

Zeitliche Entwicklung von Hypoxie-Markern bei brachycephalen und mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung

D. A. Koch¹, J. Wenk², S. Michel³

¹Daniel Koch Kleintierchirurgie AG, Diessenhofen, Schweiz; ² Kleintierpraxis am See, Murten, Schweiz;

³ Empa, Eidg. Materialprüfungs- und Forschungsanstalt, Dübendorf, Schweiz

Zusammenfassung

Zur Objektivierung der Sauerstoffschuld bei Hunden mit dem brachycephalen oberen Atemwegssyndrom wurden 8 mesocephale an 4 Testtagen und 8 brachycephale Hunde an einem Testtag einem kurzen Lauftest unterzogen. Es wurden Blutproben vor und unmittelbar nach der Belastung sowie nach 2 und nach 4 Stunden entnommen, um die zelluläre Sauerstoffversorgung zu beurteilen. Dafür wurden zwei verfügbare Hypoxiemarker, Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) und Erythropoetin (EPO), gemessen. Die Überprüfung der Wiederholbarkeit der Messungen erfolgte an den mesocephalen Hunden. Dabei zeigte sich, dass die Wiederholbarkeit der VEGF-Messung betreffend den 4 Messtagen gegeben ist. Bei der EPO-Messung ist die Wiederholbarkeit nicht gegeben. Die VEGF-Basalwerte der meso- und brachycephalen Hunde unterschieden sich nicht ($7,6 \pm 4,4$ pg/ml resp. $6,9 \pm 4,0$ pg/ml). Die Messung 4 Stunden nach dem Lauftest zeigte signifikante Unterschiede. Der VEGF-Wert stieg bei den mesocephalen Hunden nur um 42 % auf $10,8 \pm 4,7$ pg/ml, während dieser bei den brachycephalen Hunden auf $22,1 \pm 15,3$ pg/ml anstieg, was einer Erhöhung um 220 % entspricht. Die EPO-Messungen zeigten bei allen Blutentnahmezeiten einen signifikanten Unterschied zwischen den mesocephalen und den brachycephalen Hunden; so ist schon der Basalwert bei den mesocephalen Hunden rund 3 mal höher als bei den brachycephalen Hunden ($30,1 \pm 22,6$ mU/ml resp. $11,4 \pm 3,5$ mU/ml). Der Unterschied ist jedoch wegen der grossen Streuung bei den mesocephalen Hunden nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Unterschied zum VEGF-Wert veränderte sich der EPO-Wert im Verlauf der Messzeit nicht. Die Untersuchung zeigt, dass die vorgestellte Methode zusammen mit dem VEGF-Wert zu wissenschaftlichen und züchterischen Zwecken eingesetzt werden kann.

Schlüsselwörter: Hund, Blutuntersuchung, Brachycephalie, Sauerstoffschuld, Testverfahren, VEGF

Temporal development of hypoxia markers in brachycephalic and mesocephalic dogs after short physical exercise

To objectify the oxygen debt in dogs with brachycephalic upper respiratory syndrome, eight mesocephalic dogs were subjected to a short running test on four test days and eight brachycephalic dogs on one test day. Blood samples were taken before and immediately after exercise and after 2 and 4 hours to assess cellular oxygenation. For this purpose, two available hypoxia markers, vascular endothelial growth factor (VEGF) and erythropoietin (EPO), were measured. The repeatability of the measurements was checked in the mesocephalic dogs. While VEGF measurement was repeatable over the 4 days of measurement, the EPO measurement was not. The VEGF basal values of the mesocephalic and brachycephalic dogs did not differ (7.6 ± 4.4 pg/ml and 6.9 ± 4.0 pg/ml, respectively). The measurement 4 hours after the running test showed significant differences. The VEGF value in the mesocephalic dogs increased by 42 % to 10.8 ± 4.7 pg/ml, while in the brachycephalic dogs it increased by 220 % to 22.1 ± 15.3 pg/ml. The EPO measurements showed a significant difference between the mesocephalic and brachycephalic dogs at all blood collection times; The basal value in mesocephalic dogs was approx. three times higher than in brachycephalic dogs (30.1 ± 22.6 mU/ml or 11.4 ± 3.5 mU/ml). However, the difference was not significant due to the large scatter in the mesocephalic dogs ($p > 0.05$). In contrast to the VEGF value, the EPO value did not change over the measurement period. The study shows that the presented method can be used together with the VEGF value for scientific and breeding purposes.

Keywords: Dog, blood test, brachycephaly, oxygen debt, testing procedure, VEGF

<https://doi.org/10.17236/sat00448>

Eingereicht: 08.06.2024
Angenommen: 13.01.2025

Zeitliche Entwicklung
von Hypoxie-Markern
bei brachycephalen und
mesocephalen Hunden
nach kurzer physischer
Belastung

D. A. Koch, J. Wenk,
S. Michel

Einführung

Brachycephale Hunde tragen das Risiko, das brachycephale obere Atemwegssyndrom (BOAS) zu entwickeln.²⁵ Dieses wird durch enge Naseneingänge, überlange und verdickte Gaumensegel, evertierte Larynxtaschen, aberrante Conchen und weitere Weichteilprotrusionen in den oberen Atemwegen charakterisiert.^{2,7,8,10,14,23,24,33} Damit sich die Hunde ausreichend mit Sauerstoff versorgen und die Thermoregulation aufrecht halten können, erzeugen sie durch die Atemmuskulatur einen stark negativen inspiratorischen Atemdruck.¹⁵ Auf diese Weise wird ein Teufelskreis ausgelöst, welcher die bereits einengenden Weichteile zusätzlich in die oberen Atemwege einsaugt.¹ Das BOAS führt schlussendlich zu reduzierter pulmonaler Belüftung und reduzierten arteriellen Sauerstoffpartialdrücken.^{29,30} Die Hypoxie und die eingeschränkte Thermoregulation reduzieren die körperliche Aktivität der Hunde, respektive regen sie zu Kompensationsvorgängen wie angestrenzter Atmung oder Hecheln an.

Zur Beurteilung der Sauerstoffversorgung von brachycephalen Hunden, zur Prüfung des Erfolgs von therapeutischen chirurgischen Interventionen, zu Diensten der Zuchtverantwortlichen und zur objektiven Einschätzung von Tierenschutz-relevanten Fragestellungen wäre eine quantitative Bestimmung der Hypoxie ein willkommenes Hilfsmittel. Blutgasanalysen könnten diese Werte liefern, setzen aber eine arterielle Blutentnahme und eine rasche Verarbeitung voraus. Durch Pulsoxymetrie oder Nahfeldspektroskopie kann die Blutgassättigung nicht-invasiv im arteriellen Blut oder Gewebe bestimmt werden. Beide Techniken verlangen aber die Ruhigstellung der Zunge oder einer Gliedmasse, was bei wachen brachycephalen Hunden kaum durchführbar ist.³¹ Die Ganzkörperplethysmographie ist eine Methode, die Atemwegeinschränkungen zu objektivieren und trägt viel Potenzial.¹⁷ Dafür müssen allerdings ein aufwändiges Gerät und die Expertise zur Verfügung stehen.

Als Methode zum breiten Einsatz stehen Marker für die indirekte Messung einer Hypoxie zur Verfügung. Gewebhypoxie löst innert weniger Minuten eine kurzfristig aktive Substanz aus, den Hypoxia-induced-factor 1-alpha (HIF 1- α).¹³ HIF 1- α wird aber innerhalb von 4-8 Minuten abgebaut und wäre somit kurz nach Erreichen eines normoxischen Zustandes kaum mehr nachweisbar. Allerdings bindet HIF 1- α an den Zellkern und induziert die Expression verschiedener anderer Enzyme, unter anderem Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF), Erythropoetin (EPO), Transferrin und Endothelin. VEGF sorgt für eine verstärkte Teilung der Endothelzellen und damit zur Bildung von Gefäßen, was auch bei der Embryogenese, Wundheilung und beim Tumorwachstum nachgewiesen wurde. EPO wird vornehmlich in der Niere gebildet, fördert die Erythropoese im Knochenmark und beschleunigt das Erythrozytenwachstum. Alle diese Faktoren zusammen stehen

im Dienst der Normalisierung des hypoxischen Gewebezustandes.^{3,6,32}

Bei Hunden mit dem BOAS könnte nun erwartet werden, dass die durch das Syndrom ausgelöste Sauerstoffschuld die oben beschriebene Kaskade auslöst. Für den Nachweis von VEGF und EPO – nicht aber für Transferrin oder Endothelin – stehen standardisierte Nachweismethoden zur Verfügung, womit eine Methode zur Objektivierung des BOAS und folglich ein Instrument zur Zuchtkontrolle bestehen könnte.

Das Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich der Ruhe- und belastungsindizierten Werte bei meso- und brachycephalen Hunden. Zusätzlich soll die Wiederholbarkeit der Messungen überprüft werden. Unsere Hypothesen lauteten:

(1) Die vorgestellte Messmethodik ist wiederholbar, (2) die Basalwerte von VEGF und EPO sind bei brachy- höher als bei mesocephalen Hunden und (3) VEGF und EPO steigen nach kurzer physischer Belastung bei brachy- stärker an als bei mesocephalen Hunden.

Material und Methodik

Patientengut

Zur Durchführung der Versuche lag eine Tierversuchsbewilligung (Tierversuchsbewilligung des Veterinäramtes des Kantons Zürich 44/2003) vor. Die Gruppe der phänotypisch mesocephalen (MC) Hunde bestand aus 8 Beagles mit einem Gewicht von 10.0 bis 16.7 kg (Mittelwert = 14.28 kg) im Alter von 8.8 bis 9.5 Jahren (Mittelwert = 8.9 Jahre). Sie wurden nach einem klinischem Untersuchungsgang als gesund beurteilt. In der Gruppe der phänotypisch brachycephalen (BC) Hunde waren 7 Möpse und 1 Griffon mit einem Gewicht von 6 bis 11 kg (Mittelwert = 8.0 kg) und einem Alter von 1.5 bis 13.7 Jahren (Mittelwert = 7.9 Jahre) vertreten. Sie gehörten derselben Besitzerin, wiesen jeweils ein stenotisches inspiratorisches Atemgeräusch auf und wurden sonst als gesund beurteilt. Keiner der Hunde beider Gruppen wurde zuvor operativ an den Atemwegen behandelt.

Testverfahren

Das Testprotokoll für alle Hunde und alle Testtage bestand aus den folgenden Teilen: Nach dem Transport zum ebenen Testgelände der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich wurden die Hunde für eine Stunde in Ruhe gelassen, anschliessend wurde ihnen eine Probe des venösen Blutes aus der V. jugularis entnommen (Basalwert). Im Anschluss daran wurden die Hunde einzeln oder zu zweit zu einem maximalem Trab gezwungen. Dabei sollten sie gerade nicht galoppieren. Diese kurze physische Aktivität dauerte exakt 10 Minuten, wonach sofort, nach 2 Stunden und nach 4

Stunden erneut eine venöse Blutprobe entnommen wurde. Alle Blutproben wurden in einem Serumröhrchen aufgefangen, für 15 Minuten in einem Kühlschrank (4°C) aufbewahrt und dann bei -4°C während 30 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bei -80°C bis zur Probenanalyse aufbewahrt. Diese wurde in der Woche nach der Untersuchung der BC-Hunde durchgeführt.

Die VEGF-Werte wurden mit Hilfe eines herkömmlichen VEGF-ELISA-Testverfahrens (R&D Systems, Minneapolis, USA) erhoben. Jede Probe wurde zweimal analysiert und in pg/ml ausgegeben. Die EPO-Werte wurden durch ein humanes EPO-Radio-Immuno-Assay (DiaSorin, Stillwater, USA) ermittelt, ebenfalls zweimal analysiert und in mU/ml ausgegeben. Die Mittelwerte der Analysen gelangten in die statistische Verarbeitung.

Zur Beurteilung der Wiederholbarkeit der Messverfahren durchliefen die MC-Hunde das Tagesprotokoll an 4 aufeinanderfolgenden Wochenenden. Die BC-Hunde wurden am darauffolgenden Wochenende getestet und mit dem 4. Testtag der MC-Hunde verglichen.

Statistische Methoden

Die Voraussetzungen für die Anwendung der ANOVA wurden geprüft. Dabei konnte die Normalverteilung der Grundgesamtheit mit dem Shapiro-Wilk-Test, der Nachweis von wenigen Ausreißern pro Stichprobe und gleiche Varianz mit einem Mauchly's sphericity test mit einer Greenhouse-Geisser- resp. Huynh-Feldt-Korrektur nachgewiesen werden.²⁰

Die Frage der Wiederholbarkeit der VEGF- resp. der EPO-Messung wurde mittels einer Varianzanalyse (zweifach ANOVA vom Typ III eines gemischten Modells mit wiederholten Messungen¹⁸) und der Analyse der Kontraste (Tukey-Post-Hoc-Test) beantwortet. Dazu wurden alle Messungen mit den MC-Hunden (Messtag 1 bis 4) verwendet. Die Vergleichsuntersuchungen zwischen den MC-Hunden und den BC-Hunden wurde auch mit einer Varianzanalyse (zweifach ANOVA vom Typ III mit wiederholten Messungen mit einer Satterthwaits-Korrektur für den Freiheitsgrad)¹⁸ und der Analyse der Kontraste (Tukey-Post-Hoc-Test) untersucht. Die

Datenanalyse erfolgte mit der Software R (Version 4.1.2). Die Signifikanzgrenze wurde auf 0,05 gesetzt.

Resultate

Wiederholbarkeit der Messungen

Betreffend die VEGF-Messung ergab die Varianzanalyse einen Effekt des Untersuchungstages ($p < 0,05$) und des Blutentnahmezeitpunktes ($p < 0,0001$) sowie einen signifikanten Interaktionseffekt ($p < 0,01$). Dies bedeutet, dass je nach Untersuchungstag der Effekt der Blutentnahmezeit nicht gleich ausgeprägt war ($p < 0,01$). Die Basalwerte der verschiedenen Untersuchungstage unterschieden sich nicht (alle $p > 0,9$) (Abbildung 1, Tabelle 1 und 2). Damit war die Wiederholbarkeit der VEGF-Messung betreffend dem Untersuchungstag gegeben und die erste Hypothese betreffend der VEGF-Messung konnte angenommen werden.

Zeitliche Entwicklung von Hypoxie-Markern bei brachycephalen und mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung

D. A. Koch, J. Wenk, S. Michel

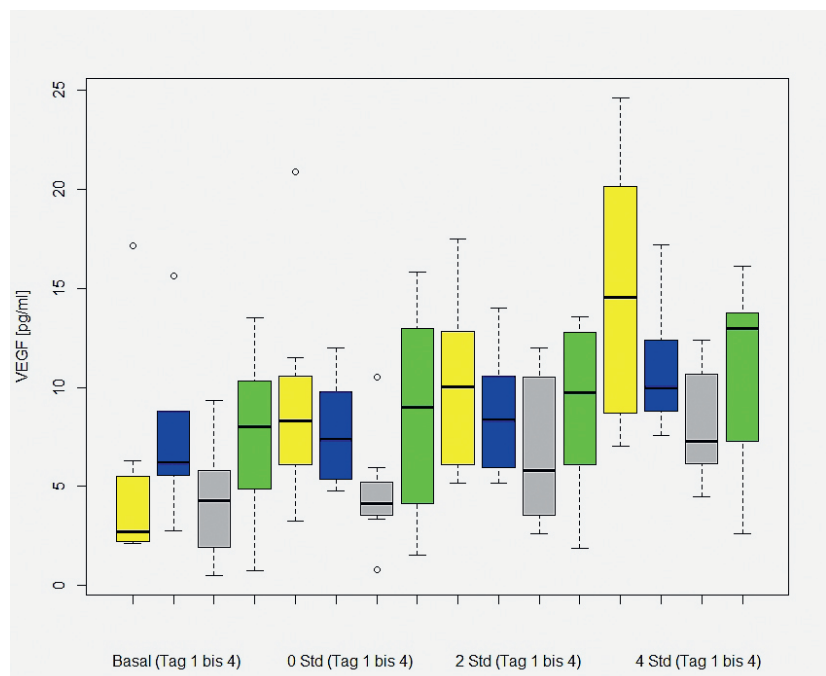


Abbildung 1: Boxplots der Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF)-Werte der mesocephalen Hunde in pg/ml, aufgereiht primär nach Messzeitpunkt und sekundär nach Messtag (Tag 1 = gelb, Tag 2 = blau, Tag 3 = grau, Tag 4 = grün)

Tabelle 1: Zusammenfassung der ANOVA-Resultate der Studie zur Wiederholbarkeit der Messung von Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) und Erythropoetin (EPO) mit brachycephalen (BC) Hunden (sign. = Signifikanzwerte: * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$).

	VEGF		EPO	
	p-Wert	sign.	p-Wert	sign.
Untersuchungstag	0,017	*	0,004	**
Blutentnahmezeit	2,08E-06	***	0,75	
Interaktion Untersuchungstag - Blutentnahmezeit	0,008	**	0,01	**

Zeitliche Entwicklung von Hypoxie-Markern bei brachycephalen und mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung

D. A. Koch, J. Wenk, S. Michel

Für die EPO-Messreihe zeigte die Varianzanalyse einen deutlichen Effekt des Untersuchungstages ($p < 0,01$), jedoch keinen Effekt für die Blutentnahmezeit ($p > 0,05$). Im Weiteren ergab sich ein signifikanter Interaktionseffekt ($p < 0,05$). Die Analyse der Kontraste zeigte, dass die EPO-Werte mit dem Untersuchungstag anstiegen. Sowohl die gemessenen Basalwerte als auch die Werte nach 4 Stunden unterschieden sich am 2., 3. und 4. Untersuchungstag. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant (alle $p > 0,05$). Die Wiederholbarkeit der EPO-Messung betreffend dem Untersuchungstag war damit also nicht gegeben, die erste Hypothese betreffend der EPO-Messung musste abgelehnt werden (Abbildung 2, Tabelle 1 und 2).

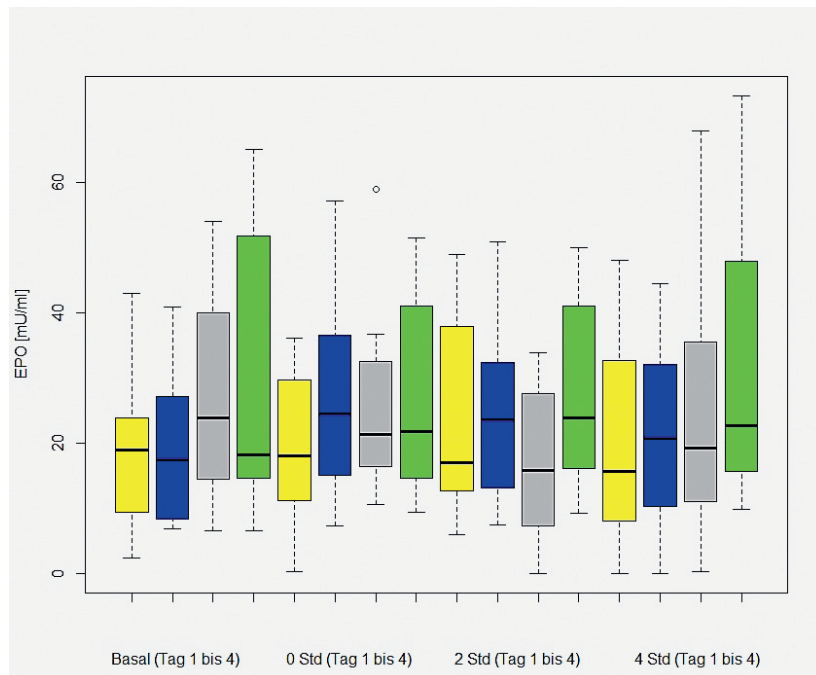


Abbildung 2: Boxplots der Erythropoetin (EPO)-Werte der mesocephalen Hunde in mU/ml, aufgereiht primär nach Messzeitpunkt und sekundär nach Messtag (Tag 1 = gelb, Tag 2 = blau, Tag 3 = grau, Tag 4 = grün)

Tabelle 2: Auswahl der post-hoc-Resultate der Studie zur Wiederholbarkeit – Kontraste der Basalwerte und der Werte der Blutentnahme von Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) und Erythropoetin (EPO) nach 4 Std an verschiedenen Untersuchungstagen von mesocephalen (MC) Hunden (sign. = Signifikanzwerte: * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$)

		VEGF		EPO	
		p-Wert	sign.	p-Wert	sign.
Kontraste der Basalwerte					
Basalwert am 1. Tag	Basalwert am 2. Tag	0,961		1,000	
Basalwert am 1. Tag	Basalwert am 3. Tag	1,0		0,551	
Basalwert am 1. Tag	Basalwert am 4. Tag	0,935		0,111	
Kontraste der Werte nach 4 Std					
Werte nach 4 Std am 1. Tag	Werte nach 4 Std am 2. Tag	0,400		1,000	
Werte nach 4 Std am 1. Tag	Werte nach 4 Std am 3. Tag	0,895		0,989	
Werte nach 4 Std am 1. Tag	Werte nach 4 Std am 4. Tag	1,000		0,075	

Die Aussentemperaturen für die 4 Messtage der Wiederholbarkeitsstudie betrugen 12°, 15°, 13° und 18°C.

Vergleich der MC- und BC-Hunde

Für die VEGF-Messungen nach dem Lauftest ergab die Varianzanalyse eine starke Abhängigkeit von der Blutentnahmezeit ($p < 0,01$). Ein Effekt der Kopfform auf die Basalwerte war nicht ersichtlich. Die zweite Hypothese (erhöhter Basalwert bei BC-Hunden) wurde deswegen für VEGF verworfen. Die Analyse der Kontraste zeigte, dass je später man mass, umso deutlicher unterschieden sich die VEGF-Werte. Diese Zunahme war nur bei der Gruppe der BC-Hunde signifikant ($p = 0,43$, $p < 0,05$, $p < 0,0001$), nicht jedoch bei der Gruppe der MC-Hunde ($p = 1,000$, $p = 0,999$, $p = 0,886$). Die dritte Hypothese (erhöhter Anstieg bei BC-Hunden) konnte für die VEGF-Messung angenommen werden (Abbildung 3, Tabelle 3 und 4).

Für die EPO-Messungen zeigte die Varianzanalyse einen signifikanten Effekt der Kopfform ($p < 0,05$), aber keinen Effekt der Blutentnahmezeit ($p > 0,05$). Die Analyse der Kontraste ergab für die beiden Hunde-Gruppen für die Basalwerte keinen Unterschied ($p > 0,05$). Dies galt auch für die Messungen nach dem Lauftest (alle $p > 0,9$). Die zweite Hypothese und die dritte Hypothese konnten daher für die EPO-Messung nicht angenommen werden (Abbildung 4, Tabelle 3 und 4).

Die Aussentemperatur am Messtag der BC-Hunde betrug 18°C.

Diskussion

Die Untersuchung der Wiederholbarkeit der VEGF-Messung zeigte, dass bei den MC-Hunden an den 4 Testtagen sowohl ein vergleichbarer Basalwert als auch ein vergleichbarer Wert nach 4 Stunden erreicht wurde. Schon bei den MC-Hunden zeigte sich ein Trend zu höheren VEGF-Werten, je später man nach der Belastung die Blutprobe entnimmt. Damit verhielt sich unsere VEGF-Testreihe ähnlich wie in einer Studie beim Menschen²⁸ und gegenüber dem EPO grundsätzlich unterschiedlich. Die VEGF-Versuchsanordnung konnte also zum Vergleich mit den BC-Hunden eingesetzt werden.

In der vorliegenden Studie konnte mit VEGF ein vielversprechender Blutwert gefunden werden, welcher in beiden Gruppen nach einer 10 Minuten dauernden Belastung anstieg. In der Gruppe der MC-Hunde stieg VEGF von einem Mittelwert von 7,6 pg/ml um 42 % auf einen Wert nach 4 Stunden von 10,8 pg/ml, während in der Gruppe der BC-Hunde die VEGF-Werte von einem Mittelwert von 6,9 pg/ml auf 22,1 pg/ml signifikant anstieg. Dieser rund 220-%ige Anstieg ist die wesentlichste Erkenntnis des Vergleichs zwischen den Kopfformen. Die Unterschiede waren zwar schon unmittelbar nach der Aktivität zu erkennen, aber als zuverlässige Indikatoranzeige noch nicht genügend sensitiv. Je länger man mit der VEGF-Messung zuwartete, desto deutlicher kam der Unterschied zwischen der Gruppe der BC-Hunde und der Gruppe der MC-Hunde zum Vorschein.

VEGF ist ein Signalmolekül, welches ursprünglich für die Quantifizierung des Tumorwachstums verwendet wurde. Es ist ein sensibler Parameter für die Angiogenese in Neoplasien, allerdings ist VEGF nicht spezifisch nur bei Tumoren erhöht, sondern auch bei physiologisch ausgelöster Blutgefäßbildung, wie zum Beispiel als Folge eines körperlichen Trainings.¹¹ Wie schnell VEGF darauf ausgeschüttet wird, ist unklar. Forschergruppen berichten beim Menschen von einem reduzierten,⁵ einem unveränderten¹² oder einem erhöhten Wert,²⁸ jeweils rund 2 Stunden nach Lauf- oder Radfahrtraining. Eine Erklärung für die rasche Verfügbarkeit

und Messung von VEGF soll dessen Lagerung in Vesikeln im interstitiellen Muskelgewebe und unmittelbare Entleerung in die Blutgefäße sein.¹² Eine VEGF-Synthese ist also bei akutem Bedarf nicht notwendig. Die Studie zur Haltung von Hunden in verschiedenen Höhenlagen⁶ zeigte im Übrigen auch eine Erhöhung des VEGF-Wertes von durchschnittlich 0,1 pg/ml (700-900 m über Meer) auf 6,3 pg/ml (2300 m über Meer). Die absoluten Werte sind tiefer, die Unterschiede hingegen deutlicher als in unserer Studie, wurden aber jeweils nach wochenlangem Angewöhnen und im Ruhezustand entnommen. Es ist deswegen anzunehmen, dass unsere Studienwerte vornehmlich durch die Akutphasenentleerung von VEGF dominiert wurden. Abweichend zu unseren Ergebnissen wies eine Forschergruppe bei der Untersuchung der Pathophysiologie des BOAS bei Englischen

Zeitliche Entwicklung von Hypoxie-Markern bei brachycephalen und mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung

D. A. Koch, J. Wenk, S. Michel

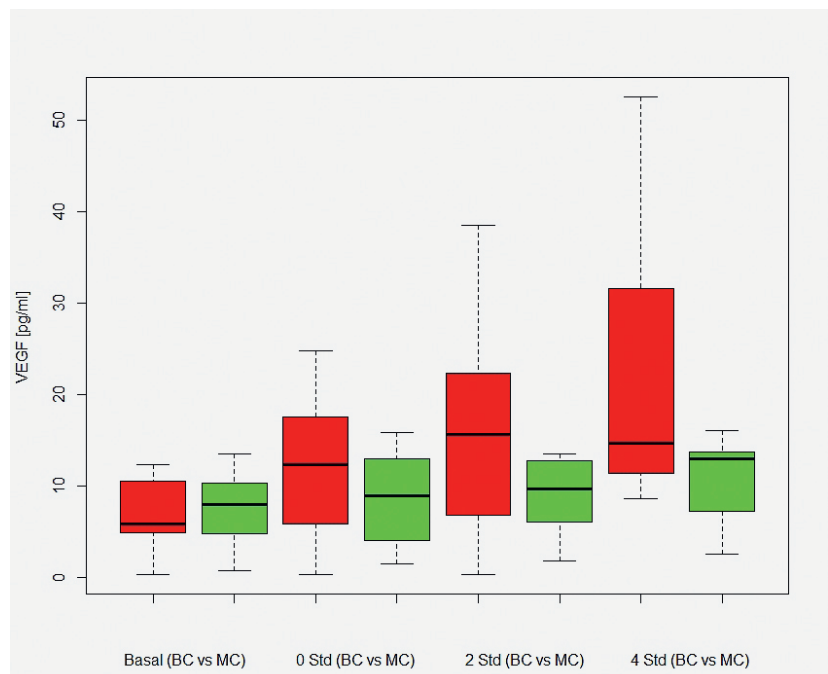


Abbildung 3: Boxplots der Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF)-Werte in pg/ml der brachycephalen Hunde (BC, rot) und der mesocephalen Hunde (MC, grün) vor (basal), unmittelbar nach Lauftest (0 Std) und nach 2 Stunden (2 Std) resp. 4 Stunden (4 Std).

Tabelle 3: Zusammenfassung der ANOVA-Resultate der Studie zum Vergleich zwischen mesocephalen (MC) und brachycephalen (BC) Hunden (sign. = Signifikanzwerte: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001)

	VEGF		EPO	
	p-Wert	sign.	p-Wert	sign.
Kopfform	0,297		0,027	*
Blutentnahmezeit	0,003	**	0,260	
Interaktion Kopfform - Blutentnahmezeit	0,031	*	0,923	

Zeitliche Entwicklung von Hypoxie-Markern bei brachycephalen und mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung

D. A. Koch, J. Wenk, S. Michel

Bulldoggen im Vergleich zu normalnasigen Hunden erhöhte Basalwerte von VEGF ohne physische Stimulierung nach.²² Es handelte sich hierbei allerdings um einen spezifischeren Wert (VEGF-A). Dieser löst bei brachycephalen Hunden die Angiogenese des dauerhaft vorhandenen Entzündungsprozesses aus. Der Schweregrad des BOAS liess sich aber nicht mit dem VEGF-Wert korrelieren, was einer anderen Forschergruppe mit dem Nachweis von Tumor-necrosis-factor und verschiedenen Interleukinen gelang.²⁷ Es wäre interessant zu untersuchen, wie diese Entzündungsmediatoren kurzfristig auf eine Belastungsprobe reagieren würden.

Der VEGF-Anstieg reiht sich ein in eine Serie von Methoden, welche zwar sensitiv, aber nicht spezifisch sind. Das heisst, dass ein Anstieg des VEGF-Wertes einfach anzeigt, dass der Patient eine Sauerstoffschuld eingeht, diese aber nicht zwangsweise den oberen Atemwegen zugeordnet werden kann. So verhalten sich auch zum Beispiel einfache Lauftests, die Ganzkörperplethysmographie oder Untersuchungen zu Schlafstörungen bei brachycephalen Hunden.^{17,21} Die Spezifität ist also gering. Andererseits darf man angesichts der augenfälligen Unterschiede im Phänotyp der beiden untersuchten Gruppen die Schlussfolgerung ziehen, dass der VEGF-Anstieg bei Abwesenheit anderer Kreislaufprobleme der Kopfform geschuldet ist. Für die klinische Umsetzung bedeutet dies, dass die zu untersuchenden Hunde frei von Herz- oder anderen Kreislaufbeschwerden sein sollten, damit der hier vorgestellte Test seinen Zweck erfüllt.

Auf der Suche nach nachweisbaren Parametern zur Objektivierung einer möglichen Sauerstoffschuld bei brachycephalen Hunden mussten wir feststellen, dass das EPO nicht geeignet war. Die Basalwerte der Gruppe der MC-Hunde veränderten sich von einer Messwoche zur anderen, die Gruppe der BC-Hunde hatten sogar leicht tiefere Ausgangswerte als die Gruppe der MC-Hunde, wobei diese Unterschiede als nicht signifikant beurteilt wurden ($p = 0,192$). Auch 4 Stunden nach der physischen Aktivität stiegen die Werte in beiden Gruppen nicht an ($p = 0,886$ resp. $0,997$). Dies entsprach nicht den Erwartungen eines für die Klinik einsetzbaren Indikators für Hypoxie.

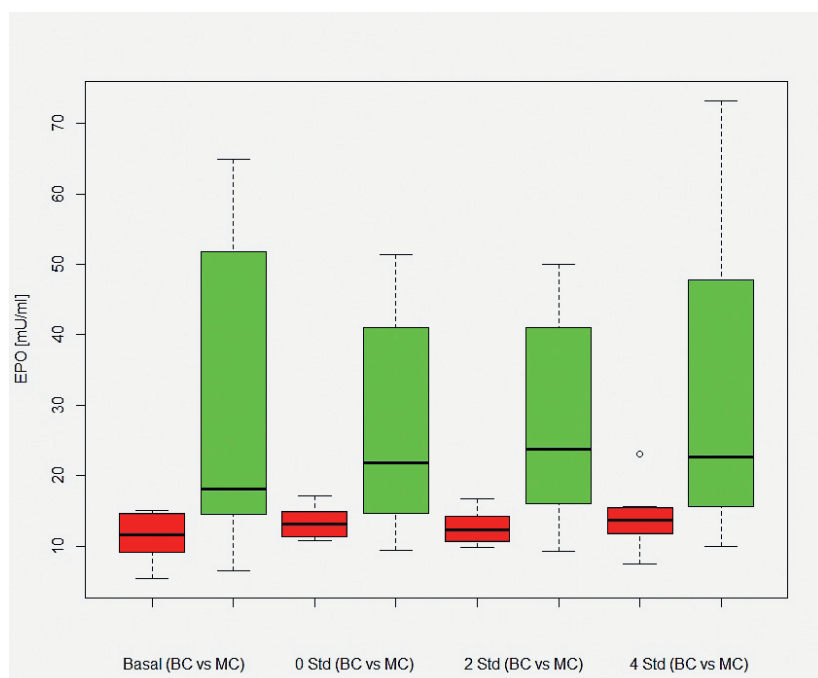


Abbildung 4: Boxplots der Erythropoetin (EPO)-Werte in mU/ml der brachycephalen Hunde (BC, rot) und der mesocephalen Hunde (MC, grün) vor (basal), unmittelbar nach Lauftest (0 Std) und nach 2 Stunden (2 Std) resp. 4 Stunden (4 Std).

Tabelle 4: Auswahl aus den Post-Hoc-Resultaten (Tukey-Test) des Vergleichs von mesocephalen (MC) und brachycephalen (BC) Hunden – Kontraste der Messwerte genommen nach unterschiedlichen Blutentnahmezeiten gegenüber den Basalwerten (sign. = Signifikanzwerte: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001)

		VEGF		EPO	
		p-Wert	sign.	p-Wert	sign.
Basalwert der BC-Hunde	Basalwert der MC-Hunde	1,000		0,192	
Kontraste gegenüber dem Basalwert der BC-Hunde		p-Wert	sign.	p-Wert	sign.
Basalwert der BC-Hunde	Werte nach 0 Std der BC-Hunde	0,432		0,996	
Basalwert der BC-Hunde	Werte nach 2 Std der BC-Hunde	0,013	**	1,000	
Basalwert der BC-Hunde	Werte nach 4 Std der BC-Hunde	<0,0001	***	0,969	
Kontraste gegenüber dem Basalwert der MC-Hunde					
Basalwert der MC-Hunde	Werte nach 0 Std der MC-Hunde	1,000		0,936	
Basalwert der MC-Hunde	Werte nach 2 Std der MC-Hunde	0,999		0,982	
Basalwert der MC-Hunde	Werte nach 4 Std der MC-Hunde	0,886		0,997	

EPO wird als Reaktion auf Hypoxie gebildet und regt die Bildung von Erythrozyten und Retikulozyten an.⁴ EPO wird dabei zumindest beim Menschen als unzuverlässiger Parameter zur Messung des Akutzustandes der Blutbildung und der Niere angesehen. Vielmehr wird EPO nur periodisch bestimmt, um die Fähigkeit der Niere hinsichtlich der Erythropoese zu evaluieren.¹⁶ Die Wirkung von EPO auf die Bildung von humanen Erythrozyten respektive deren Vermehrung wird frühestens nach 7–10 Tagen, in den meisten Fällen erst nach 3 bis 6 Wochen beobachtet.¹⁹ Es ist also nicht erstaunlich, dass das offenbar relativ langsam ausgeschiedene und träge wirkende EPO nicht auf unsere Akutbelastung reagierte. Es zeichnet eher ein mittelfristiges und sehr individuelles Abbild von Belastung und folgendem Sauerstoffbedürfnis ab. In diesem Zusammenhang darf man auch den Trend zum leichten Anstieg der EPO-Werte bei den MC-Hunden stellen. Die Beagle stammten aus einer Versuchsabteilung der Industrie und hatten dort offenbar wenig Bewegung. Nach der Übergabe in unsere Versuchsreihe wurden den Hunden Auslauf und Bewegung geboten, was theoretisch die EPO-Bildung angeregt haben könnte. Ein ähnliches Verhalten wurde beobachtet, wenn Menschen⁹ oder Hunde⁶ saisonal bedingt sich während längerer Zeit auf verschiedenen Höhen über Meer aufgehalten haben. Im Weiteren lassen die Individualwerte der Beagle den Schluss zu, dass es zwischen den Tieren grosse Streuungen von 5–55 mU/ml gab, was andere Forschungsgruppen mit Werten zwischen 1,3 und 23 mU/ml auch schon beobachtet hatten.^{6,26} Etwas erstaunlich ist die Tatsache, dass die BC-Hunde tendenziell tiefere EPO-Basalwerte aufwiesen als die MC-Hunde. Man müsste annehmen, dass eine chronische Sauerstoffschuld der kurznasigen Hunde nach molekularer Kompensation ruft. Es ist durchaus möglich, dass sie wegen ihrer Kopfform in ihrem angestammten Umfeld gar nie in ausreichend physisch belastet wurden und deswegen eine EPO-Expression nicht zustande kam. Von den Versuchshunden der MC-Gruppe hingegen war keine Vorgeschichte bekannt, so dass der im Vergleich zur Gruppe der MC-Hunde höhere EPO-Basalwert auch Ausdruck einer Belastung durch die vorgängig durchgeführte Forschung darstellen könnte.

Die vorgestellte Studie weist einige Limitationen auf. Zu nennen sind die Unterschiede in der Haltung. Die MC-Hunde stammten aus dem Labor und hatten es im Rahmen der Versuchsreihe mit einer neuen Umgebung und Betreuern zu tun. Sie gewöhnten sich im Rahmen der Wiederholbarkeitsstudie ans Laufen und die Untersucher, weswegen der vierte Messtag am ehesten einer gewissen Normalität entsprach und deswegen zum Vergleich mit den BC-Hunden ausgewählt wurde.

Im Weiteren waren die Aussentemperaturen an den Mess-tagen nicht exakt gleich hoch. Dies könnte insbesondere bei den BC-Hunden zu einer verstärkten thermoregulativen Aktivität durch Hecheln, einer damit verbundenen gerin-

geren Sauerstoffversorgung des Körpers und somit zu erhöhter Expression von VEGF und EPO geführt haben. All diese Faktoren beeinflussten die Wiederholbarkeitsstudie negativ. Bei unterschiedlich grossen Hunden musste eine angepasste Geschwindigkeit eingehalten werden, damit die Tiere nicht in Galopp gingen. Es ist nicht erwiesen, dass durch dieses Prozedere eine vergleichbare physische Belastung erreicht wird. Wir empfehlen eine maximale Laufdauer von 10 Minuten, da gerade brachycephale Hunde über längere Distanzen ansonsten in eine lebensbedrohliche Hyperthermie und Hypoxie geraten könnten.

Die Untersuchung zweier indirekter Hypoxiemarker ergab schlussfolgernd, dass für die EPO-Messung bei beiden Gruppen keine auswertbaren Veränderungen nach der physischen Belastung gefunden wurden. Der VEGF-Anstieg war dagegen unterschiedlich zwischen MC- und BC-Hunden. Der bei brachycephalen im Vergleich zu mesocephalen Hunden stärkere VEGF-Anstieg 4 Stunden nach der Belastung kann daher zur Quantifizierung des Grades der Brachycephalie beitragen. Die vorgestellte Messmethodik ist für die Hunde zumutbar und stressfrei umzusetzen. Um zur Zuchtzulassung und zu Fragen des Tierschutzes herangezogen werden zu können, müsste im Vergleich zu Referenzmethoden ein Grenzwert eines prozentualen Anstieges etabliert werden.

Zeitliche Entwicklung von Hypoxie-Markern bei brachycephalen und mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung

D. A. Koch, J. Wenk, S. Michel

Zeitliche Entwicklung
von Hypoxie-Markern
bei brachycephalen und
mesocephalen Hunden
nach kurzer physischer
Belastung

D. A. Koch, J. Wenk,
S. Michel

Développement temporel des marqueurs de l'hypoxie chez les chiens brachycéphales et mésocéphales après un exercice physique de courte durée

Afin d'objectiver la dette en oxygène chez les chiens atteints du syndrome obstructif respiratoire des races brachycéphale, huit chiens mésocéphales ont été soumis à un test de course de courte durée pendant quatre jours et huit chiens brachycéphales pendant un jour. Des échantillons de sang ont été prélevés avant et immédiatement après l'exercice et après 2 et 4 heures pour évaluer l'oxygénation cellulaire. À cette fin, deux marqueurs d'hypoxie disponibles, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et l'érythropoïétine (EPO), ont été mesurés. La répétabilité des mesures a été vérifiée chez les chiens mésocéphales. Alors que la mesure du VEGF était répétable sur les 4 jours de mesure, la mesure de l'EPO ne l'était pas. Les valeurs basales de VEGF des chiens mésocéphales et brachycéphales ne différaient pas ($7,6 \pm 4,4$ pg/ml et $6,9 \pm 4,0$ pg/ml, respectivement). La mesure effectuée 4 heures après le test de course a montré des différences significatives. La valeur du VEGF chez les chiens mésocéphales a augmenté de 42 % pour atteindre $10,8 \pm 4,7$ pg/ml, tandis que chez les chiens brachycéphales, elle a augmenté de 220 % pour atteindre $22,1 \pm 15,3$ pg/ml. Les mesures de l'EPO ont montré une différence significative entre les chiens mésocéphales et brachycéphales à tous les moments de la prise de sang. La valeur basale chez les chiens mésocéphales était environ trois fois plus élevée que chez les chiens brachycéphales ($30,1 \pm 22,6$ mU/ml contre $11,4 \pm 3,5$ mU/ml). Cependant, la différence n'était pas significative en raison de la grande dispersion chez les chiens mésocéphales ($p > 0,05$). Contrairement à la valeur du VEGF, la valeur de l'EPO n'a pas changé au cours de la période de mesure. L'étude montre que la méthode présentée avec la valeur du VEGF peut être utilisée à des fins scientifiques et d'élevage.

Mots clés: Chien, test sanguin, brachycéphalie, dette en oxygène, procédure de test, VEGF

Evoluzione temporale dei marker di ipossia in cani brachicefali e mesocefali dopo un breve sforzo fisico

Per oggettivare il debito di ossigeno nei cani affetti da sindrome delle vie aeree superiori brachicefaliche, 8 cani mesocefali sono stati sottoposti a un breve test di corsa in 4 giornate di prova, mentre 8 cani brachicefali sono stati testati in una singola giornata. Sono stati prelevati campioni di sangue prima e immediatamente dopo lo sforzo, nonché dopo 2 e 4 ore, al fine di valutare l'apporto di ossigeno a livello cellulare. A tal fine, sono stati misurati due marker di ipossia disponibili: il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e l'eritropoietina (EPO). La ripetibilità delle misurazioni è stata verificata sui cani mesocefali. È stato osservato che la ripetibilità della misurazione del VEGF è garantita nei 4 giorni di prova. Tuttavia, la ripetibilità della misurazione dell'EPO non è stata confermata. I valori basali di VEGF nei cani mesocefali e brachicefali non hanno mostrato differenze significative (risp. $7,6 \pm 4,4$ pg/ml e $6,9 \pm 4,0$ pg/ml). Tuttavia, la misurazione effettuata 4 ore dopo il test di corsa ha rivelato differenze significative. Nei cani mesocefali, il valore di VEGF è aumentato del 42 %, raggiungendo $10,8 \pm 4,7$ pg/ml, mentre nei cani brachicefali è aumentato del 220 %, raggiungendo $22,1 \pm 15,3$ pg/ml. Le misurazioni dell'EPO hanno mostrato differenze significative in tutti i momenti di prelievo tra i cani mesocefali e brachicefali. I valori basali di EPO nei cani mesocefali erano circa tre volte superiori a quelli dei cani brachicefali ($30,1 \pm 22,6$ mU/ml contro $11,4 \pm 3,5$ mU/ml). Tuttavia, a causa della grande variabilità nei cani mesocefali, questa differenza non è risultata statisticamente significativa ($p > 0,05$). A differenza del valore di VEGF, il valore di EPO non è variato nel corso del tempo di misurazione. Lo studio dimostra che il metodo descritto, insieme alla misurazione del valore di VEGF, può essere utilizzato per scopi scientifici e di selezione genetica.

Parole chiave: cane, esame del sangue, brachicefalia, debito di ossigeno, metodo di test, VEGF

Literaturnachweis

¹ Amis TC, Kurpershoek C: Pattern of breathing in brachycephalic dogs. Am J Vet Res 1986; 47(10): 2200–2204.

² Aron DN, Crowe DT: Upper airway obstruction. General principles and selected conditions in the dog and cat. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1985; 15(5): 891–917.

³ Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH: Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. Pflugers Arch 2001; 443(2): 240–249.

⁴ Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW: Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. N Engl J Med 1987; 316(2): 73–78.

⁵ Gavin TP, Robinson CB, Yeager RC, England JA, Nifong LW, Hickner RC: Angiogenic growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. J Appl Physiol (1985) 2004; 96(1): 19–24.

- ⁶ Glaus TM, Grenacher B, Koch D, Reiner B, Gassmann M: High altitude training of dogs results in elevated erythropoietin and endothelin-1 serum levels. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2004; 138(3): 355–361.
- ⁷ Grand JG, Bureau S: Structural characteristics of the soft palate and meatus nasopharyngeus in brachycephalic and non-brachycephalic dogs analysed by CT. *J Small Anim Pract* 2011; 52(5): 232–239.
- ⁸ Harvey CE: Upper airway obstruction surgery 8: Overview of Results. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982; 18: 567–569.
- ⁹ Heinicke K, Prommer N, Cajigal J, Viola T, Behn C, Schmidt W: Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man. *Eur J Appl Physiol* 2003; 88(6): 535–543.
- ¹⁰ Hendricks JC: Brachycephalic airway syndrome. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1992; 22(5): 1145–1153.
- ¹¹ Hoier B, Hellsten Y: Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation* 2014; 21(4): 301–314.
- ¹² Hoier B, Prats C, Qvortrup K, Pilegaard H, Bangsbo J, Hellsten Y: Subcellular localization and mechanism of secretion of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle. *FASEB J* 2013; 27(9): 3496–3504.
- ¹³ Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M: Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB* 2001; 15: 1312–1314.
- ¹⁴ Koch DA, Arnold S, Hubler M, Montavon P: Brachycephalic syndrome in dogs. *Comp Cont Educ Pract Vet* 2003; 25(1): 48–55.
- ¹⁵ Koch DA, Wiestner T, Balli A, Arnold S, Montavon P: Vergleich von transnasalem Druck und Widerstand bei brachycephalen und normozephalen Hunden. *Kleintierpraxis* 2018; 63(5).
- ¹⁶ Kundrapu S, Noguez J: Laboratory Assessment of Anemia. In: Makowski GS (ed.), *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, 2018: 197–225.
- ¹⁷ Liu NC, Adams VJ, Kalmar L, Ladlow JF, Sargan DR: Whole-Body Barometric Plethysmography Characterizes Upper Airway Obstruction in 3 Brachycephalic Breeds of Dogs. *J Vet Intern Med* 2016; 30(3): 853–865.
- ¹⁸ Meier L: Repeated Measures ANOVA (RM ANOVA) and Mixed Effects Models Seminar für Statistik, 2023/2024; ETH Zürich; 2024.
- ¹⁹ Minigh J: Erythropoietin. In: Enna SJ, Bylund DB (eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, 2008: 1–6.
- ²⁰ Muhammad LN: Guidelines for repeated measures statistical analysis approaches with basic science research considerations. *J Clin Invest* 2023; 133(11).
- ²¹ Niinikoski I, Himanen SL, Tenhunen M, Aromaa M, Lilja-Maula L, Rajamaki MM: Evaluation of risk factors for sleep-disordered breathing in dogs. *J Vet Intern Med* 2024; 38(2): 1135–1145.
- ²² Niinikoski I, Kouki S, Koho N, Aromaa M, Holopainen S, Laurila HP, et al.: Evaluation of VEGF-A and CCL2 in dogs with brachycephalic obstructive airway syndrome or canine idiopathic pulmonary fibrosis and in normocephalic dogs. *Res Vet Sci* 2022; 152: 557–563.
- ²³ Oechtering GU, Pohl S, Schlueter C, Lippert JP, Alef M, Kiefer I, et al.: A Novel Approach to Brachycephalic Syndrome. 1. Evaluation of Anatomical Intranasal Airway Obstruction. *Vet Surg* 2016; 45(2): 165–172.
- ²⁴ Oechtering TH, Oechtering GU, Nöller C: Strukturelle Besonderheiten der Nase brachycephaler Hunderassen in der Computertomographie. *Tierärztl Prax* 2007; 35: 177–187.
- ²⁵ Packer RM, Hendricks A, Tivers MS, Burn CC: Impact of Facial Conformation on Canine Health: Brachycephalic Obstructive Airway Syndrome. *PLoS One* 2015; 10(10): e0137496.
- ²⁶ Pechereau D, Martel P, Braun JP: Plasma erythropoietin concentrations in dogs and cats: reference values and changes with anaemia and/or chronic renal failure. *Res Vet Sci* 1997; 62(2): 185–188.
- ²⁷ Rancan L, Romussi S, Garcia P, Albertini M, Vara E, Sanchez de la Muela M: Assessment of circulating concentrations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and nitric oxide in dogs with brachycephalic airway obstruction syndrome. *Am J Vet Res* 2013; 74(1): 155–160.
- ²⁸ Rullman E, Rundqvist H, Wagsater D, Fischer H, Eriksson P, Sundberg CJ, et al.: A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2007; 102(6): 2346–2351.
- ²⁹ Slawuta P, Nicpon J, Domanska S: Influence of the wing-of-the-nostrils correction procedure on the change of the acid-base balance parameters and oxygen concentration in the arterial blood in French bulldogs. *Pol J Vet Sci* 2011; 14(1): 77–80.
- ³⁰ Thews G: Lungenatmung. In: Schmidt R, Thews G (eds.), *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, Berlin, 1983: 500–536.
- ³¹ Van Beekvelt MCP, Collier WNJM, Wevers RA, Van Engelen BGM: Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O₂ consumption and blood flow in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90: 511–519.
- ³² Wanner R, Spielmann P, Stroka DM, Camenisch G, Camenisch I, Scheid A, et al.: Epilones induce erythropoietin expression via hypoxia-inducible factor-1 α activation. *Blood* 2000; 96(4): 1558–1565.
- ³³ Wykes PM: Brachycephalic airway obstructive syndrome. *Probl Vet Med* 1991; 3(2): 188–197.

Zeitliche Entwicklung von Hypoxie-Markern bei brachycephalen und mesocephalen Hunden nach kurzer physischer Belastung

D. A. Koch, J. Wenk, S. Michel

Korrespondenzadresse

Daniel Koch
Daniel Koch Kleintierchirurgie AG,
CH-8253 Diessenhofen
E-Mail: daniel.koch@dkoch.ch