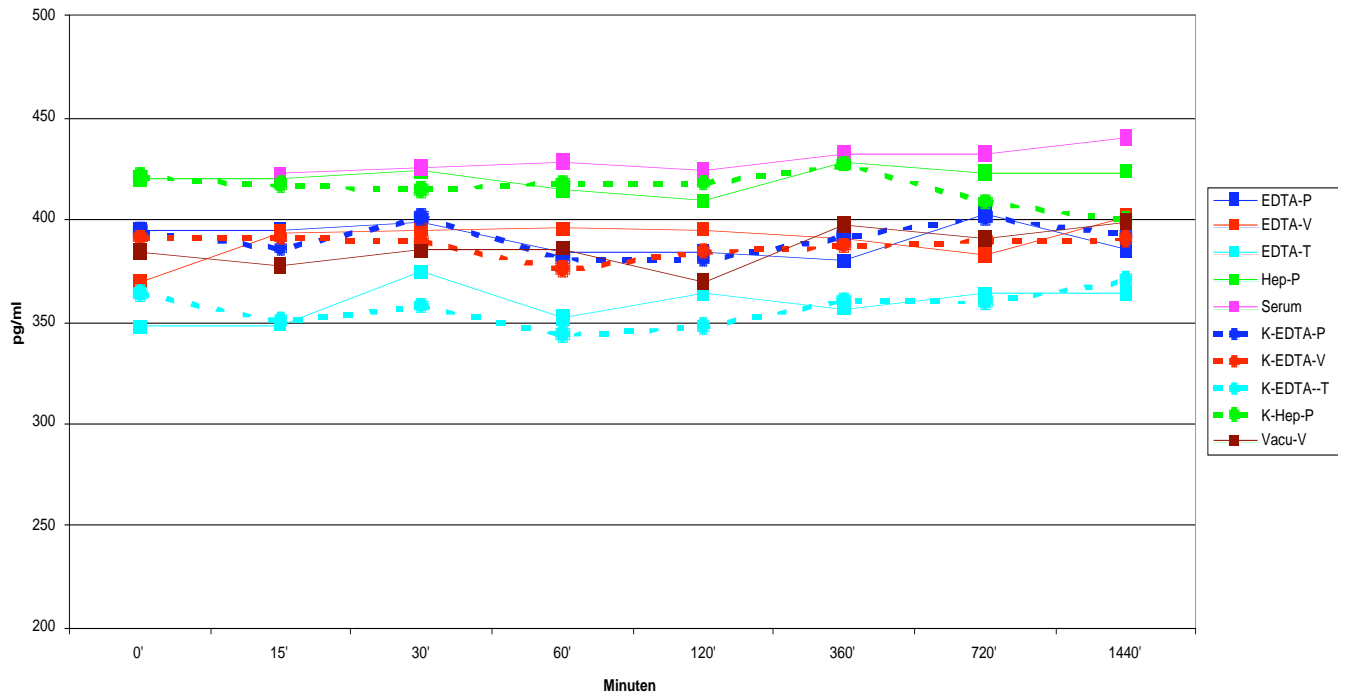
NTproBNP-Diagramm6



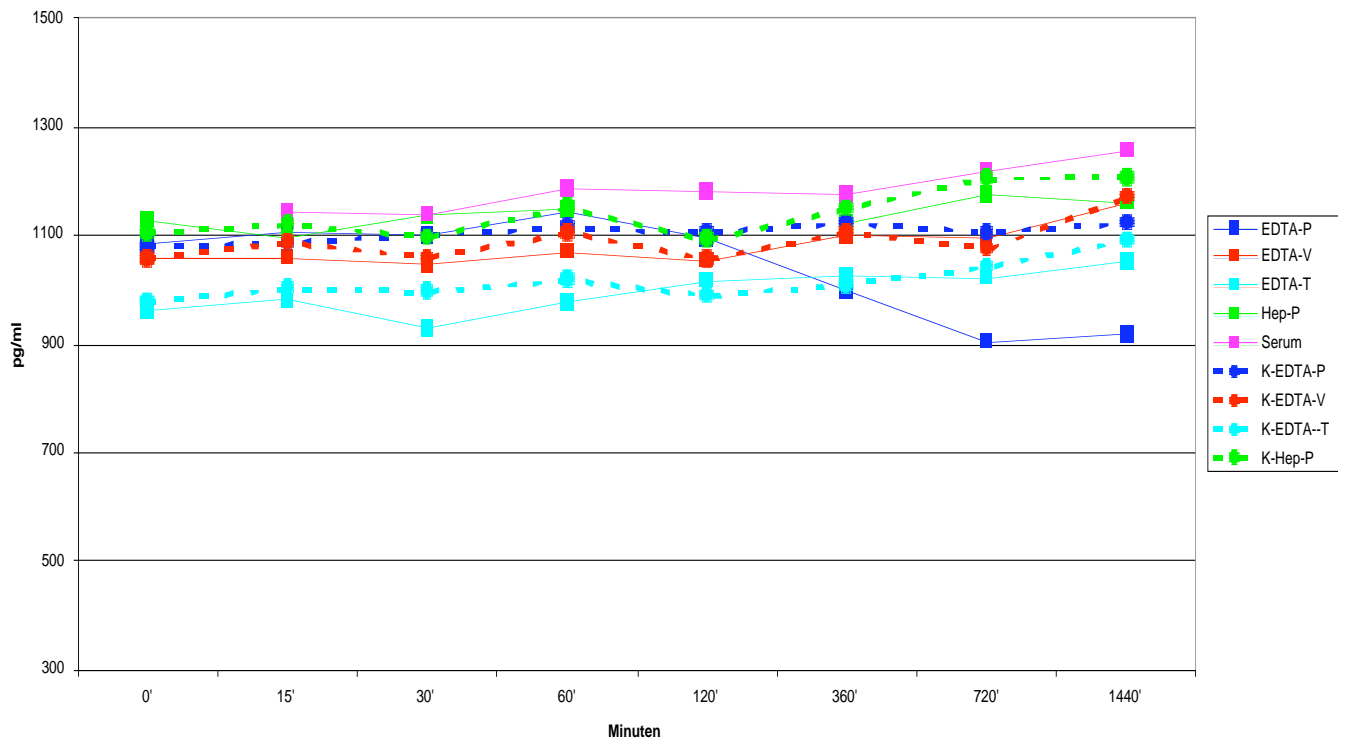
NTproBNP-Diagramm7



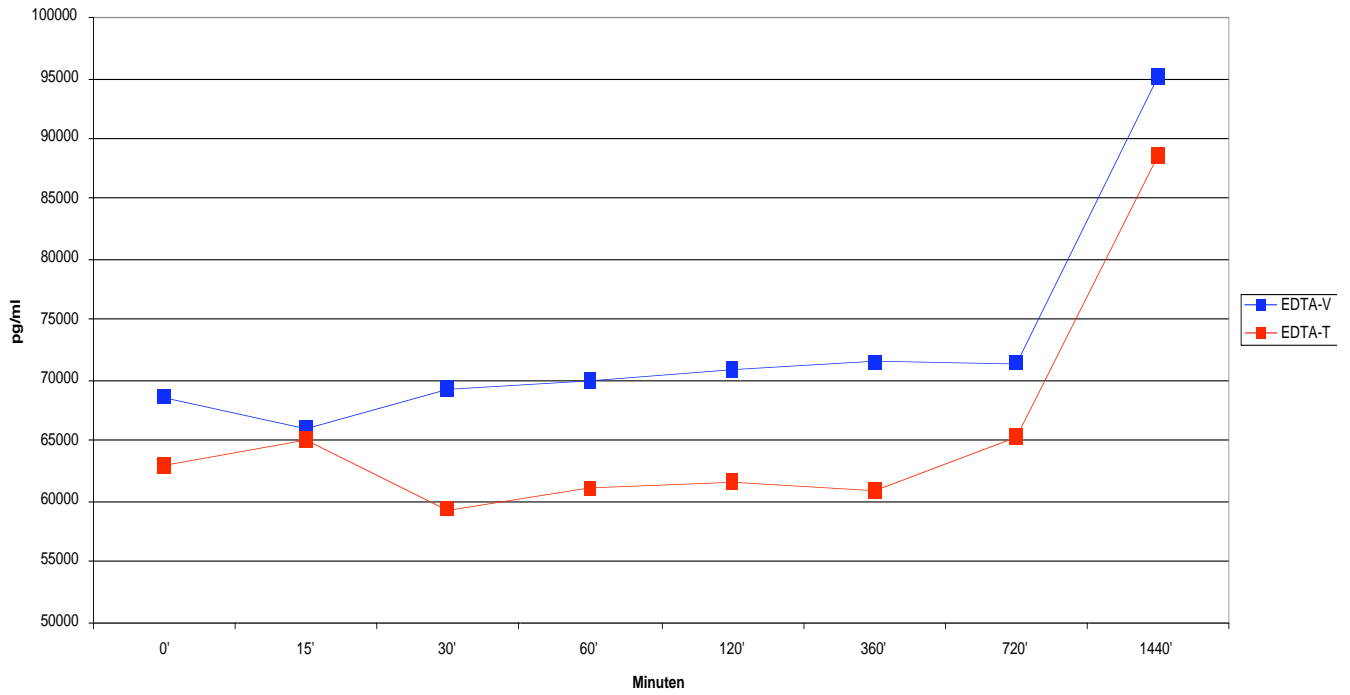
NTproBNP-Diagramm8



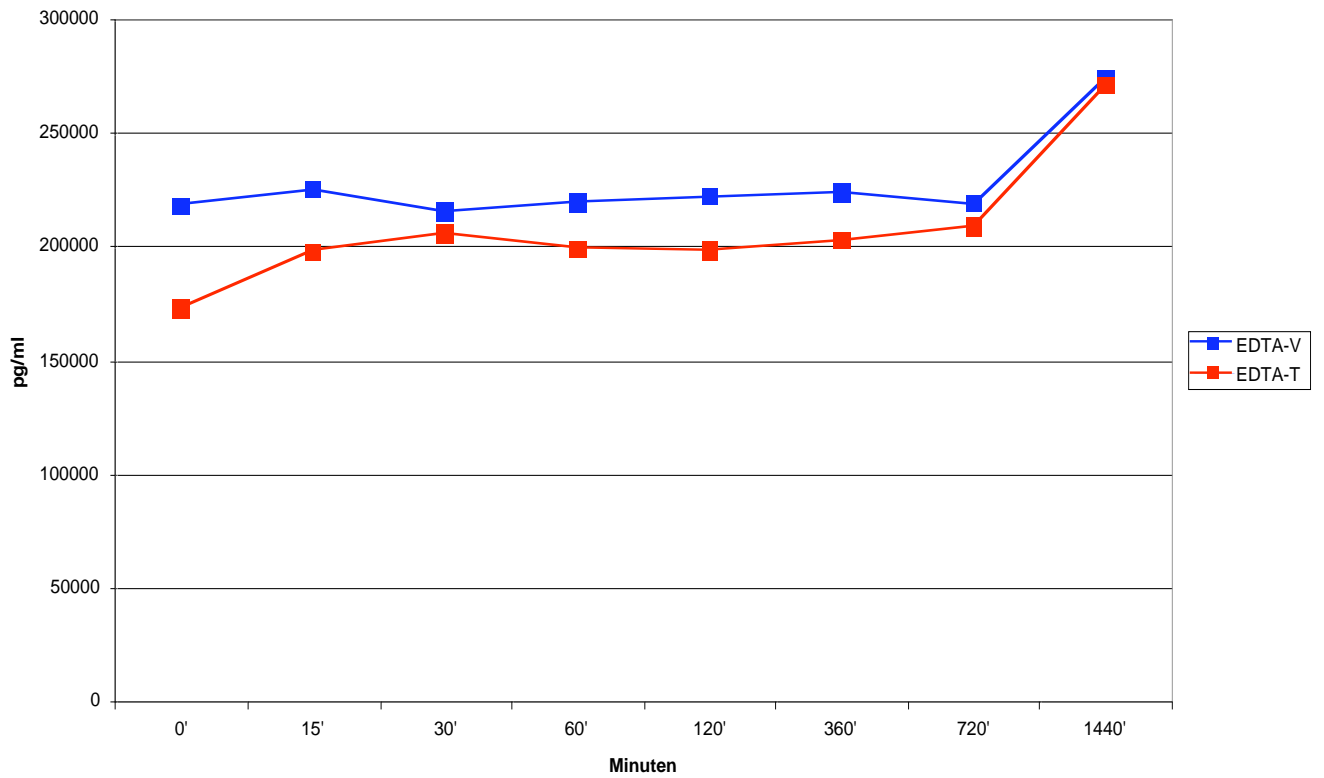
NTproBNP-Diagramm10



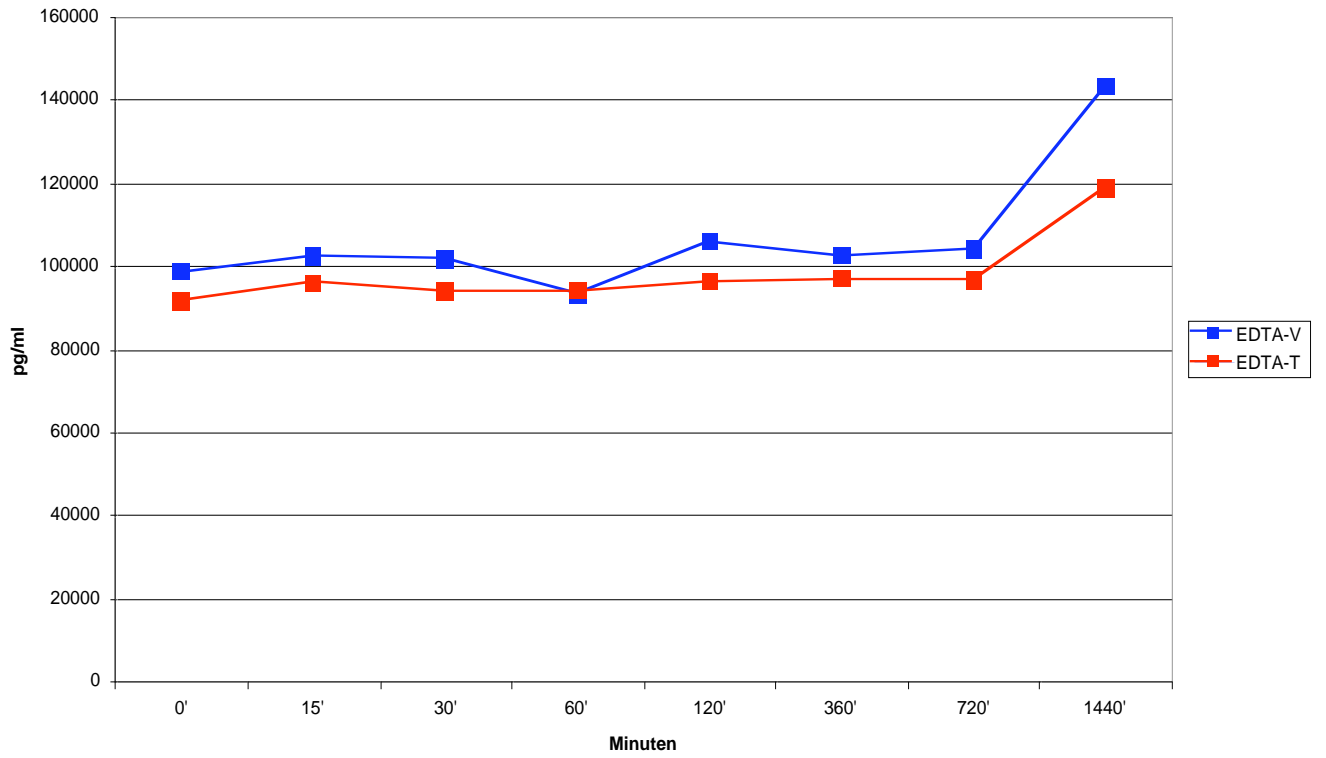
NTproBNP-Diagramm11



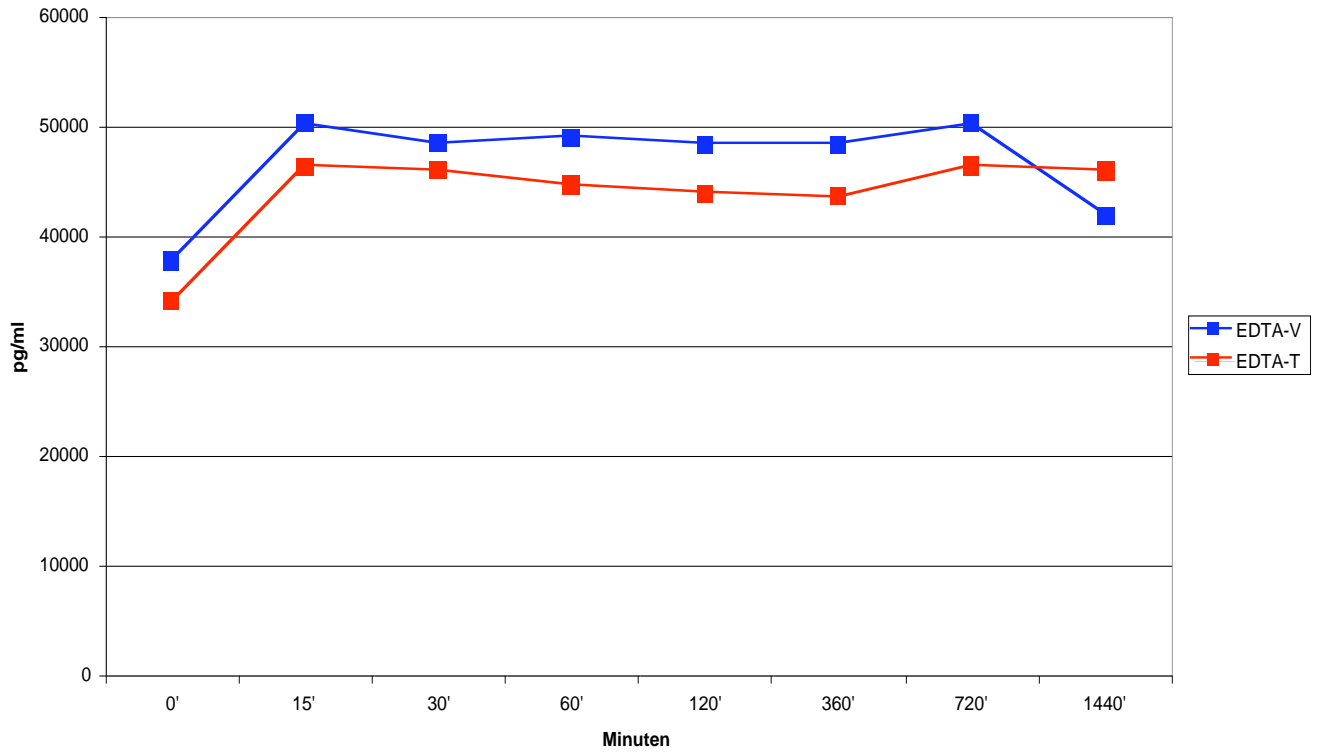
NTproBNP-Diagramm12



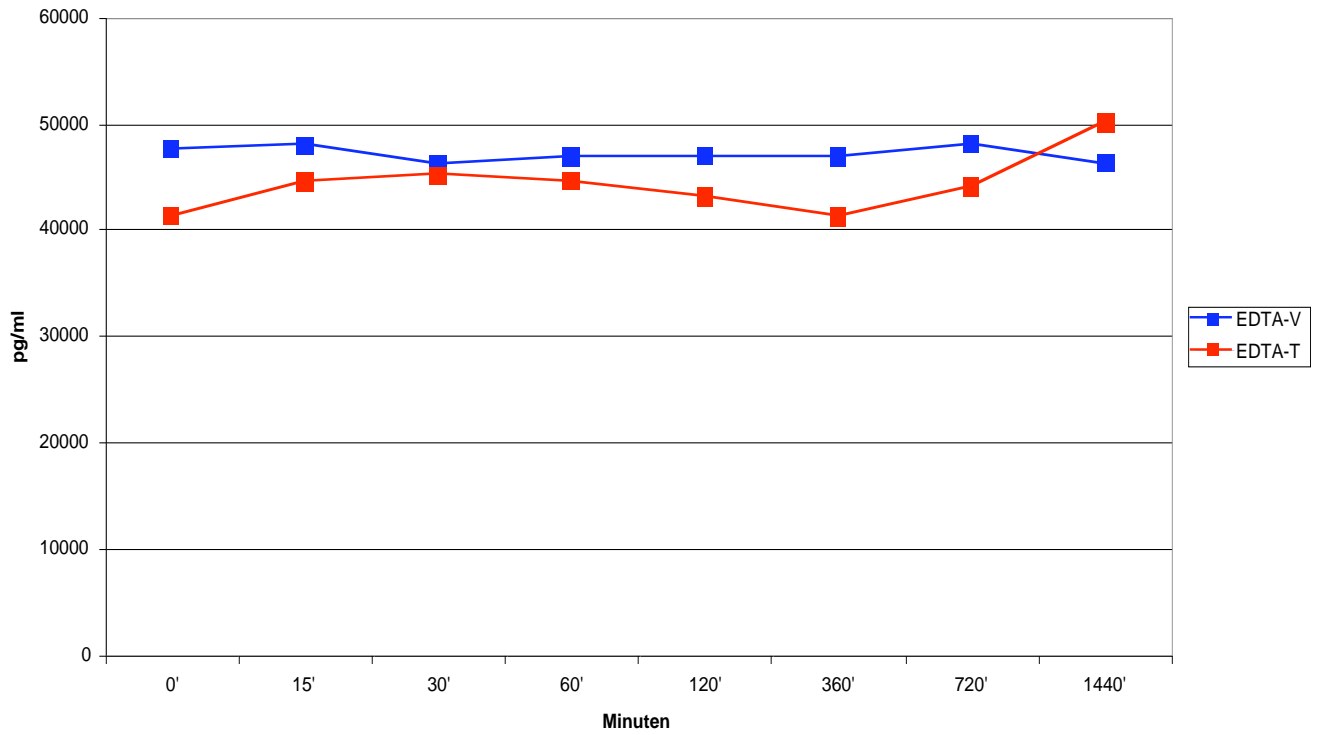
NTproBNP-Diagramm13



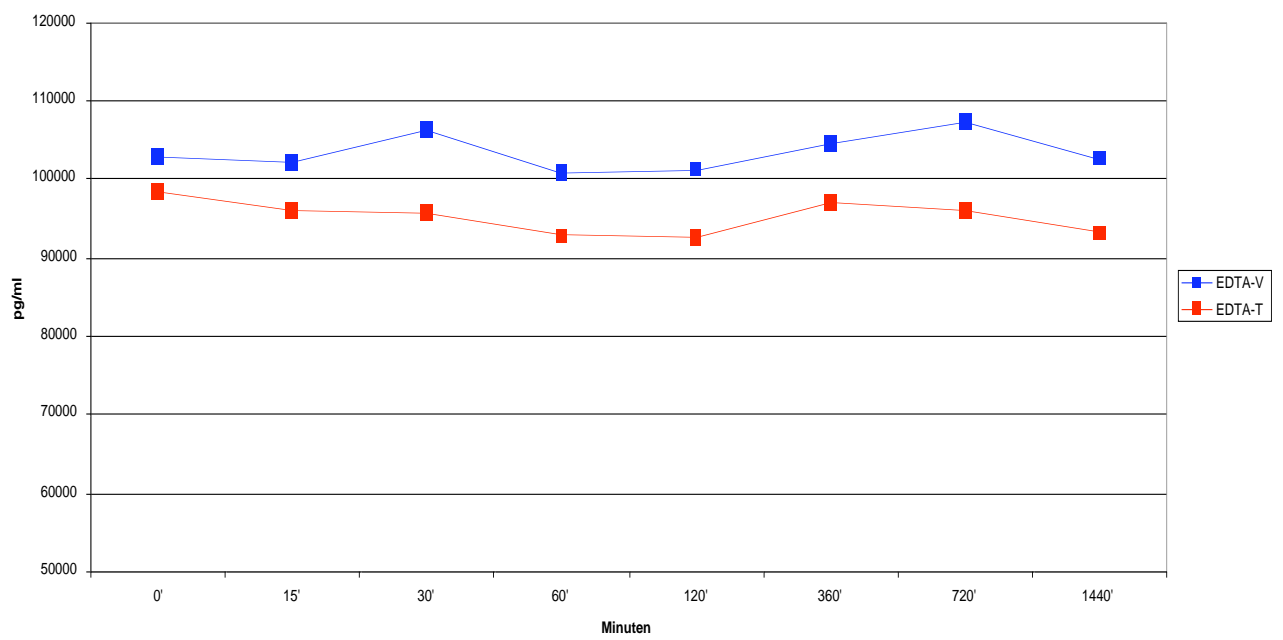
NTproBNP-Diagramm14



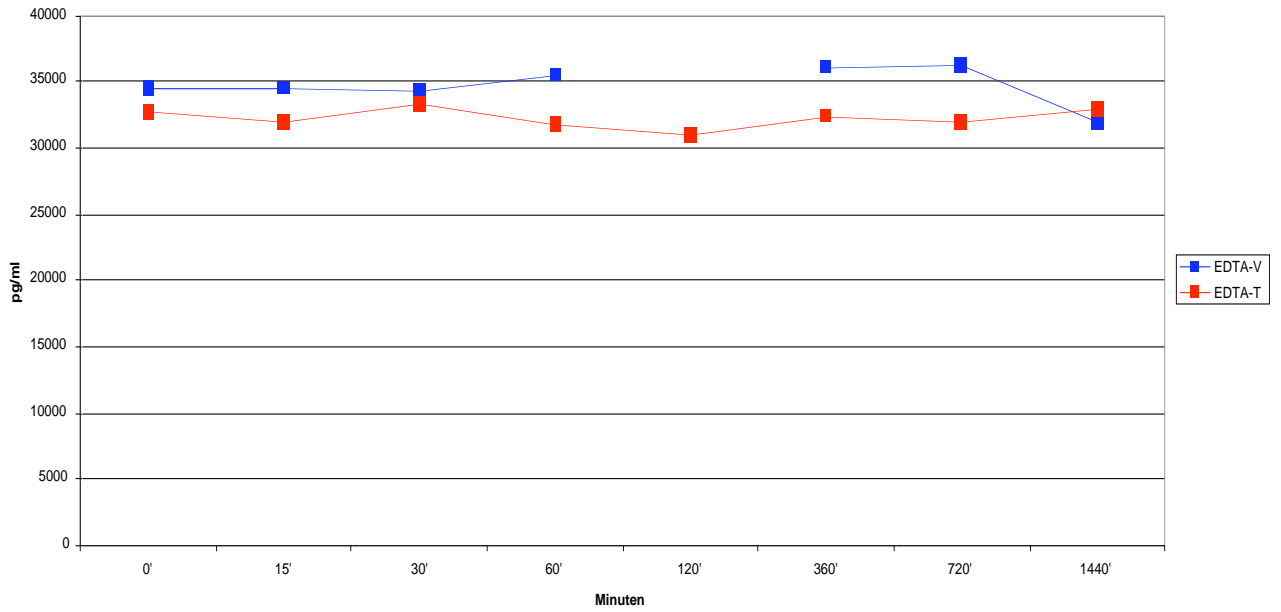
NTproBNP-Diagramm15



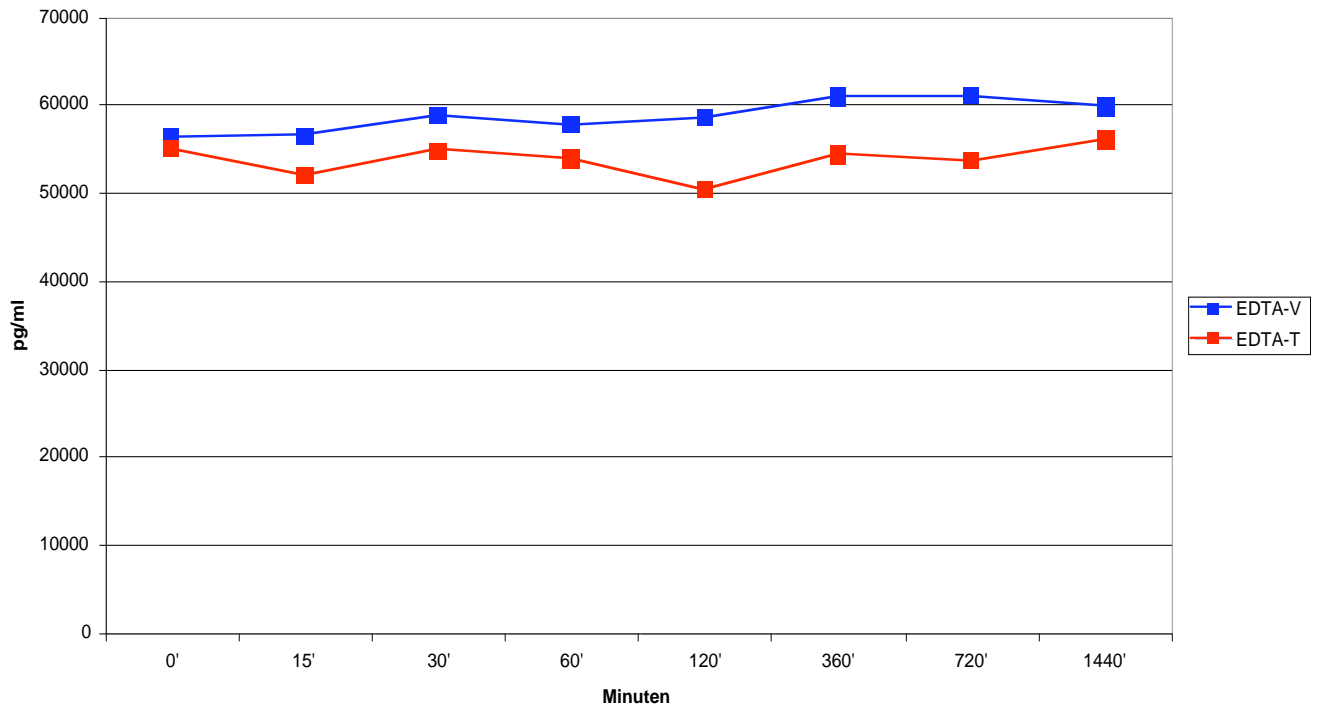
NTproBNP-Diagramm16



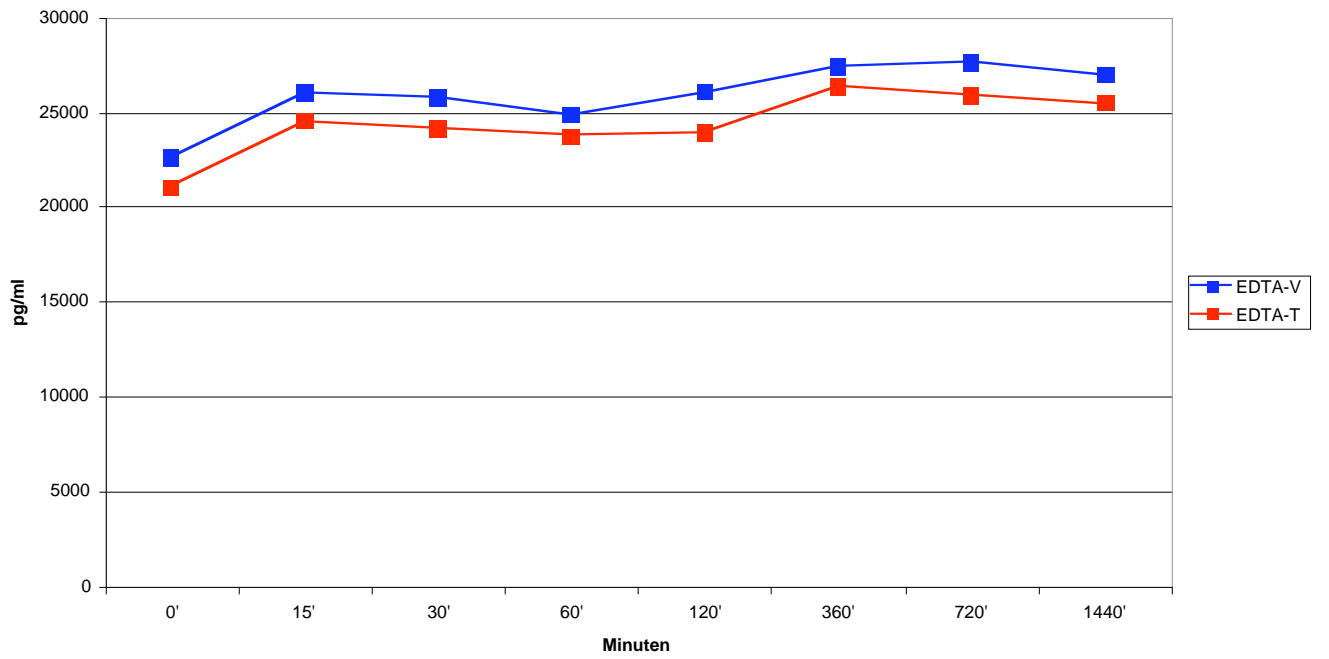
NTproBNP-Diagramm17



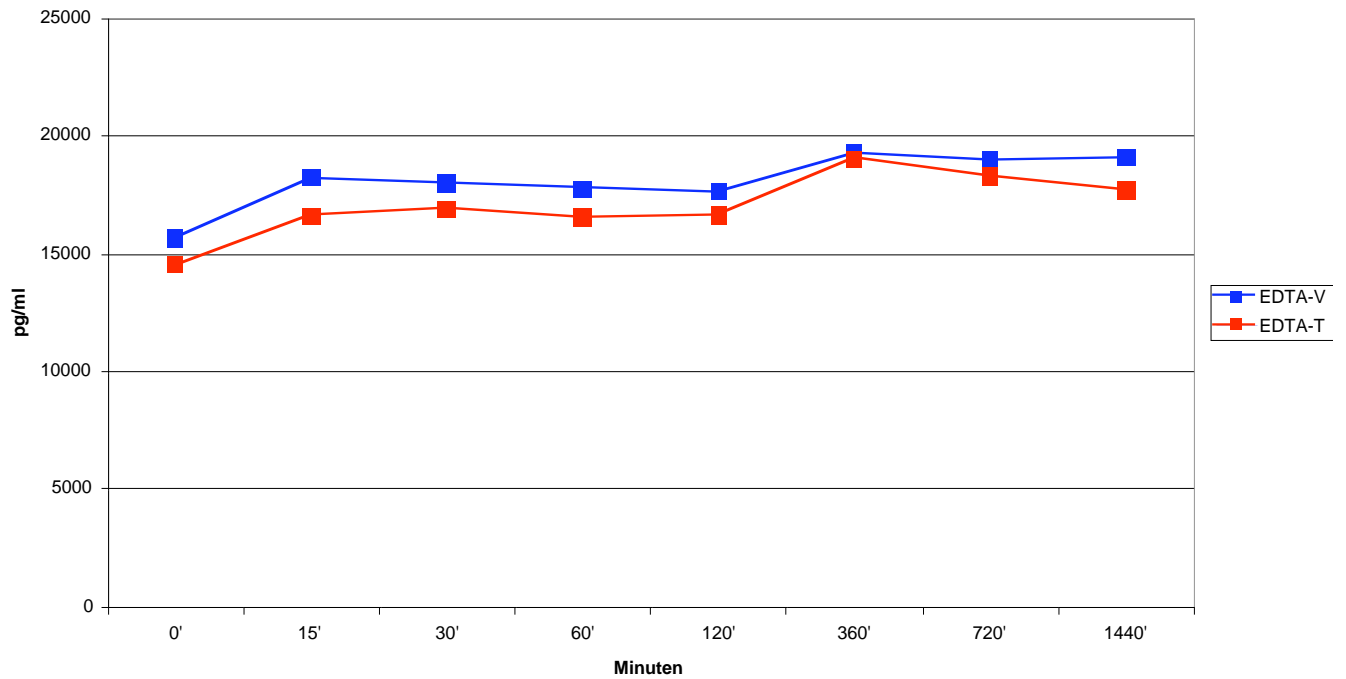
NTproBNP-Diagramm18



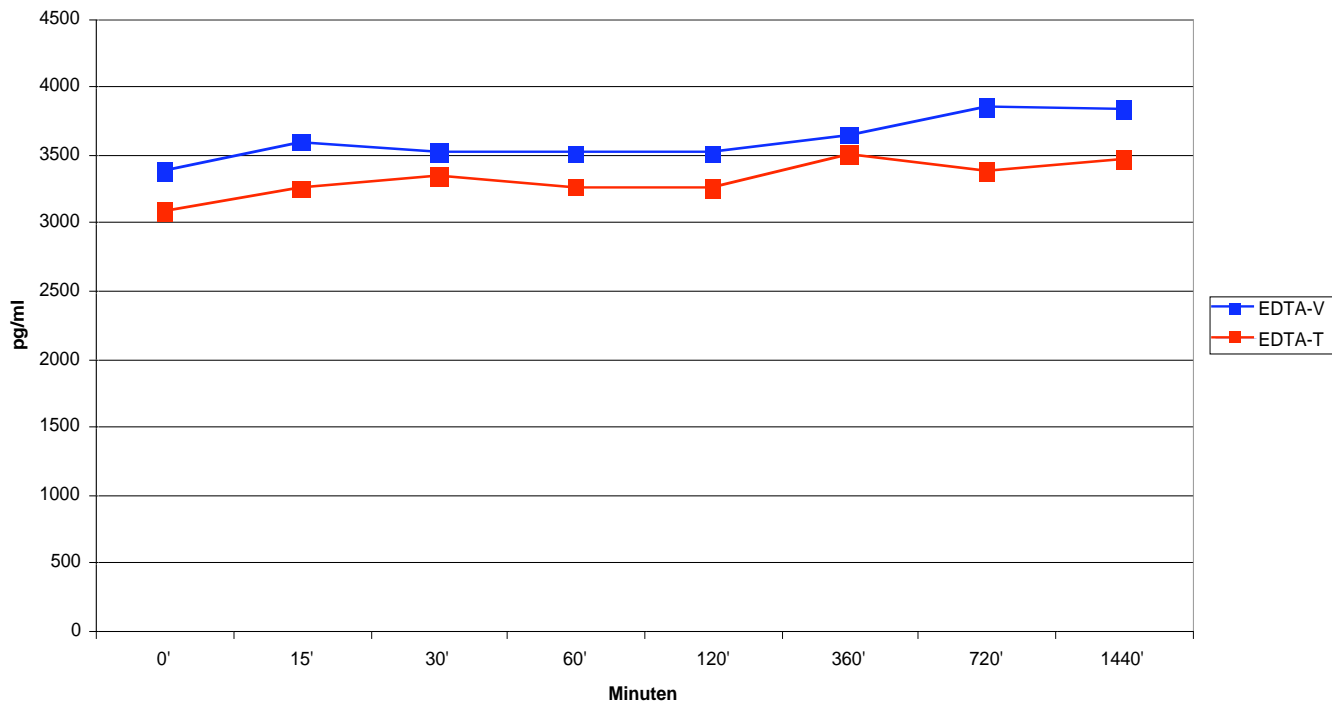
NTproBNP-Diagramm19



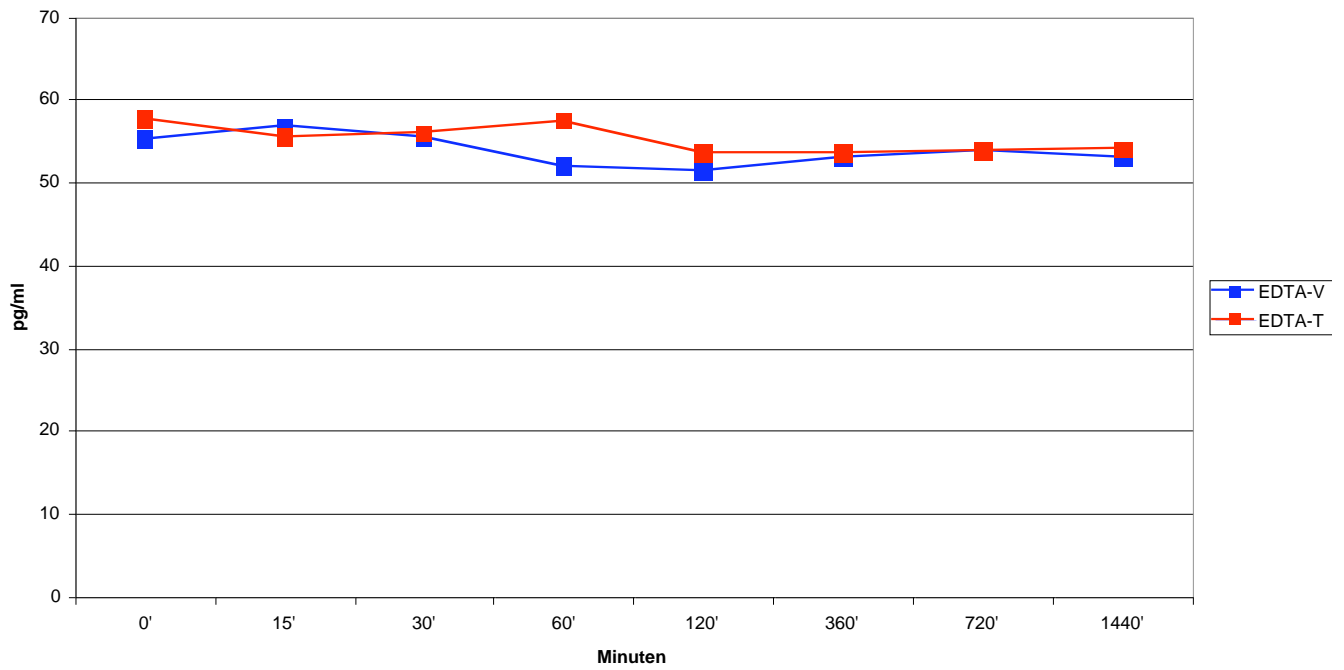
NTproBNP-Diagramm20



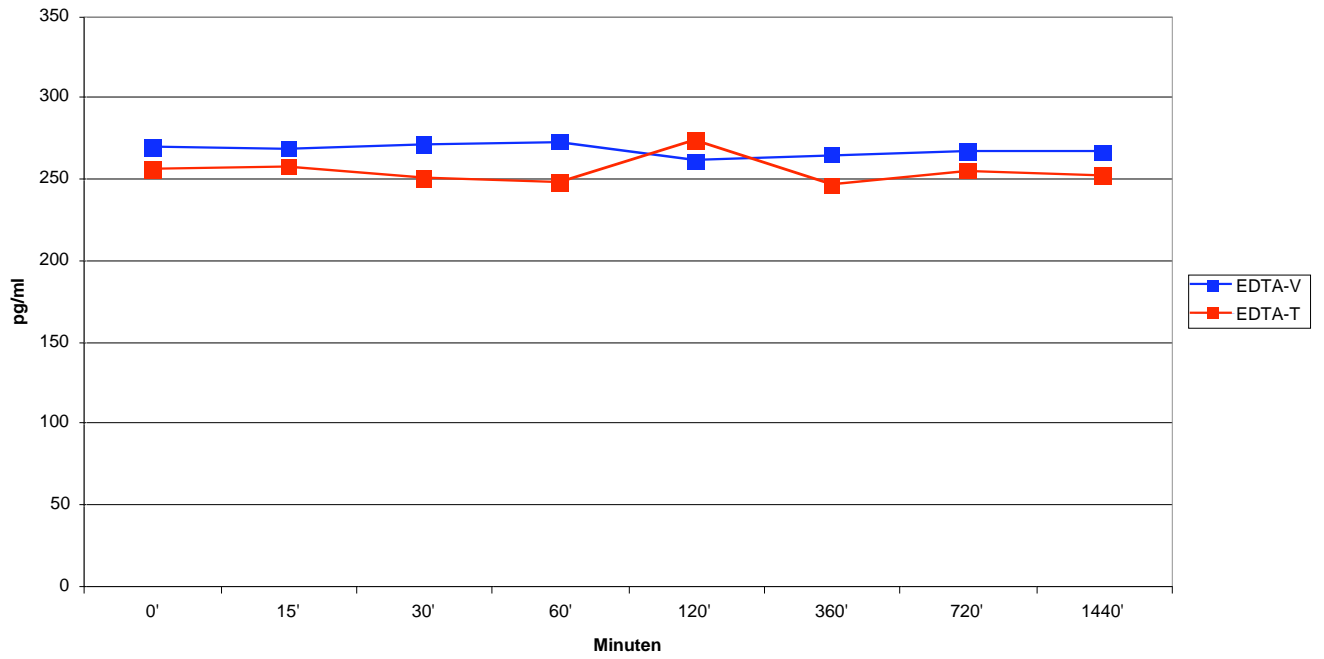
NTproBNP-Diagramm21



NTproBNP-Diagramm22



NTproBNP-Diagramm23



NTproBNP-Diagramm24

