

# **Angiopoietin 1 und 2 als Biomarker bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Thomas Schmidt  
aus Dormagen

Gießen 2016



Klinik für Pneumologie und Internistische Intensivmedizin, Infektiologie,  
Gastroenterologie, Nephrologie  
Direktor: Prof. Dr.med. Werner Seeger  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Ghofrani

Gutachter: Prof. Dr. med. Nef

Tag der Disputation: 16.01.2017

# Inhalt

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
1.1 DEFINITION DER PULMONALEN HYPERTONIE .....	6
1.2 ÄTIOLOGIE.....	6
1.3 PATHOPHYSIOLOGIE UND PATHOLOGIE .....	8
1.4 DIAGNOSE DER PH UND BESTIMMUNG DER ÄTIOLOGIE.....	9
1.5 SCHWEREGRAD UND PROGNOSE .....	13
1.5.1 DIAGNOSTISCHE PARAMETER VOR DEM HINTERGRUND DES SCHWEREGRADES DER PH UND DER PROGNOSE DES ÜBERLEBENS .....	13
1.5.2 FOLLOW-UP .....	16
1.6 BIOMARKER BEI DER PULMONALEN HYPERTONIE .....	16
1.7 THERAPIE BEI PULMONALER HYPERTONIE .....	19
<b>2 ANG-1/-2 UND IHRE POTENTIELLE ROLLE IN DER   PATHOPHYSIOLOGIE DER PH.....</b>	<b>21</b>
2.1 ZIEL DER STUDIE .....	24
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
3.1 MATERIAL.....	25
3.2 METHODEN .....	25
3.2.1 RECHTSHERZKATHETER.....	25
3.2.2 ABNAHME UND AUFBEWAHRUNG DER PATIENTENPROBEN.....	26
3.2.3 DATENERHEBUNG UND MESSMETHODEN.....	26
3.3 STATISTIK .....	27
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
4.1 KOLLEKTIV .....	28
4.1.1 PATIENTENKOLLEKTIV BEZÜGLICH ANGIOPOIETIN-1.....	28
4.1.2 PATIENTENKOLLEKTIV BEZÜGLICH ANGIOPOIETIN-2.....	28
4.2 BASISDATEN .....	28
4.2.1 BASISDATEN DER POPULATION BEI ANGIOPOIETIN-1.....	29
4.2.2 BASISDATEN DER POPULATION BEI ANGIOPOIETIN-2.....	31

<b>4.3</b>	<b>KONZENTRATIONSVERTEILUNG DER PLASMASPIEGEL VON ANGIOPOIETIN-1 UND ANGIOPOIETIN-2.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>KONZENTRATIONEN DER EINZELNEN GRUPPEN.....</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>KEINE UNTERSCHIEDE IN DEN KONZENTRATIONEN HINSICHTLICH DES GESCHLECHTS, WOHL ABER ZWISCHEN DEN NYHA-KLASSEN.....</b>	<b>36</b>
<b>4.6</b>	<b>ANGIOPOIETIN-2 KONZENTRATION SIGNIFIKANT ERHÖHT BEI CVD UND PVH, NICHT JEDOCH ANGIOPOIETIN-1.....</b>	<b>37</b>
<b>4.7</b>	<b>STARKE KORRELATION DES LN ANGIOPOIETIN-2 MIT DER HÄMODYNAMIK DES GESAMTKOLLEKTIVS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.8</b>	<b>STÄRKSTE KORRELATION MIT DER HÄMODYNAMIK INNERHALB DER PATIENTENGRUPPE MIT CVD .....</b>	<b>42</b>
<b>4.9</b>	<b>UNTERSCHIEDLICHE KORRELATION DES LN ANGIOPOIETIN-2 MIT DER HÄMODYNAMIK INNERHALB DER WEITEREN ÄTIOLOGIEN .....</b>	<b>44</b>
<b>4.10</b>	<b>EINGESCHRÄNKTE PROGNOSTISCHE AUSSAGEKRAFT DES LN ANG-2 .....</b>	<b>48</b>
<b>4.11</b>	<b>DER LN ANG-1 BESITZT KEIN PROGNOSTISCHES POTENTIAL .....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>DIE ERGEBNISSE IM KONTEXT ANDERER STUDIEN .....</b>	<b>50</b>
5.1.1	PLASMA-KONZENTRATIONEN VON ANGIOPOIETIN-1 UND ANGIOPOIETIN-2 IN DER KONTROLLGRUPPE .....	50
5.1.2	ANGIOPOIETIN-1 .....	51
5.1.3	ANGIOPOIETIN-2 .....	52
<b>5.2</b>	<b>STÄRKEN UND SCHWÄCHEN DER STUDIE.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSSICHT .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>65</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>11</b>	<b>TABELLARISCHER LEBENS LAUF .....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

6-MWT	6-Minuten-Gehtest
A. pulmonalis	Arteria pulmonalis (Lungenarterie)
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
BMPR2	bone morphogenetic protein type II
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTEPH	chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie
CVD	kollagen-vaskulär assoziierte pulmonale Hypertonie
DLCO	Diffusionskapazität für Kohlenstoffmonoxid
EC	Endothelzellen
ERST	Erregungsrückbildungsstörungen
ESC	European Society of Cardiology
ET-1	Endothelin-1
FEV1	Einsekundenkapazität
GDF-15	Growth differentiation factor-15
HI	Herz-Index
HR	Hazard ratio
HR-CT	hochauflösende CT
HZV	Herzzeitvolumen
ILD	interstitielle Lungenerkrankung (interstitial lung disease)
IPAH	Idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie
LN Ang	natürlich logarhythmisierte Angiopoietin-Konzentration
LuFu	Lungenfunktions-Diagnostik
LVEDVI	Linksventrikulärer enddiastolischer Volumen Index
MPAP	mean Pulmonary Arterial Pressure
NTproBNP	N-terminale pro-natriuretisches Peptid Typ B
NYHA	New York Heart Association
PA	Pulmonalarterie

PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck
PAWP	pulmonal arterieller Verschlussdruck
PH	pulmonale Hypertonie
PP	Polypropylen
PVH	pulmonal-venöse Hypertonie
PVOD	pulmonal veno-okklusiv Erkrankung
PVR	pulmonaler Gefäßwiderstand
PVRI	Index des pulmonalen Gefäßwiderstandes
RAP	rechtsatrialer Druck
RV	rechtsventrikulär
RVEDI	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Volumen Index
RHK	Rechtsherzkatheteruntersuchung
RPM	Umdrehungen pro Minute
SLE	systemischer Lupus erythematosus
SVI	Schlagvolumen Index
SvO <sub>2</sub>	venöse Sauerstoffsättigung
SV/PP	Schlagvolumen / pulmonalen Druckpuls
TGF-β	transforming growth factor beta
TTE	transthorakale Echokardiografie
v.a.	vor allem
V. jug. int.	Vena jugularis interna
VCS	Vena cava superior
VEGF	Vascular endothelial growth factors
V <sub>max</sub>	hier: Regurgitationsgeschwindigkeit

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition der pulmonalen Hypertonie

Laut der aktuellen European Society of Cardiology (ESC) Leitlinien aus 2015 spricht man von pulmonaler Hypertonie (PH) bei Überschreitung eines pulmonalen Mitteldrucks (MPAP) von 25 mmHg [1]. Diese Werte sind zurück zu verfolgen bis zur Definition der WHO aus dem Jahre 1975 [2]. Auswertungen großer Anzahlen von Rechtsherzkathetern zeigen, dass der MPAP gesunder Menschen meist sogar unter 20 mmHg liegt und selbst mit zunehmendem Alter und BMI nur selten die 30 mmHg übersteigt [3].

## 1.2 Ätiologie

Die aktuell gültige Einteilung der PH nach ihrer Ätiologie wurde in den ESC Leitlinien 2015 festgehalten [1] [Abbildung 1], basierend auf den Ergebnissen des 5. Welt-Symposiums zur PH in Nizza 2013 [4]. Dabei handelt es sich um eine Anpassung einer etwas älteren Einteilung, der Dana Point Klassifikation, welche auf dem vierten weltweiten Symposium der PH in Dana Point 2008, Kalifornien, verabschiedet wurde [5].



<b>1. Pulmonary arterial hypertension</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>1.1 Idiopathic</li> <li>1.2 Heritable <ul style="list-style-type: none"> <li>1.2.1 BMPR2 mutation</li> <li>1.2.2 Other mutations</li> </ul> </li> <li>1.3 Drugs and toxins induced</li> <li>1.4 Associated with: <ul style="list-style-type: none"> <li>1.4.1 Connective tissue disease</li> <li>1.4.2 Human immunodeficiency virus (HIV) infection</li> <li>1.4.3 Portal hypertension</li> <li>1.4.4 Congenital heart disease (Table 6)</li> <li>1.4.5 Schistosomiasis</li> </ul> </li> </ul>
<b>1*. Pulmonary veno-occlusive disease and/or pulmonary capillary haemangiomatosis</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>1*.1 Idiopathic</li> <li>1*.2 Heritable <ul style="list-style-type: none"> <li>1*.2.1 EIF2AK4 mutation</li> <li>1*.2.2 Other mutations</li> </ul> </li> <li>1*.3 Drugs, toxins and radiation induced</li> <li>1*.4 Associated with: <ul style="list-style-type: none"> <li>1*.4.1 Connective tissue disease</li> <li>1*.4.2 HIV infection</li> </ul> </li> </ul>
<b>1". Persistent pulmonary hypertension of the newborn</b>
<b>2. Pulmonary hypertension due to left heart disease</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>2.1 Left ventricular systolic dysfunction</li> <li>2.2 Left ventricular diastolic dysfunction</li> <li>2.3 Valvular disease</li> <li>2.4 Congenital/acquired left heart inflow/outflow tract obstruction and congenital cardiomyopathies</li> <li>2.5 Congenital/acquired pulmonary veins stenosis</li> </ul>
<b>3. Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>3.1 Chronic obstructive pulmonary disease</li> <li>3.2 Interstitial lung disease</li> <li>3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern</li> <li>3.4 Sleep-disordered breathing</li> <li>3.5 Alveolar hypoventilation disorders</li> <li>3.6 Chronic exposure to high altitude</li> <li>3.7 Developmental lung diseases (Web Table III)</li> </ul>
<b>4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension and other pulmonary artery obstructions</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>4.1 Chronic thromboembolic pulmonary hypertension</li> <li>4.2 Other pulmonary artery obstructions <ul style="list-style-type: none"> <li>4.2.1 Angiosarcoma</li> <li>4.2.2 Other intravascular tumors</li> <li>4.2.3 Arteritis</li> <li>4.2.4 Congenital pulmonary arteries stenoses</li> <li>4.2.5 Parasites (hydatidosis)</li> </ul> </li> </ul>
<b>5. Pulmonary hypertension with unclear and/or multifactorial mechanisms</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>5.1 Haematological disorders: chronic haemolytic anaemia, myeloproliferative disorders, splenectomy</li> <li>5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary histiocytosis, lymphangioleiomyomatosis, neurofibromatosis</li> <li>5.3 Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders</li> <li>5.4 Others: pulmonary tumoral thrombotic microangiopathy, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure (with/without dialysis), segmental pulmonary hypertension</li> </ul>

Abbildung 1 Klassifikation der PH nach der aktuellen ESC Leitlinie [1]

### 1.3 Pathophysiologie und Pathologie

Bei der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH) ist es in den letzten Jahren gelungen Mutationen im „Transforming growth factor beta“ (TGF- $\beta$ ) zu identifizieren, die wiederum auf den „bone morphogenetic protein type II“ (BMPRII) konvergieren [6]. So kommt es zu einer Mediahypertrophie, proliferativen und fibrotischen Veränderungen der Intima sowie zu einer inflammatorischen perivaskulären Infiltration [7–10]. Die vaskulären Veränderungen führen zu einer chronischen Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR), was letztlich eine Rechtsherzinsuffizienz, Rechtsherzversagen, Fehlfunktion vorgeschalteter Organe und den Tod des Patienten zur Folge haben kann [11].

Bei der PH infolge von Linksherzerkrankungen ist das Bild gekennzeichnet durch vergrößerte Pulmonalvenen, Dilatation der Lungenkapillaren und interstitielle Ödeme. Dies geht hin bis zur Beteiligung distaler Pulmonalarterien (PA), die von einer Mediahypertrophie und Fibrose der Intima betroffen sein können. Dieser Form der PH kommt eine Sonderstellung zu, da ihre Therapie primär gekennzeichnet ist durch das Management der Linksherzerkrankung [12]. Eine Mediahypertrophie und eine obstruktive Proliferation der Intima finden sich bei der PH infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie [1].

Die chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) hat sich zu einem der Hauptäste der PH entwickelt und wird diagnostisch sehr häufig übersehen. Sie ist charakterisiert durch Remodelling unterschiedlicher Gefäßzweige, die, aufgrund chronischer thrombembolischer Ereignisse in anderen Gefäßbereichen, einem höheren Druck ausgesetzt sind. Der Grund für die fehlende Fibrinolyse der rezidivierenden Thrombembolien trotz des hohen fibrinolytischen Potentials des Gefäßbettes der Lunge ist dabei bislang nicht geklärt [13]. Es gibt jedoch im Hinblick auf die große Anzahl verschiedener Entitäten der PH auch entsprechend viele vermutete Pathomechanismen, die letztlich zur Ausprägung der Hypertonie führen.

## 1.4 Diagnose der PH und Bestimmung der Ätiologie

Aktuelle Leitlinien empfehlen bei dem klinischen Verdacht auf eine PH das Durchlaufen eines gewissen Diagnose-Algorithmus [Abbildung 3]. Demnach schließen sich an eine entsprechende Anamnese verschiedene apparative Schritte an [1,14]. Dabei zeigen sich Patienten mit PH in ihrer Symptomatik unspezifisch und beklagen unter anderem Belastungsdyspnoe, Thoraxschmerzen, Synkopen, Ödeme und ggf. eine Zunahme des Bauchumfanges. Auch veränderte Auskultationsbefunde, wie z.B. ein systolisches Strömungsgeräusch links parasternal, können auftreten [15]. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien kann es darüber hinaus zu einer Lebervergrößerung, gestauten Halsvenen, Aszites und peripheren Ödemen sowie livide Verfärbungen der Extremitäten kommen [15]. Die Belastungsdyspnoe bei der PH dient der Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung und wird analog zur WHO-Einteilung der Herzinsuffizienz in vier Schweregraden angegeben [Abbildung 2].

<b>Klasse 1</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
<b>Klasse 2</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit einer leichten Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
<b>Klasse 3</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichtere als normale Belastungen führen zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.
<b>Klasse 4</b>
Patienten mit pulmonaler Hypertonie die keinerlei körperliche Belastung ohne Beschwerden ausführen können. Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt.

Abbildung 2 Funktionelle Klassifikation der pulmonalen Hypertonie nach: Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie: Europäische Leitlinien 2009 [14]

Teil des Algorithmus ist auch das Schreiben eines EKG, welches bei Vorliegen typischer Zeichen auf eine PH hinweisen kann (P-pulmonale, Rechtsventrikuläre(RV)-Hypertrophie, u.a.) [14]. Sensitivität und Spezifität des EKG betragen jedoch 55% bzw. 70%, so dass ein normales EKG eine PH nicht ausschließt. Weiterhin finden sich in 13% aller PAH-Fälle im EKG keine Rechtsbelastungszeichen [16]. Darüber hinaus wird eine Thorax-Röntgenaufnahme gemacht, um auf Zeichen der PH zu achten (erweiterte zentrale PA, verminderte periphere Gefäßfüllung und Vergrößerung von rechtem Vorhof) [14]. Ein normales Röntgenbild schließt aber eine PH nicht aus und der Befund korreliert nicht zwingend mit dem Schweregrad der Erkrankung [16]. Eine Lungenfunktions-Diagnostik (LuFu) und die Blutgasanalyse dienen v.a. der Suche nach einer zugrundeliegenden Lungenerkrankung [14], wobei unauffällige Befunde eine PH nicht ausschließen [14]. Die transthorakale Echokardiografie (TTE) gehört den europäischen Leitlinien nach bei Hinweisen auf eine PH zum diagnostischen Algorithmus [14]. Sie bietet Informationen bezüglich der Einschätzung des systolischen PAP und des PVR [1,14,17,18], sowie über die Größe und Leistung des rechten Ventrikels, die Funktionsweise des linken Ventrikels in Systole und Diastole und weitere mögliche kardiale Veränderungen [18]. Dabei besitzt die TTE eine Sensitivität und Spezifität von 88%, bzw. 56% verglichen mit den entsprechenden Ergebnissen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung [RHK] [19].

Eine hochauflösende CT (HR-CT) liefert wichtige Erkenntnisse bezüglich Veränderungen des Lungenparenchyms und ist integraler Bestandteil der Diagnostik interstitieller Lungenerkrankungen [1,14,17]. Eine Ventilations/- Perfusionsszintigrafie (V/Q-Scan) sollte bei jeder schweren PH Bestandteil der initialen diagnostischen Abklärung sein [1,14,17]. Um die PH zu bestätigen ist letztlich jedoch eine RHK notwendig. Diese lässt auch am ehesten Aussagen zur ihrer Ätiologie und dem Schweregrad zu [1,14,17].

Eine Rechtsherzhypertrophie zeigte sich bei Patienten mit einer idiopathischen pulmonalen Hypertonie (IPAH) in 87 % der Fälle in einer Multicenter-Studie mit 187 Patienten [16] und kann ggf. bereits im EKG hinweisend sein. Zum Zeitpunkt der Diagnose einer IPAH zeigte die gleiche Studie Auffälligkeiten im Röntgenbild bei 90% der Patienten [16]. Diese umfassen Dilatationen der zentralen Gefäßstämme bei Rarefizierung der peripheren Gefäßzeichnung und in fortgeschrittenen Stadien ggf. bereits Hinweise auf eine Rechtsherzhypertrophie [1].

Darüber hinaus kann die Thorax-Röntgenaufnahme unter Umständen weitere Lungenerkrankungen oder Linksherzveränderungen als Ursache der PH ausschließen [1]. Eine LuFu und die Messung der arteriellen Blutgase bieten deutliche Hinweise auf zugrundeliegende Erkrankungen des luftleitenden Systems oder des Lungenparenchyms [1,14,17]. Patienten mit einer PAH haben dabei in der Regel verminderte Werte der Diffusionskapazität für Kohlenstoffmonoxid (DLCO) [1], können jedoch auch eine normale DLCO und auch sonst normale Lungenfunktionswerte aufweisen. Hingegen ist das arterielle pCO<sub>2</sub> bei Patienten mit einer PAH beinahe immer erniedrigt (Median, 32mmHg) [20]. Die LuFu dient zusätzlich sehr gut zur Diagnose einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) als Ursache für eine PH durch Nachweis einer irreversiblen Atemwegsobstruktion, gemessen über die Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>), bei vergrößertem Residualvolumen und einer erniedrigten DLCO [1,21]. Eine Verminderung der Vitalkapazität gepaart mit einer verminderten DLCO kann Hinweise auf interstitielle Lungenerkrankungen (ILD) bieten [22]. Integraler Bestandteil der Diagnostik einer ILD oder Emphysemen als Ursache der PH ist jedoch das HR-CT [1,14,17]. Zum Ausschluss einer CTEPH wird wiederum der V/Q-Scan herangezogen, denn dieser schließt bei einem unauffälligen Perfusionsbefund eine CTEPH mit hinreichender Sicherheit aus und besitzt dabei eine Sensitivität von 90-100% und eine Spezifität von 94-100% [23].

Bei einer PH ungeklärter Ätiologie können Laboruntersuchungen, wie Antikörpertests, durchgeführt werden auf der Suche nach Scl-70-, Zentromer- und U1-RNP-Antikörper [1,14], B23-, anti-Ro und U3-RNP-Antikörpern [1], um beispielsweise eine Sklerodermie als Ursache zu diagnostizieren. Bei Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses (SLE) können unter Umständen anti-Cardiolipin-Antikörper nachgewiesen werden [1,17]. Erhöhte antinukleäre Antikörper treten bei bis zu 40% der Patienten mit einer IPAH auf [24]. Eine HIV- und Hepatitis-B/C-Serologie und auch eine TSH-Bestimmung sind wichtig [14,17] (Prävalenz von Thyreopathien bei IPAH bis zu 20%) [14]. Schilddrüsenerkrankungen kommen dabei häufig bei der PAH vor und sollten immer in Betracht gezogen werden, besonders wenn plötzliche Veränderungen der Klinik des Patienten auftreten [25].

Zur genaueren Abklärung einer CTEPH sollten ein Thrombophilie-Screening erfolgen mit einer Suche nach anti-Phospholipid-Antikörpern, Lupus-Antikoagulanz und anti-Cardiolipin Antikörpern [1]. Im Rahmen der Erstdiagnostik und als Parameter zur Verlaufskontrolle der Therapie kann die Bestimmung der natriuretisches Peptid Typ B- (BNP) bzw. N-terminales pro-natriuretisches Peptid Typ B- (NTproBNP) Werte von Nutzen sein [14].

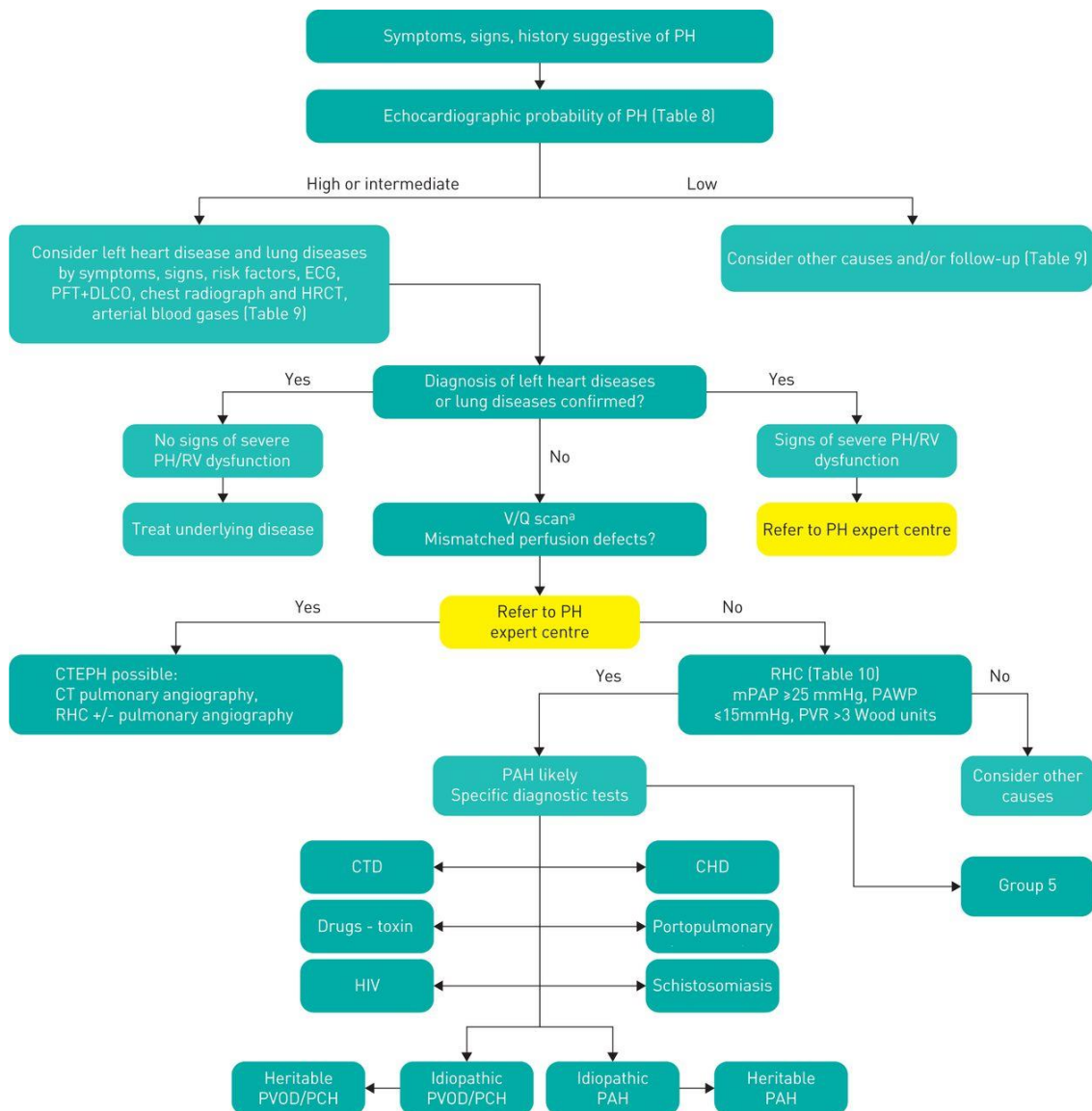


Abbildung 3 Diagnostischer Algorithmus bei Hinweisen auf eine PH nach ESC Leitlinien 2015 [1]

## 1.5 Schweregrad und Prognose

### 1.5.1 Diagnostische Parameter vor dem Hintergrund des Schweregrades der PH und der Prognose des Überlebens

Die Einschätzung des Schweregrades ist ein Prozess, der zwischen der Diagnose der Erkrankung und der Therapie-Planung steht [17]. Sie geschieht in Zusammenschau vieler einzelner Parameter, die aus anamnestischen Angaben zu Symptomen, sowie aus klinischen und funktionellen Parametern inklusiver der Ergebnisse aus Belastungsuntersuchungen, der Echokardiographie und des RHK bestehen [14]. Basierend auf der prognostischen Einschätzung eines Markers wird er zur Einschätzung des aktuellen Schweregrades herangezogen. Weiterhin dienen die Untersuchungsergebnisse bei Start der Therapie zur Einschätzung des Patienten in einen stabilen oder instabilen Zustand mit einer entsprechenden besseren oder schlechteren Prognose [Abbildung 4] [14,17].

Als einer dieser Marker wurden weitere Strecken im 6-MWT und ein höherer Herz-Index (HI) als unabhängige prognostische Parameter für bessere Überlebensraten herausgestellt [26]. In diesem französischen Register, bestehend aus retrospektiven und neu erhobenen Daten von insgesamt 674 Patienten, sind 1-, 2- und 3-Jahres-Überlebensraten von je 87%, 76% und 67% erfasst. Weibliche Patienten, Patienten jüngeren Alters ( $\leq 50$  Jahre) und Patienten der New York Heart Association (NYHA) -Klassen I und II wiesen dabei bessere Überlebensraten auf [27]. Im REVEAL Register wurden insgesamt die Daten von 2716 Patienten ausgewertet [28]. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Todesrisiko bei PAH-Patienten und einer Niereninsuffizienz sowie mit schlechten hämodynamischen Parametern [29] oder einem in der TTE dargestellten Perikarderguss hergestellt [30].

Das REVEAL Register brachte Gehstrecken von  $\geq 440$  m in Verbindung mit besseren Überlebensraten, hingegen waren Werte  $< 165$  m prognostisch für eine erhöhte Mortalität [28]. Eine andere Gruppe stellte fest, dass Gehstrecken von  $< 250$  m ein Mortalitätsrisiko auf 2 Jahre von ca. 50 % besaßen, wogegen bei Strecken oberhalb dieser Grenze die Mortalität nur bei etwa 8 % lag [31]. Bei einer weiteren Studie mit einem Patientenkollektiv von 34 Patienten, die vor Behandlungsbeginn einem 6-MWT unterzogen wurden, stellte man eine Reduktion des Mortalitätsrisikos von 18 % für jeweils zusätzliche 50 m Gehstrecke fest [32].

Das unterstreicht die Ansicht, dass eine frühe Diagnosestellung und Behandlung der Patienten bei noch wenig fortgeschrittener Erkrankung und möglichst normaler rechtsventrikulärer Funktion, sowie eines höheren Leistungsmaximums in Belastungsuntersuchungen, ein deutlich besseres Outcome zur Folge haben [26,27].

Von den hämodynamischen Parametern hat eine frühe Studie den Druck im rechten Vorhof, den MPAP und der HI als unabhängige Marker für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko herausgearbeitet [33] wogegen das REVEAL Register nicht den MPAP sondern lediglich den rechtsatrialen Druck (RAP) und den HI als unabhängige Risikofaktoren sieht. Auch in mehreren weiteren Studien wurde der RAP als Marker aufgezeigt, dessen Erhöhung mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko einhergeht, HR 2,74 bei einem Druck  $\geq 12$  mmHg [34], HR 1,52 je Erhöhung um 5 mmHg (wobei hier kein Grenzwert angegeben wurde) [30], HR 2,85, auch hier wurde kein Grenzwert angegeben [35].

Das REVEAL Register beschreibt weiter bei Patienten der NYHA – Klasse IV ein über 3-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko (Hazard ratio (HR), 3,1) [28]. Ein ähnliches Bild zeigt eine weitere Studie mit 81 Patienten, die ein beinahe 4-fach erhöhtes Risiko sieht (HR 3,89) [30]. Dieses Bild wurde von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt. Dort hatten PAH Patienten der NYHA Klasse ein deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko gegenüber den NYHA Klassen II und III mit einer 3-Jahres Überlebensrate von 53% gegenüber 72% bei NYHA III respektive 80 % bei NYHA II.

Bezüglich des HI als prognostischem Parameter hat eine Studie von Patienten mit IPAH, die in einem 4 Jahre Follow-up untersucht wurden, ein 3,2-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko bei einer Verminderung des HI je l/min/m<sup>2</sup> ergeben [36]. Die gleiche Studie untersuchte ebenfalls die Kapazität der Pulmonalgefäße, errechnet durch den Quotienten des Schlagvolumens / pulmonalen Druckpuls (SV/PP), als Prädiktor der Mortalität. In der Studie war ein erniedrigter Wert für das Verhältnis SV/PP mit einer HR von 17.0 der stärkste Marker des Mortalitätsrisikos [36].

Auch die Einschätzung der Mortalität bei IPAH anhand einiger Parameter der Herzgröße wurde untersucht. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem Schlagvolumenindex (SVI) des Herzens von  $> 25$  ml/m<sup>2</sup> (Mittelwert der Studie) eine deutlich bessere Überlebensrate aufwiesen, als Patienten mit einem Wert  $\leq 25$  ml/m<sup>2</sup>. Dabei stieg die Überlebensrate von Patienten mit einem rechtsventrikulären enddiastolischen Volumen Index (RVEDVI)  $< 84$  ml/m<sup>2</sup> (Mittelwert der Studie) deutlich gegenüber Patienten mit einem Wert von  $\geq 84$  ml/m<sup>2</sup> bei der baseline Untersuchung.



Bei dem linksventrikulären enddiastolischen Volumen Index (LVEDVI) verhielt es sich dann wieder umgekehrt, hier bedeutete ein Index von  $> 40 \text{ ml/m}^2$  (Mittelwert der Studie) eine deutlich bessere Prognose als einer  $\leq 40 \text{ ml/m}^2$  [35]. Ebenfalls als prognostischer Marker bei der baseline Untersuchung wurde der Index des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVRI) erarbeitet. Patienten mit einem PVRI von  $> 30 \text{ mm Hg/Liter/min/m}^2$  hatten ein um 2.44-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko gegenüber Patienten mit einem Referenzwert von  $\leq 16 \text{ mm Hg/Liter/min/m}^2$  [37]. Die gleiche Studie von 811 retrospektiv untersuchten Patienten stellte bei den baseline Parametern auch eine Erhöhung des Serum-Kreatinin von jeweils  $0,5 \text{ mg/dl}$  als prognostisch negativen Wert heraus (HR 1,73) [37]. Ebenfalls berichtet wurde eine deutlich verschlechterte Prognose für Patienten mit einer venösen Sauerstoffsättigung (SvO<sub>2</sub>) bei der baseline Untersuchung von  $\leq 55 \%$  [37]. Diese Ergebnisse wurden von einer weiteren Gruppe unterstrichen, die ebenfalls ein erhöhtes Mortalitätsrisiko für Patienten mit einer SvO<sub>2</sub> von  $\leq 54,5 \%$  beschreibt (HR 1,54) [34].

Determinants of prognosis <sup>a</sup> (estimated 1-year mortality)	Low risk <5%	Intermediate risk 5–10%	High risk >10%
Clinical signs of right heart failure	Absent	Absent	Present
Progression of symptoms	No	Slow	Rapid
Syncope	No	Occasional syncope <sup>b</sup>	Repeated syncope <sup>c</sup>
WHO functional class	I, II	III	IV
6MWD	>440 m	165–440 m	<165 m
Cardiopulmonary exercise testing	Peak VO <sub>2</sub> >15ml/min/kg (>65% pred.) VE/VCO <sub>2</sub> slope <36	Peak VO <sub>2</sub> 11–15 ml/min/kg (35–65% pred.) VE/VCO <sub>2</sub> slope 36–44.9	Peak VO <sub>2</sub> <11 ml/min/kg (<35% pred.) VE/VCO <sub>2</sub> slope $\geq$ 45
NT-proBNP plasma levels	BNP <50 ng/l NT-proBNP <300 ng/l	BNP 50–300 ng/l NT-proBNP 300–1400 ng/l	BNP >300 ng/l NT-proBNP >1400 ng/l
Imaging [echocardiography, CMR imaging]	RA area <18 cm <sup>2</sup> No pericardial effusion	RA area 18–26 cm <sup>2</sup> No or minimal, pericardial effusion	RA area >26 cm <sup>2</sup> pericardial effusion
Haemodynamics	RAP <8 mmHg CI $\geq$ 2.5 l/min/m <sup>2</sup> SvO <sub>2</sub> >65%	RAP 8–14 mmHg CI 2.0–2.4 l/min/m <sup>2</sup> SvO <sub>2</sub> 60–65%	RAP >14 mmHg CI <2.0 l/min/m <sup>2</sup> SvO <sub>2</sub> <60%

Abbildung 4 Parameter zur Unterscheidung zwischen stabilen und instabilen Patienten nach den ESC Leitlinien zur Diagnose und Therapie der PH aus 2015 [1]

### **1.5.2 Follow-up**

Einige der prognostischen Marker bei der PH haben sich vor allem bei der Einschätzung des Krankheitsverlaufs unter medikamentöser Therapie als Verlaufparameter durchgesetzt. So werden aufgrund ihres prognostischen Wertes in der Verlaufsbeobachtung von Patienten Veränderungen in der NYHA-Einteilung, bei den Gehweiten im 6-MWT oder Veränderungen im HI herangezogen [34].

Der gleichen Werte bedient sich auch eine weitere Studie bei der Untersuchung von PAH Patienten, die subkutan mit Trepostinil behandelt wurden. Auch hier zeigte sich, dass sich im Follow-up Veränderungen dieser Parameter auf die Prognose zum Zeitpunkt X nach Behandlungsstart auswirken [37]. Dabei steigt die Überlebenschance mit steigender Gehstrecke beim 6-MWT [34,37] sowie der Einteilung in eine niedrigere NYHA-Klasse [34]. Auch bei dem Follow-up von 104 Patienten und über 4 Jahre oder bis hin zum Tod waren verringerte Werte für den SV/PP und z.B. den HI oder aber erhöhte Werte für den RAP und den pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR) hinweisend auf ein erhöhtes Mortalitätsrisiko [36]. Eine weitere Studie bestätigte die prognostische Aussagekraft bei Änderungen der NYHA-Klasse, des HI, der SvO<sub>2</sub> und des NT-proBNP sowohl was Erhöhung oder Erniedrigung der Werte und somit sowohl eine Verbesserung wie auch eine Verschlechterung der Prognose betrifft [38].

Einen ähnlichen Ansatz boten auch Fritz et. al. in ihrer Studie zur Vorhersage des 2-Jahres-Überlebens anhand baseline und Follow-up Untersuchungen des 6-MWT und der Plasmakonzentration des BNP [31]. Die eigene Arbeitsgruppe stellte heraus, dass eine deutliche Abnahme des PVR bei Patienten mit einer PAH innerhalb der ersten drei Monate eine bessere Prognose hinsichtlich des transplantationsfreien Überlebens vorhersagte [39].

### **1.6 Biomarker bei der pulmonalen Hypertonie**

Bisher gibt es keinen Biomarker zur Diagnose einer PH. Ein Biomarker, der klinische Relevanz haben sollte, muss in großen prospektiven Studien untersucht werden, wie es z.B. mit Markern für das akute Koronarsyndrom oder Herzversagen geschehen ist, bei deren Studien hunderte oder gar tausende Patientendaten eingeflossen sind. Solch eine Anzahl an Daten steht bisher aber für keinen Marker der PH zur Verfügung [40]. Viele Studien unterschiedlicher Größe und Ausrichtung haben jedoch Daten erhoben um verschiedene Marker für die PH zu untersuchen.

Dabei zeigte sich unter anderem, dass das N-terminale pro-natriuretisches Peptid Typ B (NT-proBNP) im Blut von Patienten mit PH aufgrund von systemischer Sklerose [41] und IPAH [42] erhöht war. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ein Ausgangswert des NT-pro-BNP von 1,256 pg/ml bei Diagnosestellung mit einem schlechteren Outcome verbunden war [43]. Es wurde ebenfalls herausgestellt, dass das NT-pro-BNP als Verlaufsparemeter zusätzliche Aussagen zur Prognose zulässt [43]. Allerdings wird normalerweise das NT-pro-BNP in den Vorhöfen synthetisiert wogegen bei Patienten mit Rechts- oder Linksherzhypertrophie auch beide Ventrikel der Ort der Synthese sein könnten. Die Werte des NT-pro-BNP Spiegels haben jedoch bei Patienten mit PAH und zusätzlicher Linksherzhypertrophie keinen spezifischen prognostischen Wert [44] und können auch bei einem akuten Atemnotsyndrom (ARDS) erhöht sein [45].

Troponin T und I sind seit langem etablierte Marker bei der Diagnosestellung akuter Koronarsyndrome [46]. Torbicki et al. haben Troponin T in einer kleinen Gruppe von Patienten mit einer schlechten Prognose bei Vorliegen einer PH in Verbindung gebracht. Dabei hatten Patienten mit einer schweren Form der PH unterschiedlicher Ätiologie mit nachweislich erhöhten Troponin-Spiegeln auch erhöhte Pulsfrequenzen, schlechtere gemischt-venöse Sauerstoffsättigungen, erhöhte NT-proBNP-Spiegel sowie kürzere Strecken im 6-Minuten-Gehtest (6-MWT) [47]. Die Patienten wiesen eine deutlich erhöhte Mortalität nach 6, 12 und 24 Monaten auf. Da das Troponin allerdings die Schädigung des Myokards anzeigt, ist es zur Erkennung der PH im Frühstadium wohl nicht geeignet [40]. Allerdings hat eine Studie den Nachweis von kardialen Troponin I mit einem hochsensitiven Test in Verbindung gebracht mit einem höheren Schweregrade der Erkrankung bei Patienten mit PAH sowie mit einem kürzeren transplantationsfreien Überleben [48].

Es gab auch hinsichtlich der Harnsäurekonzentration einige Studien, die zeigten, dass bei Patienten mit einer PH der Serumspiegel erhöht sein kann [49–52]. Eine Studie untersuchte dabei 90 Patienten mit einer RHK und Überprüfung der Harnsäurespiegel und nahm im Schnitt 31 Monate lang Vergleichswerte auf. Dabei wurde berichtet, dass Patienten mit einem hohen Harnsäurespiegel eine höhere Mortalität aufwiesen, als solche mit einem normalen Serumspiegel [53]. Der Harnsäurewert selbst ist jedoch abhängig von Alter und Geschlecht des Patienten und wird beeinflusst von der Nierenfunktion und diuretischer Einstellung des Patienten und bietet damit bei einer gewissen Gruppe von Patienten wohl nur eine Interpretationsmöglichkeit [11,40].

Endothelin-1 (ET-1) ist ein hochpotentes vasokonstriktives Zytokin mit proliferativer Wirkung [40,44]. Eine erhöhte Expression des ET-1-Gens in der Wand pulmonaler Arterien konnte bei Patienten mit IPAH gefunden werden [54], ebenso wie bei Patienten mit PH aufgrund einer COPD [55]. Außerdem zeigten synthetische Antagonisten des ET-Rezeptors positive Wirkung bei Patienten mit PAH [56,57]. Da das ET-1 im Blut nur eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist und ein großer Teil in der Lunge eliminiert wird, wodurch die Spiegel dort und im Blut sehr unterschiedlich sein können, ist es nicht als guter Marker einer PH geeignet [44]. Internationalen Richtlinien nach gehören die Messungen all dieser Biomarker bisher nicht zum diagnostischen Algorithmus bei dem Verdacht einer PH [1,14,17].

Eine jüngere Studie untersuchte das Vorhandensein von inflammatorischen Zytokinen bei der PAH. Dabei wurden 60 Patienten mit einer diagnostizierten PAH untersucht und prospektiv über 5 Jahre kontrolliert. Die Studie ergab eine Erhöhung einiger Zytokine wie IL-2,6,8,10 und 12p70 [58]. Ebenfalls zeigte sich, dass die Zytokine einen deutlichen Aussagewert bezüglich des Mortalitätsrisikos hatten. So fand sich bei einem Vergleich der Patienten mit einem IL-8 Spiegel von  $\leq 30,0$  pg/ml eine 1-Jahres-, 3-Jahres und 5-Jahres-Überlebensrate von 94,6 %, 72,5 % und 57,6 % gegenüber 70.0%, 40.0% und 32.0% bei Patienten mit Spiegeln von  $> 30,0$  pg/ml von [58].

Ein weiterer Marker im Rahmen der Beurteilung der IPAH ist der Growth differentiation factor-15 (GDF-15). Eine Untersuchung zeigte, dass Patienten mit einem GDF-15 Level  $< 1,200$ ng/l ein Mortalitätsrisiko oder das Risiko einer Lungentransplantation innerhalb eines Jahres von 3% hatten. Bei Patienten mit einem Level von  $\geq 1,200$  ng/l lag dieses Risiko bei 19%. Bezogen auf das 3-Jahres-Risiko lagen in einer Studie von Nickel et. al. die Werte für das Eintreten eines solchen Events bei 15% respektive 44 % [59].

Eine Untersuchung von Patienten mit PH bei systemischer Sklerose bestätigte die Erkenntnisse eines erhöhten GDF-15 auch gegenüber Patienten mit systemischer Sklerose ohne eine PH. Darüber hinaus waren die GDF-15 Spiegel in dieser Studie sogar noch höher als bei der Studie von Nickel et al., obwohl die hämodynamischen Parameter im Vergleich besser erschienen [60].

## 1.7 Therapie bei pulmonaler Hypertonie

Die Therapie der PH ist am besten definiert für den Teil der Patienten mit einer PAH. Diese Therapie ist multimodal und sollte den Einsatz allgemeiner Maßnahmen, die Nutzung verschiedener Medikamente sowie die Abwägung interventioneller oder operativer Maßnahmen (z.B. Transplantation) umfassen [17,61]. Je nach Schweregrad der Therapie und Ursache der PAH können dabei supportive Maßnahmen wie körperliches Training, Sauerstoff-Therapie, Antikoagulation und die Nutzung von Diuretika hilfreich sein [17,61].

Als PAH-spezifische Therapie stehen mehrere Pharmaka zur Verfügung. Diese umfassen vor allem Kalzium-Kanal-Blocker, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil), Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (v.a. Bosentan, Ambrisentan und Macitentan), Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase (Riociguat) und Prostanoiden (v.a. Iloprost, Epoprostenol, Treprostinil) [17,61]. Da die PAH weiter als nicht heilbare Erkrankung gilt und eine Monotherapie oftmals nicht dauerhaft ausreichend ist, hat eine Kombination der verschiedenen Wirkstoffen in den Therapieansätzen Einzug gehalten [61]. Vor allem Patienten mit einer CTEPH sollten lebenslang antikoaguliert werden [17]. Bislang fehlen leider bei weiteren Ätiologien der PH wie der pulmonal veno-okklusiven Erkrankung (PVOD), der PH aufgrund einer Linksherzerkrankung oder auf Basis chronischer Lungenerkrankungen spezifische Therapieansätze [15,17]. Für die Therapie der CTEPH ist die Operabilität (pulmonalen Endarteriektomie) zu prüfen und bei Nichtoperabilität sollte eine medikamentöse PH-spezifische Therapie erwogen werden, auch wenn für die CTEPH bislang keine Substanzen zugelassen sind [14].

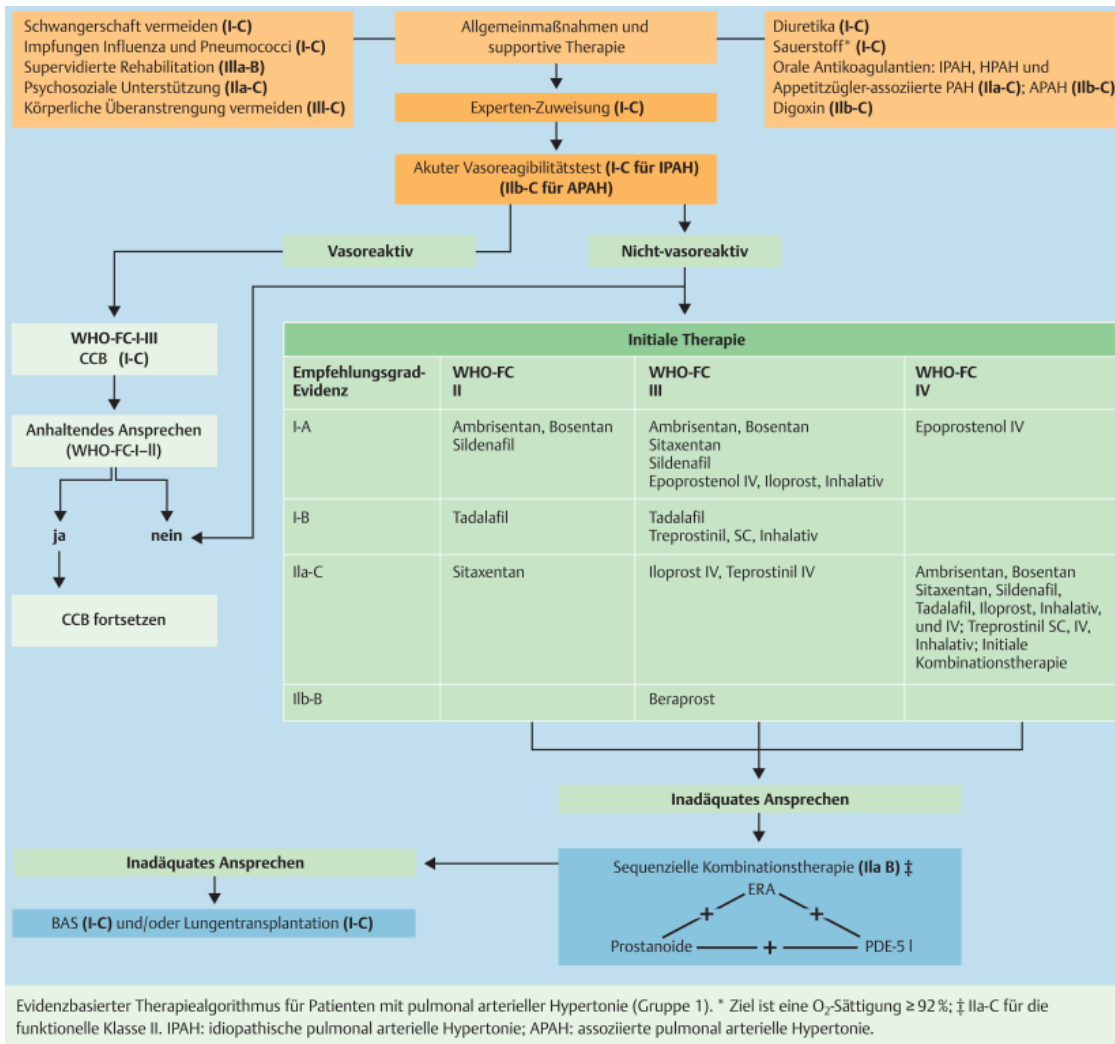


Abbildung 5 Evidenzbasierter Therapiealgorithmus für Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie (Gruppe 1) [14]

## **2 Ang-1/-2 und ihre potentielle Rolle in der Pathophysiologie der PH**

PH ist eine Erkrankung, der viele unterschiedliche Pathologien zugrunde liegen können. Die Symptome sind oft unspezifisch und umfassen dabei Belastungsdyspnoe, Thoraxschmerzen, Synkopen, Ödeme und ggf. eine Zunahme des Bauchumfanges oder ein systolisches Strömungsgeräusch links parasternal [15]. Eine mögliche non-invasive Untersuchungsmethode ist die TTE [1]. Allerdings weicht der per TTE erfasste PAP teilweise > 10 mmHg von dem invasiv bestimmten systolischen PAP ab [62,63]. So ist eine PH bislang weiter nur invasiv mittels RHK sicher zu diagnostizieren [1,14].

Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich diese Studie mit der Suche nach einer Möglichkeit, eine einfache und flächendeckend komplikationslos anwendbare Alternative zur Diagnose der PH oder der Abschätzung des Schweregrades der Erkrankung zu finden. Als Ansatz entschieden wir uns zur Suche nach im Blut nachweisbaren Biomarkern. Als primärer Faktor der Krankheitsentstehung wird eine Fehlfunktion des Endothels angenommen [6], die über verschiedene Mechanismen zu einer Mediahypertrophie führt [7,8]. Es entstehen Ungleichgewichte zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation, Aktivierung und Inhibierung des Wachstums glatter Muskelzellen, prothrombotischer und antithrombotischer Mediatoren sowie proinflammatorischer und antiinflammatorischer Signale [10,17]. Histologisch können dabei Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in sehr kleine pulmonale Arteriolen nachgewiesen werden, die normalerweise nur wenig Muskulatur aufweisen [7,8,64].

Angiopoietin-1 (Ang-1) gehört zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren [10], ebenso wie Angiopoietin-2 (Ang-2). Sie ähneln sich in ihrer Aminosäurestruktur zu etwa 60 % [65]. Es sind beides Proteine, die trotz unterschiedlicher Aufgaben eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen. Die Wirkung an Endothelzellen (EC) wird über die 2 Tyrosinkinasen Tie1 und Tie2, davon vor allem Tie2, und durch Bindungen der Liganden zu verschiedenen Integrinen vermittelt [66]. Verschiedene Signaltransduktionswege der Tie1 und Tie2 – Rezeptoren wurden untersucht und als verantwortlich für die Wirkungen der zu untersuchenden Liganden auf vor allem EC bezeichnet, darunter über die „Phosphatidylinositol-3-kinase“ ((PI3K)/Akt)[67], sowie das „Ras homologe Gene Typ A“ (RhoA)- und das „Ras-related C3 botulinum toxin Substrat 1“ (Rac1) – System [68].

Auch die Aktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) wurden als beteiligte Kinasen bei der Wirkung der Angiopoietine nachgewiesen [Abbildung 5] [67]. Ang-1 stabilisiert in seiner Funktion neu gebildete Blutgefäße, indem es Wandzellen rekrutiert. Weiterhin unterstützt es über verschiedene Signalwege die Stabilität voll entwickelter Gefäße [69]. Wie wichtig Ang-1 für die Ausbildung von Gefäßen ist, zeigten schon früh Versuche mit Knock-Out-Mäusen, denen es an Ang-1 mangelt. Diese sterben im jungen Embryonalalter. Zwar wiesen sie Gefäßbildung auf, diese war jedoch strukturell nicht gefestigt, es gab vermindert kleine Gefäßzweige und generell nur wenige Aufteilungen [70]. In-vitro Versuche zeigten ebenfalls die fördernde Wirkung von Ang-1 und auch Ang-2 auf die Ausbildung gefäßähnlicher Röhrenstrukturen [71].

Obgleich die Funktionswege von Ang-2 nicht vollkommen geklärt sind, gibt es entsprechende Ergebnisse für die positive Beteiligung oder gar Notwendigkeit von Ang-2 bei der Bildung und Erhaltung postnataler Gefäße [65,71–73]. Auf zellulärer Basis wurden im Zusammenspiel mit Vascular endothelial growth factors (VEGF) die Wirkungen von Ang-1 auf der einen Seite als Stabilisator gebildeter Gefäße und Ang-2 auf der anderen Seite als beteiligtes Protein bei der Destabilisierung und der Sprossung von Gefäßzweigen bei der Neovaskularisation beschrieben [70,74] [Abbildung 5]. Eine weitere Studie zeigte, dass Ang-1 und Ang-2 über Tie2 zur Freisetzung des plättchenaktivierenden Faktors (PAF) durch das Endothel führen und somit proinflammatorische Vorgänge unterstützen können [Abbildung 6] [67]. Wichtig scheint dabei eine genaue Kontrolle der Expression der beiden Proteine und ein entsprechendes Gleichgewicht zu sein, um Gefäße generell aber auch die Entwicklung des Gefäßbettes in der Lunge zu stabilisieren [75,76].

Aufgrund der vielfältigen Veränderungen am Gefäßbett bei der PH und den diversen untersuchten Einflüssen der Liganden Ang-1 und Ang-2 auf die Angiogenese, Stabilisierung von Gefäßen oder das Remodelling, ist ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einem vermehrten Vorkommen der Proteine bei erkrankten Patienten eine naheliegende Fragestellung. Ang-2 wurde in seiner Funktion als Protein, welches die Gefäßneubildung unterstützt, bereits in verschiedenen Krebserkrankungen als erhöht nachgewiesen [77,79]. So konnte gezeigt werden, dass scheinbar Tumorzellen selbst in der Lage sind Ang-2 zu produzieren, so wie es auch EC tun [77]. Ang1 wurde in Zusammenhang mit einer erhöhten Angiogenese bei Brustkrebs gesetzt [80], ebenso wie erhöhte Spiegel von Ang-1 aber auch Ang-2 bei Patienten mit Hypertonie nachgewiesen wurden [81,82].



In diesem Zusammenhang wurde Ang-2 beispielsweise auch als prognostischer Parameter zur Risikoabschätzung untersucht [83]. Es gibt einige Untersuchungen des Zusammenhangs von Ang-1 und der PH mit dem Ergebnis erhöhter Spiegel bei Patienten mit IPAH [69] und anderen Formen einer PH [84]. Tierversuche zeigten aber sowohl, dass ein erhöhter Ang-1-Spiegel eher protektiv hinsichtlich experimentell induzierter PH sein kann [85], als auch, dass Ang-1 scheinbar über einen Ang-1/TIE2/Serotonin-Signalweg eine Proliferation von glatten Muskelzellen hervorruft und somit als verantwortlich für die Entstehung einer PH angesehen werden kann [86]. In Verbindung mit IPAH wurden Ergebnisse veröffentlicht, nach denen vor allem Ang-2 an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein kann und dass es als Marker für die Schwere der Erkrankung oder aber als Verlaufskontrolle unter Behandlung dienen könnte [69].

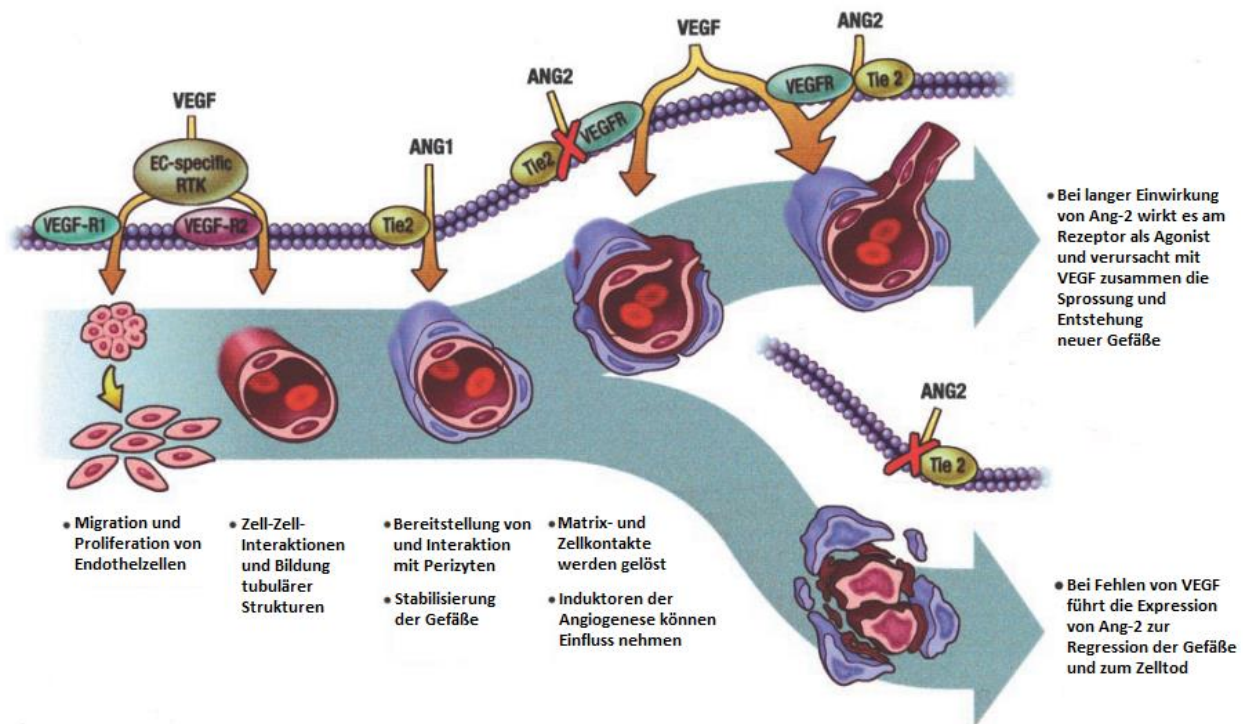


Abbildung 6 Regulation der Angiogenese. VEGF induziert die Vaskularisation und die Proliferation von EC auf unterschiedliche Stimuli hin. Die Interaktion von Ang-1 mit seinem Rezeptor TIE2 führt zu einer Stabilisierung der neugebildeten Gefäße über die Aktivierung von Perizyten/Endothelzellen. Ang-2 wiederum wirkt teilweise als Antagonist, lockert die Gefäßstruktur auf und ermöglicht das Einwirken angiogenetischer Induktoren wie VEGF. Unter Einwirkung von Ang-2 und VEGF migrieren und proliferieren die Endothelzellen und bilden so neue Kapillarsprossen und Gefäße. Fehlt VEGF führt die alleinige Wirkung von Ang-2 zur Rückbildung der Gefäße und zur Apoptose.

Übersetzung und Anpassung nach [87]

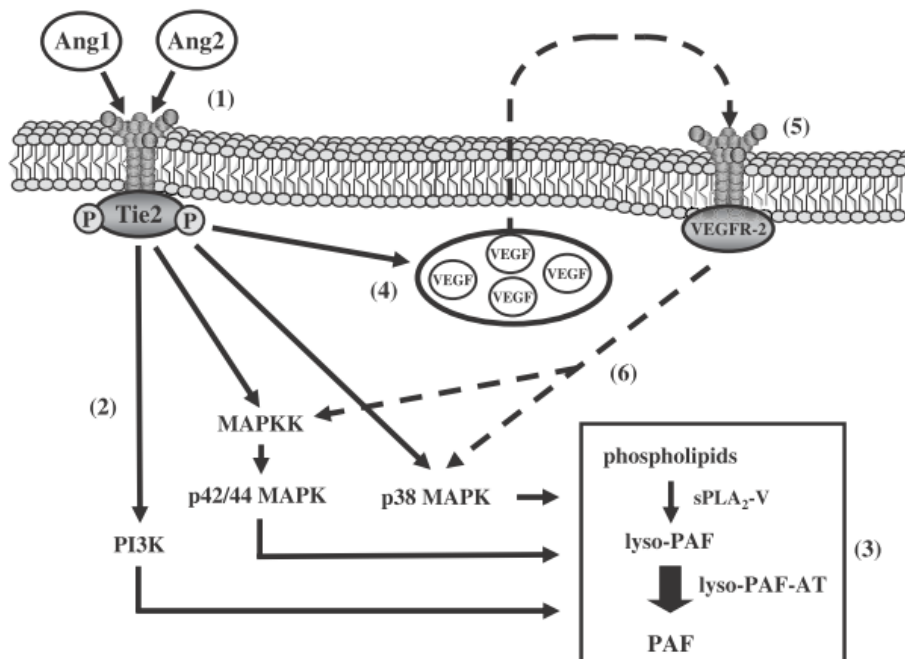


Abbildung 7 Mechanismus, der als verantwortlich für die Angiopoietin-vermittelte Aktivierung der Synthese des PAF durch EC gesehen wird. Stimulation der TIE2 durch Ang-1 oder Ang-2 (1) führen zu einer Aktivierung der PI3K, p42/44 MAPK, and p38 MAPK Signalwege (2). Diese induzieren über die Phospholipase A<sub>2</sub> die endotheliale PAF-Synthese (3). Ein noch unbekannter Mechanismus steigert über die Aktivierung der TIE2 die Relokalisation des VEGF an die Zellmembran, wo er an den VEGF-Rezeptor-2 bindet (5). Diese Bindung führt seinerseits zu einer Aktivierung von p38 and p42/44 MAPK (6) und der endothelialien PAF-Synthese, wodurch die Angiopoietin-vermittelte PAF Synthese potenziert wird. Nach Maliba et. al. [67]

## 2.1 Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, einen Biomarker im Plasma der Patienten nachzuweisen, der entweder diagnostische oder prognostische Informationen über die pulmonale Hypertonie aufzeigt, bzw. eine Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung zulässt. Dies soll der Vereinfachung der Diagnostik/ Therapieplanung/ Verlaufsbeobachtung dienen. In Frage kommende Biomarker werden mit Hilfe eines Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf eventuelle Normwert-Verschiebungen, die mit der klinischen Symptomatik der Patienten korrelieren, untersucht. Die vorliegende Studie beinhaltet daher eine retrospektive Untersuchung der Proteine Ang-1 und Ang-2 im Hinblick darauf, ob sie geeignet sind zur Diagnose der PH, als prognostischer Marker genutzt werden können oder Aussagekraft zum Schweregrade der Erkrankung besitzen.

### 3 Material und Methoden

Von allen Patienten, die in der Ambulanz für pulmonale Hypertonie an der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießens mittels Rechtsherzkatheter untersucht wurden, hat man im Zuge der Feststellung der Erstdiagnose oder des Ausschlusses der Diagnose einer PH gemischt-venöse Blutproben aus der Arteria pulmonalis (A. pulmonalis) entnommen. Als Diagnose-Kriterium gilt ein MPAP von  $\geq 25$  mmHg. Alle Proben umfassen dabei Entnahmematerial aus der jeweiligen Erstuntersuchung mittels RHK, also vor Beginn einer spezifischen Therapie.

#### 3.1 Material

Name	Hersteller
Human Angiopoietin-1 Quantikine® ELISA	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Human Angiopoietin-2 Quantikine® ELISA	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Photometer Infinite M200Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 46RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Thriller Thermo-Inkubationsmischer Peqlab	Erlangen, Deutschland
Wipptisch Mini Rocker Shaker MR-1	Biosan, Riga, Lettland

#### 3.2 Methoden

##### 3.2.1 Rechtsherzkatheter

Am Uniklinikum Gießen wird die RHK mittels Seldinger Technik durchgeführt. Für gewöhnlich wird dabei ein zentralvenöser Zugang über die Vena jugularis interna (V. jug. int.) geschaffen, über den ein mehrlumiger 7 French Messkatheter vom Swan Ganz Typ vorgeschoben werden kann. An der Spitze des Katheters befindet sich ein Ballon, der aufgeblasen wird sobald der Katheter sicher bis in die Vena cava superior (VCS) vorgeschoben wurde. Über diesen Ballon kann der Katheter leichter mit dem Blutstrom über die VCS durch den rechten Vorhof und die Trikuspidalklappe, den rechten Ventrikel sowie die Pulmonalklappe und letztlich über den Truncus pulmonalis in einer A. pulmonalis platziert werden. Das Vorschieben des Katheters erfolgt dabei über ständige Lagekontrolle der Katheterspitze anhand der abgeleiteten Druckkurve, die sowohl für den rechten Vorhof, Ventrikel sowie die A. pulmonalis einen typischen Verlauf zeigt.

Ist man in einer A. pulmonalis angelangt so wird der Katheter mit aufgeblasenem Ballon vorsichtig weiter vorgeschoben bis er diese komplett verschließt. In diesem Moment flacht die Druckkurve in ihrem Verlauf und in der Regel in der Höhe der gemessenen Werte ab. In dieser Position wird nun der pulmonalarterielle Verschlussdruck (pulmonary arterial wedge pressure (engl.; PAWP)) gemessen, anhand dessen sich der linksatriale Druck abschätzen lässt. Nach Erfassung dieses Wertes wird der Ballon entblockt und der Katheter ein kleines Stück zurückgezogen um einen ungewollten Verschluss des Gefäßabschnittes zu vermeiden. Während der Untersuchung werden nun über Blutentnahmen die Blutgase und über den Katheter selbst hämodynamische Parameter erfasst, die zur Diagnosestellung herangezogen werden können.

### **3.2.2 Abnahme und Aufbewahrung der Patientenproben**

Während der RHK werden dem Patienten parallel zur Erfassung der hämodynamischen Werte mittels des Katheters Blutproben aus der Arteria pulmonalis per EDTA-Röhrchen entnommen, welche unmittelbar im Anschluss daran auf Eis gelagert werden. Binnen 45 Minuten nach Entnahme werden die Proben dann bei 3000 Umdrehungen pro Minute (RPM) zentrifugiert und auf je 4 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße aus Polypropylen (PP) aliquotiert. Im Anschluss an diesen Arbeitsschritt werden die gewonnenen Proben mit der Untersuchungsnummer versehen, anhand derer sie innerhalb der Datenbank der Abteilung den Patienten und somit der Diagnose zugeordnet werden können. Alle Proben werden dann bei -80 °C eingefroren gelagert, bevor sie für die entsprechenden Untersuchungen herangezogen werden.

### **3.2.3 Datenerhebung und Messmethoden**

Zur Quantifizierung der Konzentration von Ang-1 und Ang-2 im Patientenplasma wurden die entsprechenden Patientenproben ohne Kenntnis der Identität oder andere Details der Patienten aus den entsprechenden Tiefkühlschränken herausgenommen und aufgetaut. Die Untersuchung der Proben erfolgte unter Zuhilfenahme von Sandwich-Elisa Test der Firma R&D Systems ® (Minneapolis, MN, USA) entsprechend der Herstellerangaben zur Verwendung der Tests.

### **3.3 Statistik**

Die allgemeine Erhebung sowie die erste grafische Darstellung der Daten wurde durchgeführt unter der Nutzung von Microsoft Excel 2007 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Die erhobenen Daten wurden anschließend zur statistischen Auswertung mit SPSS (Version 22, IBM, Ehningen, Deutschland) weiterverarbeitet. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde dabei als statistisch signifikant festgelegt. Der Korrelationskoeffizient wurde nach Pearson berechnet. Normalverteilte Daten werden als Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung (SD)), nicht-normalverteilte Daten als Median [Interquartil Range (IQR)] angegeben. Zum Vergleich unterschiedlicher Gruppen wurden der ANOVA-, Kruskal-Wallis- oder der Mann-Whitney U Test angewendet. Die Kaplan-Meier-Methode wurde zur Überlebensanalyse unserer Untersuchungs-Gruppen herangezogen. Anschließend wurde eine Cox-Regressions-Analyse durchgeführt. Weiterhin wurde eine multivariable Analyse unter Hinzunahme weiterer Parameter wie dem Alter, Geschlecht oder der Hämodynamik durchgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Kollektiv**

#### **4.1.1 Patientenkollektiv bezüglich Angiotensin-1**

Das Patientenkollektiv zur Untersuchung von Ang-1 umfasst 216 Patienten. Die Subgruppen umfassen 42 Patienten mit einer IPAH, 46 Patienten mit der Diagnose einer CTEPH, 43 Patienten mit der Diagnose der kollagen-vaskulär assoziierten pulmonalen Hypertonie (CVD) und 44 Patienten mit einer pulmonal-venösen Hypertonie (PVH). Darüber hinaus gibt es eine Kontrollgruppe mit 41 Patienten, bei der mittels Rechtsherzkatheter die Diagnosekriterien der PH nicht erfüllt wurden.

#### **4.1.2 Patientenkollektiv bezüglich Angiotensin-2**

Bezüglich der Untersuchung auf Ang-2 umfasst das Patientenkollektiv insgesamt 196 Patienten. 39 Patienten mit einer IPAH sind erfasst, 40 Patienten mit der Diagnose CVD. An CTEPH erkrankt sind 42 Patienten und weitere 40 Patienten mit der Diagnose PVH sind enthalten. Die Kontrollgruppe hat hier eine Größe von 35 Patienten.

### **4.2 Basisdaten**

Zunächst haben wir retrospektiv vor allem funktionelle (6-MWT) und hämodynamische (MPAP, PAWP, Herzzeitvolumen (HZV), HI und PVR) Parameter der Patienten, deren Proben ausgewählt wurden, recherchiert. Daten, die nicht in zeitlich direktem Zusammenhang mit der RHK standen, wurden nicht in die statistische Auswertung übernommen. Alle Daten werden mit dem Mittelwert ( $\pm$  SD) bei normalverteilten Parametern oder mit dem Median [IQR] bei nicht normalverteilten Parametern angegeben.

#### 4.2.1 Basisdaten der Population bei Angiopoietin-1

Insgesamt wurden für die Analyse im Hinblick auf Ang-1 192 Patientenproben untersucht, wobei 41 Proben auf die Kontrollgruppe fielen. Letztlich wurden 151 Proben untersucht, die Patienten zuzuordnen waren, bei denen nach der ersten RHK eine PH diagnostiziert wurde. Bei diesem Kollektiv herrschte ein Verhältnis von Frauen: Männern von ca. 1,67:1. 42 Patienten waren ihren Beschwerden nach der NYHA-Klasse II zuzuordnen. 85 Patienten gehörten in die NYHA-Klasse III und 21 Patienten in NYHA IV, bei 3 Patienten waren keine Angaben zur NYHA-Klasse gespeichert. Die erfassten Daten der erkrankten Patienten (N=151) bezüglich des 6-MWT und der Hämodynamik sind in der Tabelle 1 angegeben.

gesamtes Patientenkollektiv				
Parameter	Einheit	N	Mittelwert/Median	(±SD) / [IQR]
6-MWT	m	134	322	(119)
MPAP	mmHg	151	43	(12)
PAWP	mmHg	173	9	[7,00]
HZV	l/min.	173	4,40	(1,14)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	173	2,37	(0,58)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	173	549	[465]

Tabelle 1 Basisdaten des erkrankten Patientenkollektivs bei Ang-1

Die Subgruppen dieses Kollektivs umfasste 39 Patienten mit einer IPAH, 41 Patienten mit CTEPH, 39 Patienten mit der Diagnose der kollagen-vaskulär assoziierten Pulmonalen Hypertonie (CVD) und 32 Patienten mit einer pulmonal-venösen Hypertonie (PVH). Zum Zeitpunkt der Datenrecherche waren 26 Patienten verstorben, 124 wurden als überlebend geführt und bei 1 Patienten war der Status nicht geklärt. Eine genauere Auflistung der Basisdaten der jeweiligen Subgruppen findet sich in Tabelle 2.

<b>IPAH</b>				
<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert/Median</b>	<b>(± SD) / [IQR]</b>
6-MWT	m	39	351	(131)
MPAP	mmHg	39	47	(15)
PAWP	mmHg	39	8,00	[5,00]
HZV	l/min.	39	4,11	(0,98)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	39	2,25	(0,56)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	39	725	[527]
<b>CVD</b>				
6-MWT	m	34	307	(134)
MPAP	mmHg	39	44	(11)
PAWP	mmHg	39		[5]
HZV	l/min.	39	4,22	(0,95)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	39	2,37	(0,51)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	39	670	[497]
<b>CTEPH</b>				
6-MWT	m	36	321	(101)
MPAP	mmHg	41	41	(10)
PAWP	mmHg	41	9	[5]
HZV	l/min.	41	4,43	(1,28)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	41	2,29	(0,60)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	41	512	[425]
<b>PVH</b>				
6-MWT	m	25	299	(97)
MPAP	mmHg	32	32	(10)
PAWP	mmHg	32	18	[9]
HZV	l/min.	32	4,93	(1,22)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	32	2,61	(0,60)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	32	312x	[262]

Tabelle 2 Basisdaten der Subgruppen bei Angiotensin II



#### 4.2.2 Basisdaten der Population bei Angiotensin-2

Bei unserem 2. Marker, Ang-2, haben wir insgesamt 172 Patientenproben untersucht, wobei 35 Proben der Kontrollgruppe angehörten. 137 Patienten diagnostizierte man eine PH unterschiedlicher Ätiologien. In diesem Kollektiv bestand ein Verhältnis von Frauen:Männern von ca. 1,65:1. 38 Patienten waren ihren Beschwerden nach der NYHA-Klasse II zuzuordnen, 73 Patienten der NYHA-Klasse III und 24 Patienten der NYHA Klasse IV, bei 2 Patienten wurden keine entsprechenden Angaben dokumentiert. Die Basisdaten der erkrankten Patienten exklusive der Kontrollen sind in der Tabelle 3 angegeben. Die Parameter aufgetrennt nach den Subgruppen finden sich in Tabelle 4.

gesamtes Patientenkollektiv				
Parameter	Einheit	N	Mittelwert/Median	(± SD) / [IQR]
6-MWT	m	121	324	(124)
MPAP	mmHg	137	43	(12)
PAWP	mmHg	137	9	[7]
HZV	l/min.	137	4,38	(1,11)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	137	2,36	(0,55
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	137	533	[462]

Tabelle 3 Basisdaten des erkrankten Patientenkollektivs bei Ang-2

Das Patientenkollektiv hinsichtlich Ang-2 ist wie folgt zusammengesetzt: 36 Patienten mit einer IPAH, 36 Patienten mit CTEPH, 38 Patienten mit der Diagnose der kollagen-vaskulär assoziierten Pulmonalen Hypertonie (CVD) und 27 Patienten mit einer pulmonal-venösen Hypertonie (PVH). 22 Patienten waren zum Zeitpunkt der Recherche verstorben, 114 wurden geführt als überlebend und bei 1 Patienten war der Status nicht geklärt.

<b>IPAH</b>				
<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert/Median</b>	<b>(± SD) / [IQR]</b>
6-MWT	m	35	356	(136)
MPAP	mmHg	36	48	(15)
PAWP	mmHg	36	8	[5]
HZV	l/min.	36	4,10	(1,02)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	36	2,24	(0,57)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	36	726	[551]
<b>CVD</b>				
6-MWT	m	31	312	(133)
MPAP	mmHg	36	43	(11)
PAWP	mmHg	36	6	[5]
HZV	l/min.	36	4,25	(0,94)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	36	2,37	(0,52)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	36	636	[498]
<b>CTEPH</b>				
6-MWT	m	34	310	(116)
MPAP	mmHg	38	41	(11)
PAWP	mmHg	38	9	[5]
HZV	l/min.	38	4,39	(1,13)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	38	2,29	(0,50)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	38	482	[420]
<b>PVH</b>				
6-MWT	m	21	313	(94)
MPAP	mmHg	27	38	(10)
PAWP	mmHg	27	18	[9]
HZV	l/min.	27	4,92	(1,26)
HI	(l/min.)/m <sup>2</sup>	27	2,58	(0,60)
PVR	dyn * sek / cm <sup>5</sup>	27	306	[302]

Tabelle 4 Basisdaten der Subgruppen bei Angiotensin 2

### 4.3 Konzentrationsverteilung der Plasmaspiegel von Angiotensin-1 und Angiotensin-2

Unsere Ergebnisse zeigen beide Biomarker, also sowohl Angiotensin 1 als auch Angiotensin 2, in ihrer Plasmakonzentration über das gesamte Kollektiv, inklusive der Kontrollgruppe, linksverteilt [Abbildungen 7 und 8]. Angiotensin 1 weist Konzentrationen von 500 pg/ml bis hin zu 18125 pg/ml, Median 3491 pg/ml [IQR 4272].

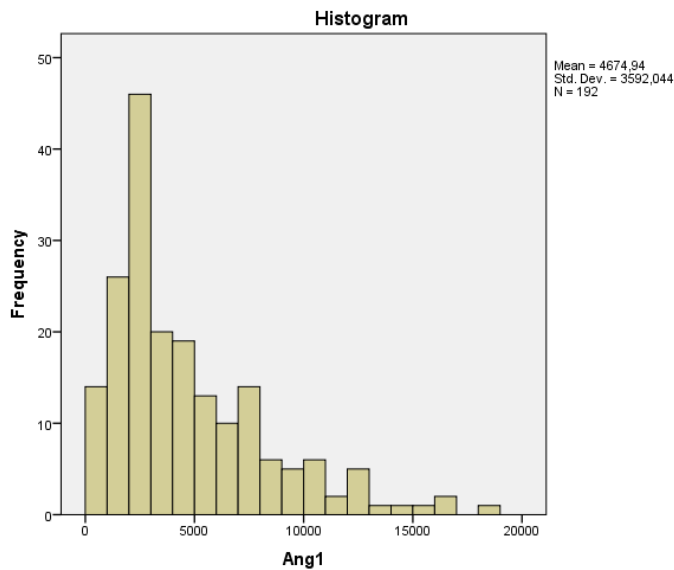


Abbildung 8 linksverteilte Plasmakonzentrationen von Angiotensin 1

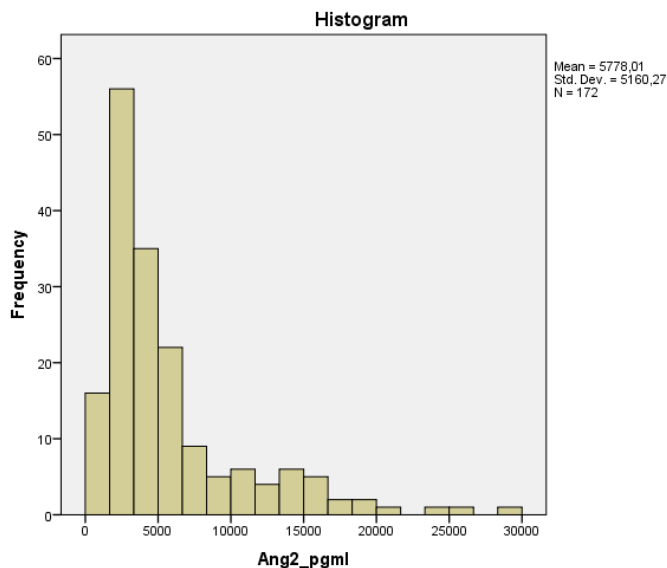


Abbildung 9 linksverteilte Plasmakonzentrationen von Angiotensin 2

Die Höhe der Ang-2 Werte in den verwendeten Plasma-Proben reicht von einem Minimum von 1026 pg/ml bis zu einem Maximum von 29624 pg/ml, Median 3711 pg/ml [4219]. Weiterführende statistische Tests wurden entsprechend mit dem natürlich logarithmierten Wert der Plasma Konzentrationen von Angiotensin (LN Ang) durchgeführt.

#### 4.4 Konzentrationen der einzelnen Gruppen

<b>Ang-1</b>	<b>IPAH</b>	Mittelwert	4358
		Median	2849
		Minimum	500
		Maximum	18125
		SD	3782
		IQR	3982
	<b>CVD</b>	Mittelwert	4986
		Median	3131
		Minimum	500
		Maximum	12999
		SD	3841
		IQR	6645
	<b>CTEPH</b>	Mittelwert	5160
		Median	3525
		Minimum	500
		Maximum	16718
		SD	4354
		IQR	4226
	<b>PVH</b>	Mittelwert	4303
		Median	3759
		Minimum	500
		Maximum	13611
		SD	3157
		IQR	4316
<b>Kontrolle</b>	Mittelwert	4485	
	Median	3908	
	Minimum	500	
	Maximum	11800	
	SD	2595	
	IQR	3697	

Tabelle 5 Konzentrationen von Ang-1 in den untersuchten Gruppen in pg/ml

In den Tabellen 5 und 6 finden sich Details zu den Plasma-Konzentrationen von Ang-1 und Ang-2 der einzelnen in dieser Studie untersuchten Gruppen. Bei allen Gruppen fällt eine sehr große Spanne zwischen der minimalen und der maximalen Konzentrationen auf.

<b>Ang-2</b>	<b>IPAH</b>	Mittelwert	5193
		Median	3797
		Minimum	1430
		Maximum	21283
		SD	4050
		IQR	3810
	<b>CVD</b>	Mittelwert	8062
		Median	5287
		Minimum	1575
		Maximum	244880
		SD	6266
		IQR	10264
	<b>CTEPH</b>	Mittelwert	5022
		Median	3943
		Minimum	1026
		Maximum	17252
		SD	3846
		IQR	3584
	<b>PVH</b>	Mittelwert	7803
		Median	5874
		Minimum	1379
		Maximum	29624
		SD	7065
		IQR	7561
<b>Kontrolle</b>	Mittelwert	3290	
	Median	2645	
	Minimum	1240	
	Maximum	12619	
	SD	2491	
	IQR	1708	

Tabelle 6 Konzentrationen von Ang-2 in den untersuchten Gruppen in pg/ml

## 4.5 Keine Unterschiede in den Konzentrationen hinsichtlich des Geschlechts, wohl aber zwischen den NYHA-Klassen

Unsere Studie kann weder bei Ang-1 noch bei Ang-2 einen signifikanten Unterschied in den Konzentrationen von Männern und Frauen im Vergleich herausstellen ( $p=0,727$ ). Jedoch haben wir im non-parametrischen Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen NYHA-Klassen festgestellt ( $p=0,022$ ) [Abbildung 9].

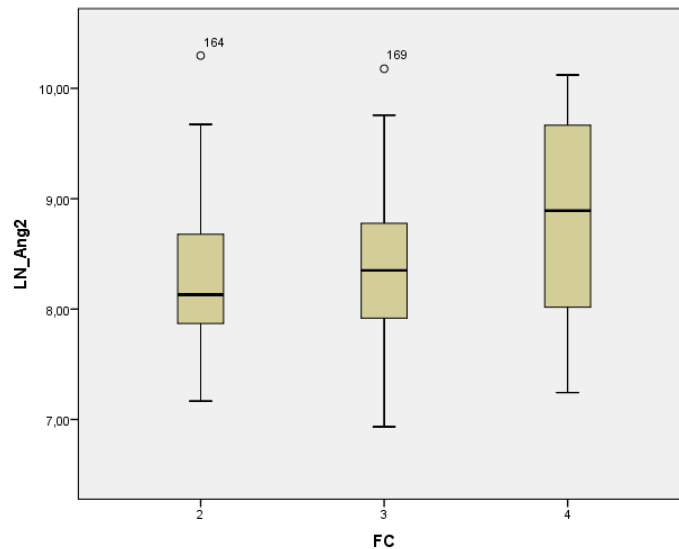


Abbildung 10 Arithmetisches Mittel des LN Ang-2 bezogen auf die NYHA-Klassen des Kollektivs

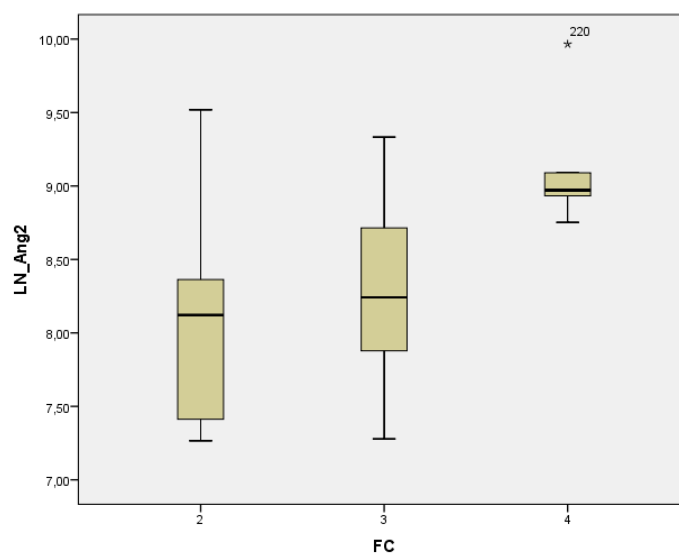


Abbildung 11 Arithmetisches Mittel des LN Ang-2 bezogen auf die NYHA-Klassen der IPAH-Patienten

Diesen Zusammenhang können wir noch deutlicher innerhalb der Gruppe der Patienten mit einer IPAH darstellen ( $p=0,009$ ) [Abbildung 10].

## 4.6 Angiotensin-2 Konzentration signifikant erhöht bei CVD und PVH, nicht jedoch Angiotensin-1

Die statistische Auswertung der Konzentrationen von Ang-2 zeigt im Anova-Test einen signifikanten Unterschied innerhalb der untersuchten Gruppen ( $p=0,000$ ). Der Tukey-HSD post hoc test ergibt dabei einen signifikanten Unterschied der Konzentration von Ang-2 Patientengruppe der CVD, 5287 pg/ml [10.264]  $p<0,001$ , und der PVH, 5874 pg/ml [7561]  $p=0,001$ , gegenüber der Kontrollgruppe, 2645 pg/ml [1708] [Abbildung 11]. In unserer Studie scheint Ang-2 als diagnostischer Marker bei CVD und PVH geeignet.

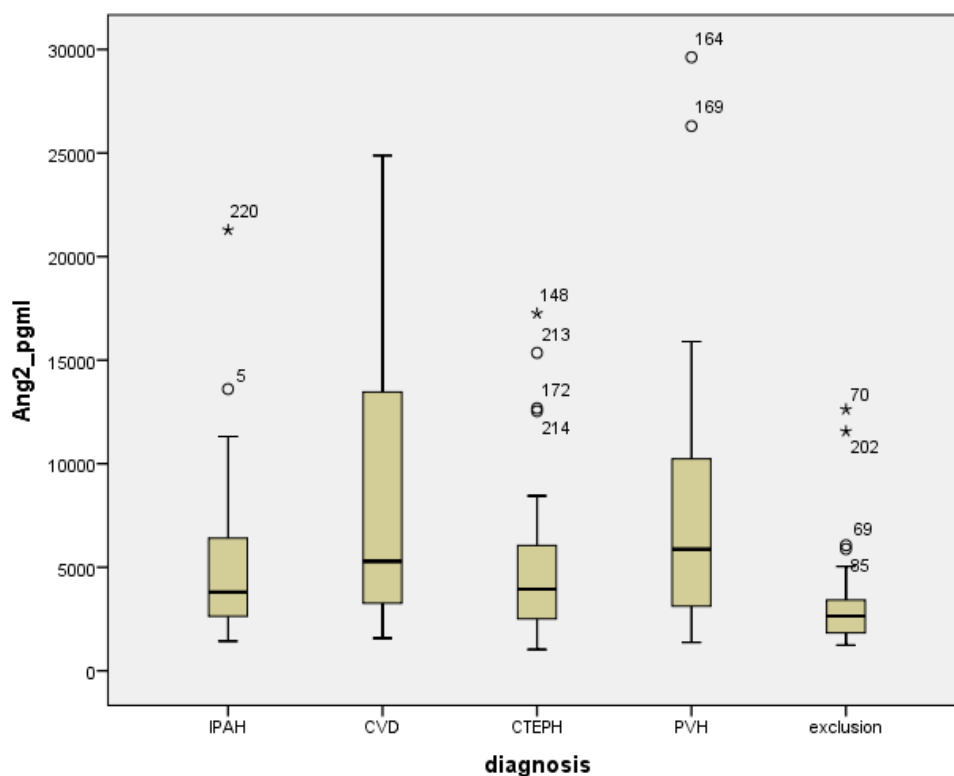


Abbildung 12 Boxplots der Konzentrationen von Ang-2 bei Patienten mit IPAH (n=36), CVD (n=38), CTEPH (n=36), PVH (n=27) und nach invasivem Ausschluss einer PH (n=35). Signifikant höhere Ang-2 Konzentrationen bei CVD ( $p < 0,001$ ) und PVH ( $p=0,001$ ) gegenüber der Ausschlussgruppe

Es finden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakonzentration der Patienten mit IPAH, 3797 pg/ml [3810], oder einer CTEPH 3943 pg/ml [3584] im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch der Tukey HSD post hoc Test ergibt ansonsten keine signifikanten Unterschiede der LN Ang-2 zwischen den einzelnen Gruppen [Tabelle 7].

Abhängige Variable			Signifikanz	95 % Confidence Intervall	
				Untergrenze	Obergrenze
LN_Ang2	IPAH	CVD	,179	-,8206	,0892
		CTEPH	,999	-,4083	,4895
		PVH	,424	-,7981	,1847
		Kontrolle	,120	-,0594	,8569
	CVD	IPAH	,179	-,0892	,8206
		CTEPH	,096	-,0426	,8552
		PVH	,997	-,4323	,5504
		Kontrolle	,000	,3063	1,2226
	CTEPH	IPAH	,999	-,4895	,4083
		CVD	,096	-,8552	,0426
		PVH	,284	-,8331	,1385
		Kontrolle	,191	-,0940	,8103
	PVH	IPAH	,424	-,1847	,7981
		CVD	,997	-,5504	,4323
		CTEPH	,284	-,1385	,8331
		Kontrolle	,001	-,2111	1,1998
	Kontrolle	IPAH	,120	-,8569	,0594
		CVD	,000	-1,2226	-,3063
		CTEPH	,191	-,8103	,0940
		PVH	,001	-1,1998	,2111

Tabelle 7 Tukey HSD post hoc Test des Unterschieds des LN Ang-2 der verschiedenen Gruppen zueinander

Bei der Auswertung der Ang-1 Konzentrationen im Vergleich zwischen den einzelnen Erkrankungsgruppen und auch der einzelnen Gruppen mit der Kontrolle können wir ebenfalls keinerlei signifikanten Unterschiede feststellen [Abbildung 12].



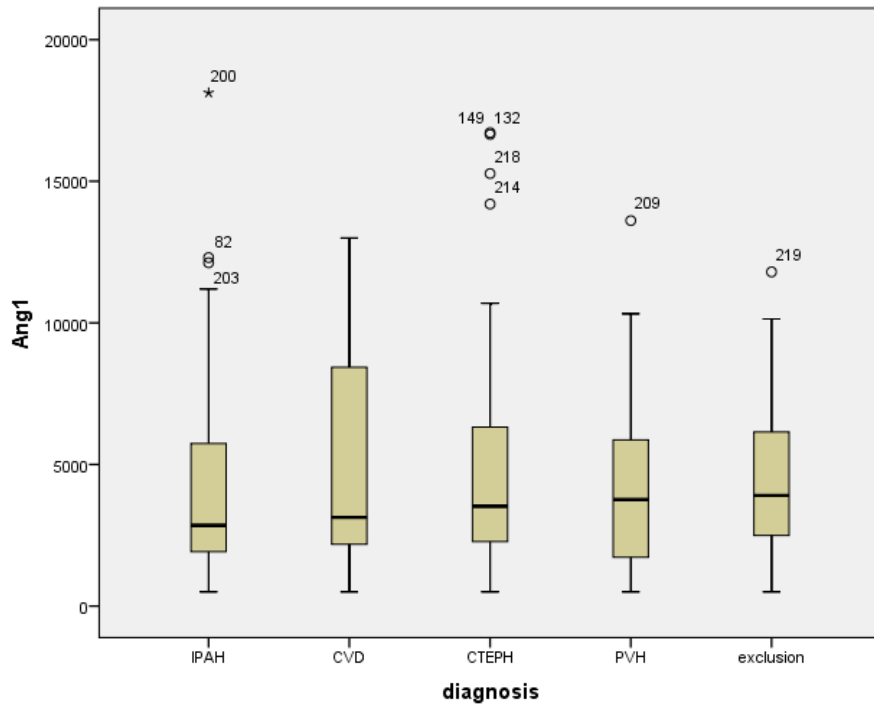


Abbildung 13 Boxplots der Konzentrationen von Ang-1 bei Patienten mit IPAH (n=39), CVD (n=39), CTEPH (n=41), PVH (n=32) und bei invasivem Ausschluss einer PH (n=41).

#### 4.7 Starke Korrelation des LN Angiotensin-2 mit der Hämodynamik des Gesamtkollektivs

Wir können statistisch hochsignifikante Korrelationen des LN Ang-2 in Bezug auf die hämodynamischen Parameter, die bei den Patienten ermittelt wurden, feststellen. Den Abbildungen 13 und 14 ist zu entnehmen, dass wir eine deutliche Korrelation zwischen dem LN Ang-2 und dem PVR ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,323$ ) sowie dem MPAP ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,359$ ) finden.

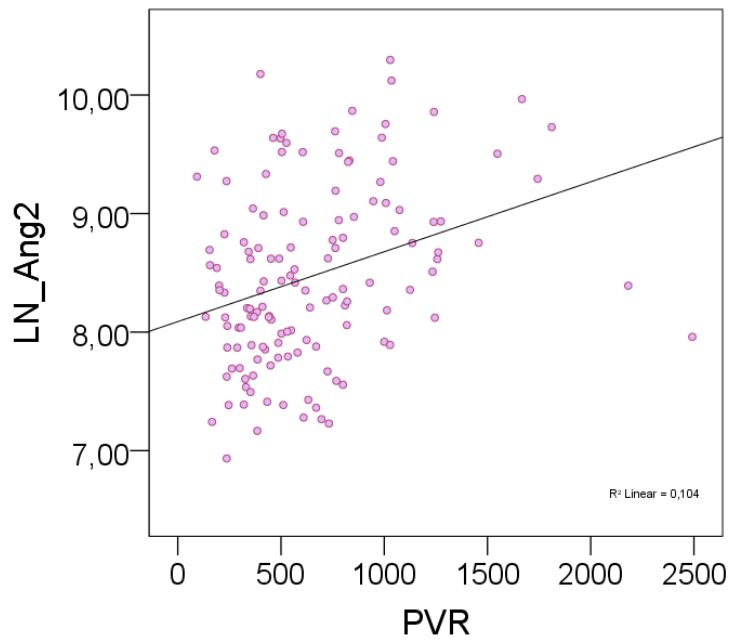


Abbildung 14 hochsignifikante Korrelation des LN Ang-2 mit dem PVR;  $p < 0,001$ ,  $r = 0,323$

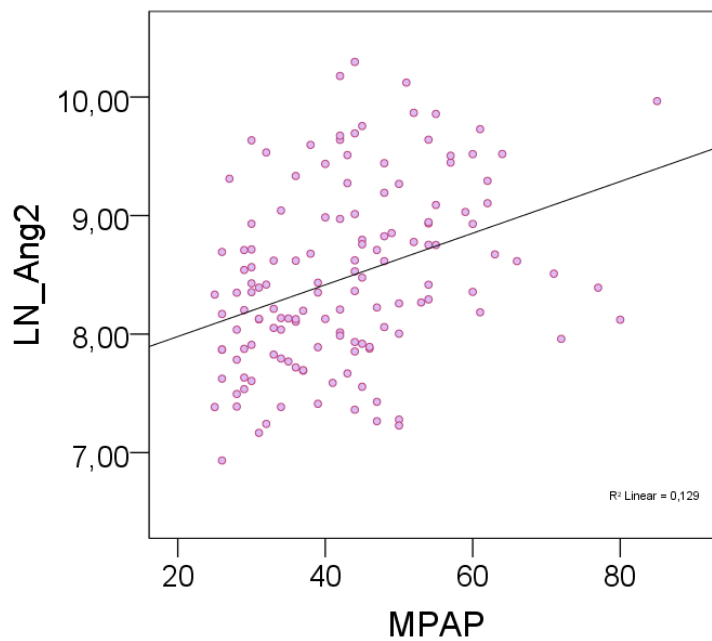


Abbildung 15 statistischer Zusammenhang des MPAP mit dem LN Ang-2;  $p < 0,001$ ,  $r = 0,359$

Aber auch zwischen dem LN Ang-2 und dem CI ( $p < 0,001$ ;  $r = -0,430$ ) und dem HZV ( $p < 0,001$ ;  $r = -0,343$ ) kann ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden [Abbildungen 15 und 16]. Ebenfalls der PAWP ( $p = 0,022$ ;  $r = 0,196$ ) und auch der 6-MWT ( $p = 0,009$ ;  $r = -0,237$ ) korrelieren signifikant (Kurven nicht abgebildet).

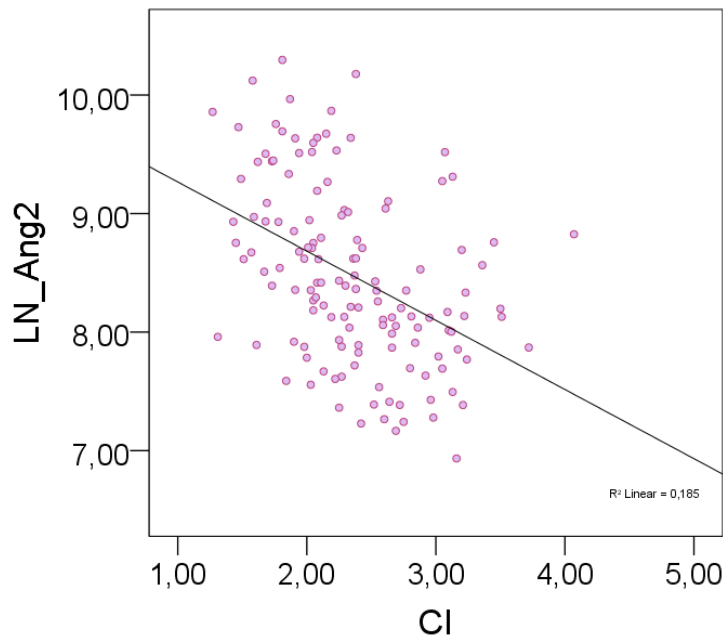


Abbildung 16 Hochsignifikante statistische Korrelation des LN Ang-2 mit dem CI;  $p < 0,001$ ,  $r = -0,430$

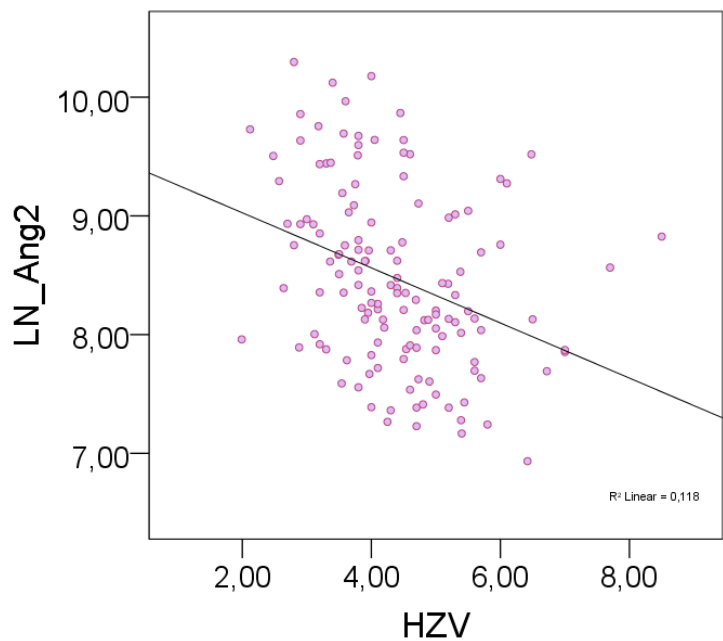


Abbildung 17 LN Ang-2 in statistischer Relation zum HZV;  $p < 0,001$ ,  $r = -0,343$

Die Plasmakonzentration von Ang-2 ist in unserer Studie somit ein deutlicher Marker hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung. Im Vergleich dazu fehlen bezogen auf alle Parameter eine Korrelation bei der Analyse des LN Ang-1 sowohl bei unserem Gesamtkollektiv, als auch bei dem Blick auf die Auswertung der einzelnen Ätiologien. Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung anhand der Plasmakonzentration von Ang-1 sind somit in unserer Studie nicht möglich.

## 4.8 Stärkste Korrelation mit der Hämodynamik innerhalb der Patientengruppe mit CVD

Innerhalb des Patientenkollektivs, das an CVD erkrankt ist, findet sich eine gegenüber dem Gesamtkollektiv noch deutlichere Korrelation zwischen dem LN Ang-2 und den hämodynamischen Parametern. In dieser Erkrankungsgruppe korreliert der LN Ang-2 mit dem MPAP ( $p=0,002$ ;  $r=0,494$ ), dem HZV ( $p<0,001$ ;  $r= -0,723$ ), dem CI ( $p<0,001$ ;  $r= -0,807$ ) und auch dem PVR ( $p<0,001$ ;  $r=0,617$ ) bei teils sehr guter Relevanz [Abbildungen 17 bis 20]. Darüber hinaus ergeben unsere Daten auch in dieser Subgruppe eine statistisch grenzwertig signifikante Korrelation des LN Ang-2 mit dem 6-MWT bei geringerer Relevanz ( $p=0,51$ ;  $r= -0,353$ ; Grafik nicht abgebildet). Unsere Studie stellt damit den LN Ang-2 als einen weiteren Parameter zur Abschätzung des Schweregrades der Erkrankung heraus.

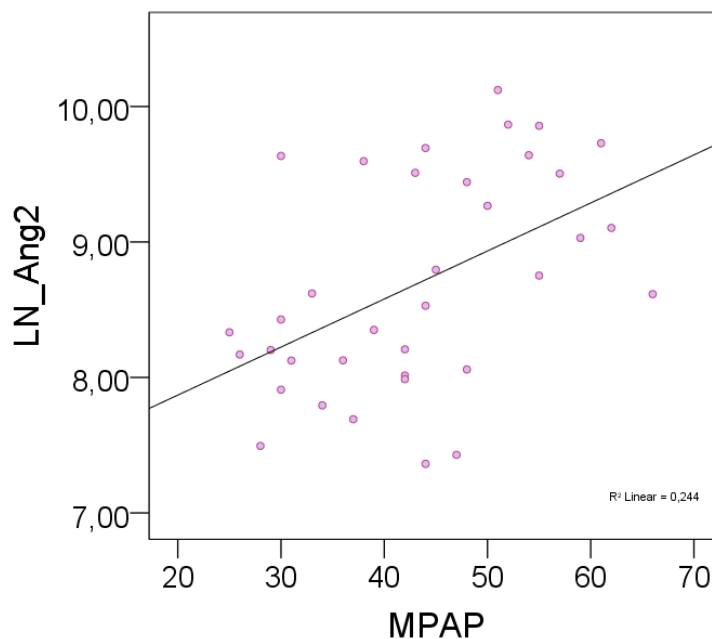


Abbildung 18 LN Ang-2 in Korrelation zum MPAP bei Patienten mit CVD;  $p=0,002$ ;  $r=0,494$

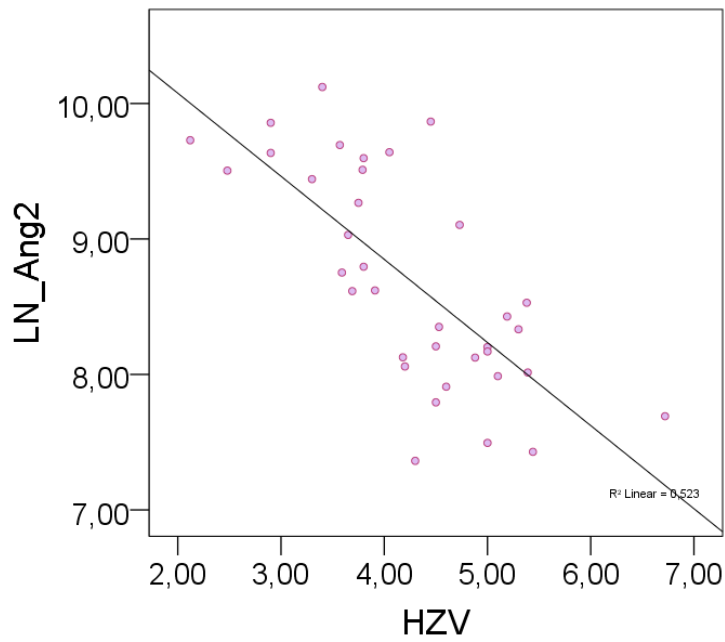


Abbildung 19 Korrelation des LN Ang-2 mit dem HZV bei Patienten mit CVD;  $p < 0,001$ ;  $r = -0,723$

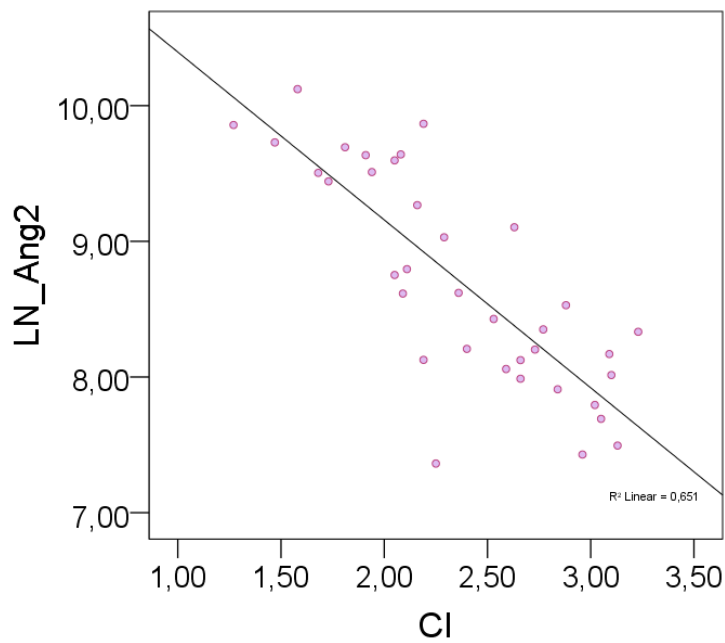


Abbildung 20 Hochsignifikante statistische Korrelation des LN Ang-2 mit dem CI bei CVD;  $p < 0,001$ ;  $r = -0,807$

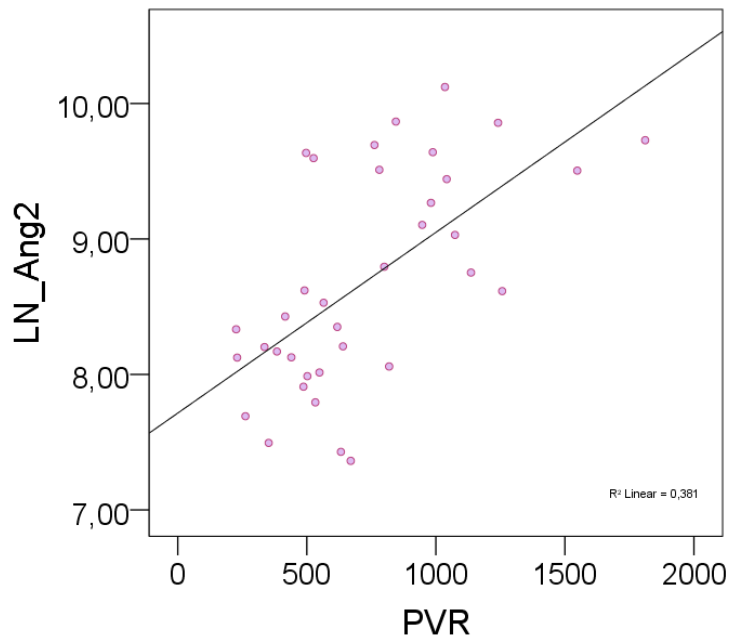


Abbildung 21 statistischer Zusammenhang des PVR mit dem LN Ang-2 bei CVD;  $p < 0,001$ ;  $r = 0,617$

#### 4.9 Unterschiedliche Korrelation des LN Angiotensin-2 mit der Hämodynamik innerhalb der weiteren Ätiologien

Auch bei Patienten mit einer IPAH finden wir eine signifikante Korrelation - bei teils guter Relevanz - der Konzentration von Ang-2 mit dem MPAP ( $p = 0,002$ ;  $r = 0,387$ ), dem CI ( $p = 0,006$ ;  $r = -0,449$ ) und dem PVR ( $p = 0,45$ ;  $r = 0,336$ ) [Abbildungen 21-23].

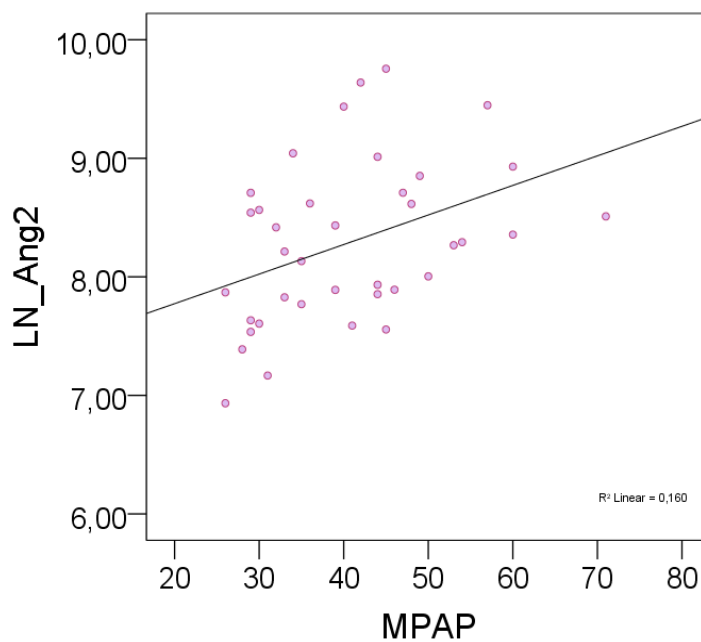


Abbildung 22 signifikanter Zusammenhang des MPAP mit dem LN Ang-2 bei IPAH;  $p = 0,002$ ;  $r = 0,387$

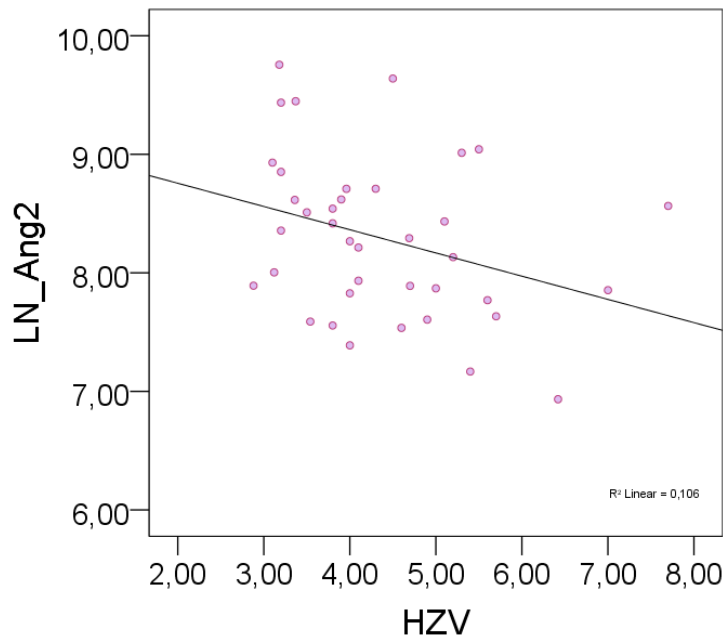


Abbildung 23 LN Ang-2 in Korrelation zum CI bei Patienten mit IPAH;  $p=0,006$ ;  $r= -0,449$

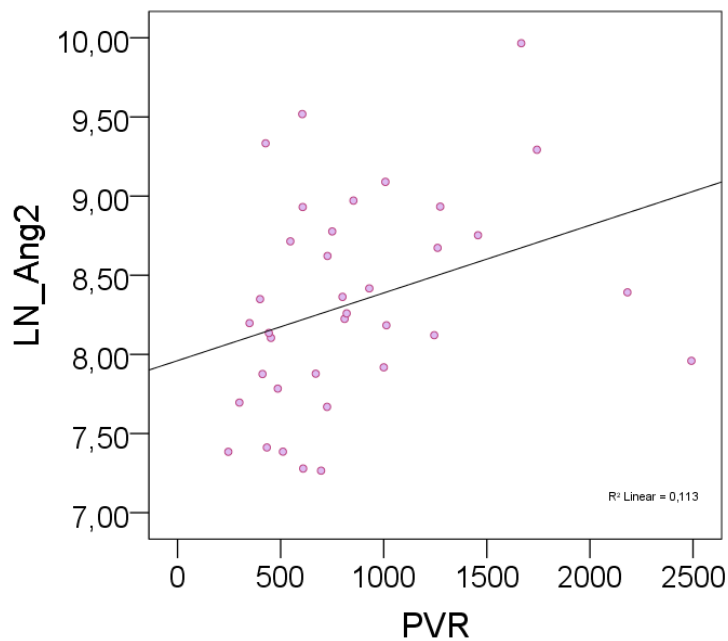


Abbildung 24 Signifikante statistische Korrelation des LN Ang-2 mit dem CI bei CVD ;  $p=0,45$ ;  $r=0,336$

Bei Patienten mit einer CTEPH sehen wir bei teilweise gute Relevanz einen statistisch signifikanten Zusammenhang des LN Ang-2 mit dem MPAP ( $p=0,013$ ;  $r=0,401$ ), dem HZV ( $p=0,046$ ;  $r= -0,326$ ), dem CI ( $p=0,003$ ;  $r= -0,465$ ) sowie dem PVR ( $p=0,024$ ,  $r=0,366$ ) [Abbildungen 24-27].

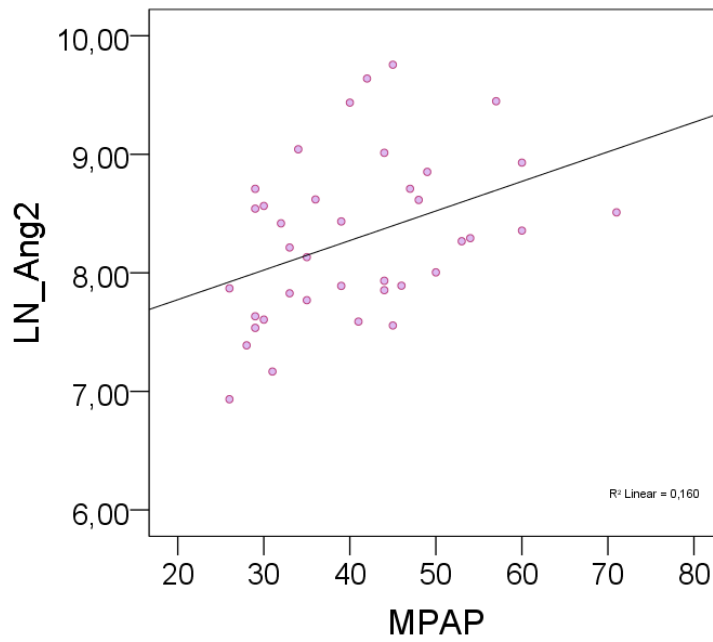


Abbildung 25 signifikante Korrelation des LN Ang-2 zum MPAP bei CTEPH;  $p=0,013$ ;  $r=0,401$

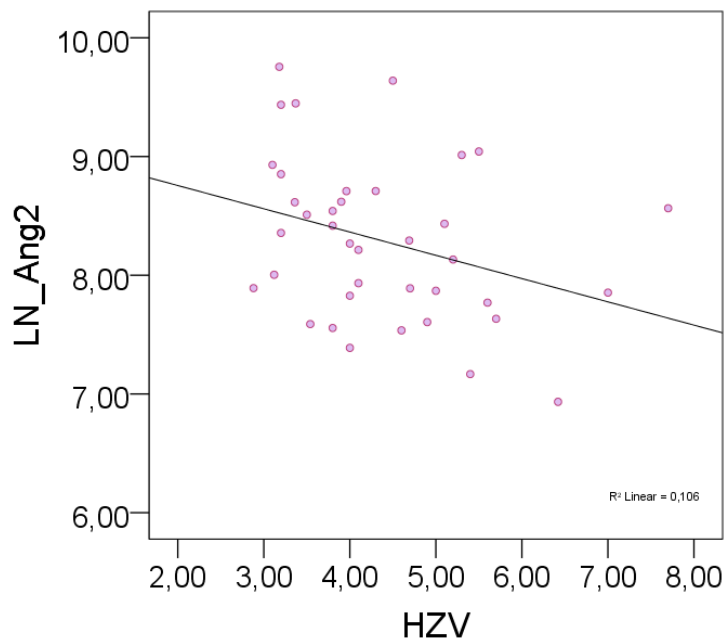


Abbildung 26 grenzwertig signifikante Korrelation von HZV und LN Ang-2 bei CTEPH;  $p=0,046$ ;  $r= -0,326$



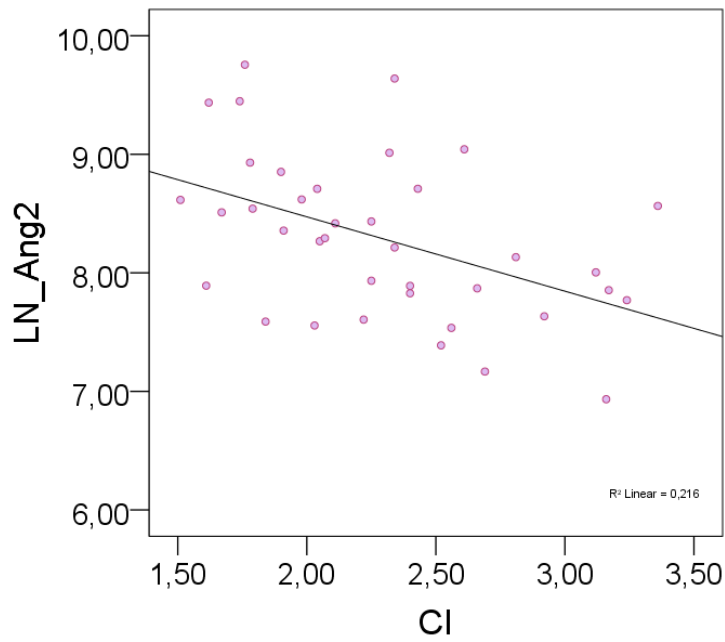


Abbildung 27 hochsignifikante Korrelation des CI mit dem LN Ang-1 bei CTEPH;  $p=0,003$ ;  $r= -0,465$

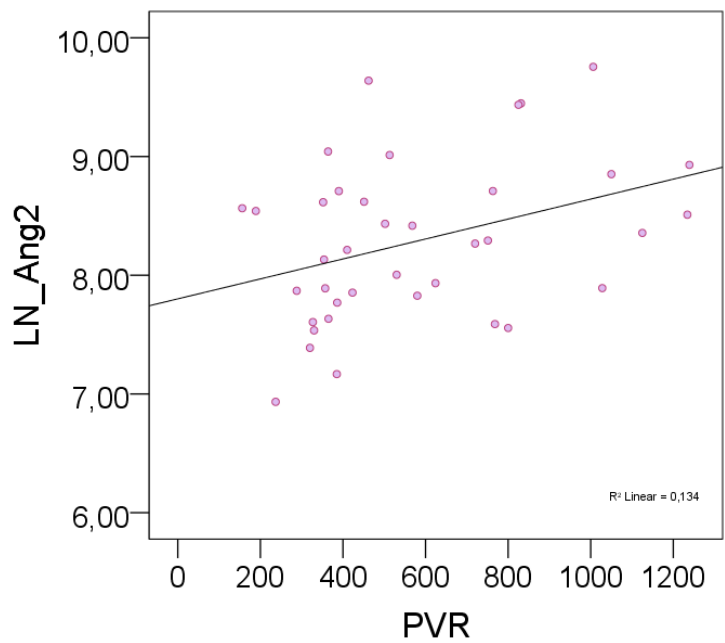


Abbildung 28 statistischer Zusammenhang des LN Ang-2 mit dem PVR bei CTEPH;  $p=0,024$ ,  $r=0,366$

In der Gruppe der PVH Patienten gibt es lediglich eine grenzwertig signifikante Korrelation mit dem MPAP ( $p=0,049$ ;  $r=0,383$ ) [Abbildung 28].

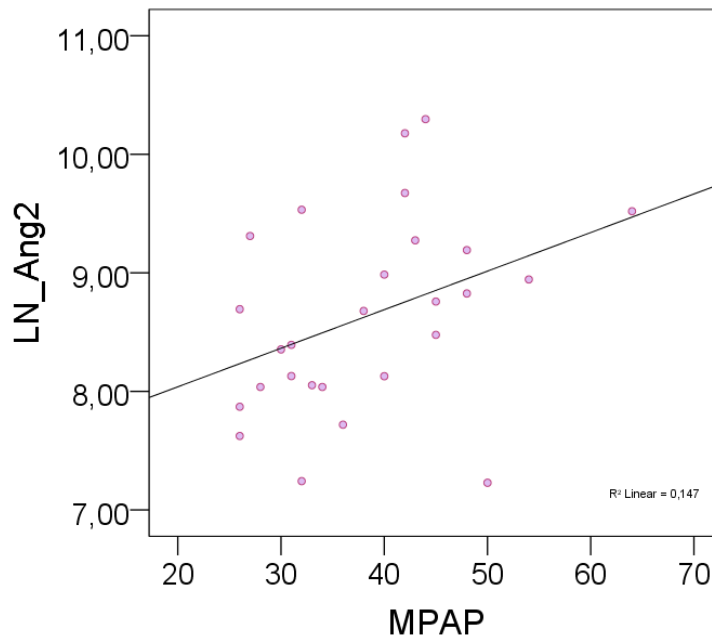


Abbildung 29 grenzwertig signifikante Korrelation von MPAP und LN Ang-2 bei PVH;  $p=0,049$ ;  $r=0,383$

Somit können wir in der vorliegenden Arbeit den LN Ang-2 am ehesten bei Patienten mit IPAH und CTEPH als einen zusätzlichen Parameter zur Einschätzung der Schwere der Erkrankung identifizieren.

#### **4.10 Eingeschränkte prognostische Aussagekraft des LN Ang-2**

In der Kaplan-Meier Darstellung des Überlebens hinsichtlich der Quartile des LN Ang-2 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,187$ ). Die Cox-Regressions-Analyse bezogen auf die Quartile des LN Ang-2 zeigt, dass das Risiko zu versterben bei Patienten im 4. Quartil 7-fach erhöht ist gegenüber Patienten im 1. Quartil. Bei einem  $p=0,64$  sind diese Ergebnisse jedoch statistisch nicht signifikant. Auch eine dichotomisierte Analyse hinsichtlich des Überlebens ergibt kein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko bei Werten des LN Ang-2 oberhalb des Medians gegenüber Werten unterhalb. Die Cox-Regressions Analyse weist in unserer Studie jedoch ein um 74,1% erhöhtes Risiko zu versterben je Anstieg des LN Ang-2 um einen Punkt bei grenzwertig nicht signifikantem  $p$  (HR 1,741;  $p=0,052$ ; 95% Konfidenzintervall (CI) 0,996 - 3,042) auf.

Um zu überprüfen, ob Ang-2 als unabhängiger Prädiktor für das Überleben genutzt werden kann, haben wir eine multivariable Cox-Regressions-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigt sich bei Hinzunahme des PVR und des Geschlechts der LN Ang-2 mit abnehmender Signifikanz (HR 1,731;  $p=0,70$ ). Bei Anpassung auch an den 6-MWT fehlt dem LN Ang-2 bereits die statistische Signifikanz (HR 1,520;  $p=0,221$ ).

Dieser Trend setzt sich vor bei Einbezug der NYHA-Klasse in die Analyse (HR 1,104;  $p=0,798$ ). Auch im direkten Vergleich mit dem 6-MWT sehen wir den LN Ang-2 nicht als signifikanten Parameter (HR 1,60;  $p=0,186$ ). Somit ergibt sich aus unserer Studie, dass der LN Ang-2 keine unabhängige Aussagekraft hinsichtlich des Überlebens hat. Als weiterer Endpunkt bei der prognostischen Auswertung des LN Ang-2 fungiert in unserer Arbeit der Zeitpunkt der Therapie-Eskalation. Hier gibt es in der Kaplan-Meier Darstellung ebenfalls einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe des LN Ang-2 aufgeteilt in Quartile und des Starts einer Kombinationstherapie ( $p=0,001$ ). Auch in der Subgruppe der Patienten mit IPAH ( $p=0,024$ ) und mit einer CVD ( $p=0,002$ ) kann dieser Zusammenhang festgestellt werden.

#### **4.11 Der LN Ang-1 besitzt kein prognostisches Potential**

In der Auswertung der unterschiedlichen Konzentrationen des gemessenen LN Ang-1 verteilt auf 4 Quartile ergibt sich in der Kaplan-Meier Darstellung kein signifikanter Unterschied zwischen diesen ( $p=0,670$ ). Auch hinsichtlich einer Ausweitung der Therapie finden sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,625$ ). Ebenso wenig kann in der Cox-Regressions-Analyse ein statistisch relevant erhöhtes Risiko zu versterben bei einem Anstieg des LN Ang-1 um einen Punkt gefunden werden (HR 1,127;  $p=0,627$ ), anders als es bei Ang-2 in unserer Studie der Fall ist. Die multivariablen Cox-Regressions-Analysen ergibt auch hinsichtlich des LN Ang-1, dass dieser keine unabhängige Aussagekraft bezüglich des Überlebens der Patienten hat. Damit weist in unserer Studie der LN Ang-1 in keiner Analyse eine prognostische Qualität auf.

## **5 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Plasma-Konzentrationen von Ang-1 und Ang-2 bei Patienten mit nachgewiesener PH gemessen. Diese wurden verglichen mit den Plasma-Werten der gleichen Proteine von Patienten, bei denen eine PH mittels RHK ausgeschlossen wurde, um so den diagnostischen oder prognostischen Nutzen zu untersuchen. Darüber hinaus wurde ermittelt, ob von der Plasma-Konzentration auf den Schweregrad der Erkrankung geschlossen werden kann.

### **5.1 Die Ergebnisse im Kontext anderer Studien**

#### **5.1.1 Plasma-Konzentrationen von Angiotensin-1 und Angiotensin-2 in der Kontrollgruppe**

Bei der Untersuchung der Konzentrationen von Ang-1 und Ang-2 bei Patienten mit Prostata- oder Brust-Karzinom hat die Arbeitsgruppe Caine et. al. ebenfalls Messungen per ELISA vorgenommen. Dabei haben sie bei gesunden Freiwilligen in der Kontrollgruppe Konzentrationen von Ang-1 4,00 ng/ml [4,00 – 5,50] bei weiblichen Probanden und 8,00 ng/ml [6,00 – 14,00] bei männlichen im Plasma gefunden. Bei Ang-2 lagen die Konzentrationen bei 1,50 ng/ml [1,06 – 1,50] bei Frauen und 1,35 ng/ml [0,65 – 2,14] bei Männern [80]. Ganz ähnliche Konzentrationen fanden auch Kumpers et. al. bei der Untersuchung angiogenetischer Faktoren bei Patienten mit IPAH, welche ebenfalls ein gesundes Kollektiv als Kontrolle nahmen: Ang-1 4.4 ng/ml [1.8–6.9] und Ang-2 1.6 ng/ml [0.8–2.3] [69]. Eine weitere Arbeitsgruppe, welche in ihrer Studie ebenfalls gesunden Probanden peripher Blut entnommen und das Plasma per ELISA untersucht hat, fand in der Kontrollgruppe folgende Konzentrationen: Ang-1 2484 pg/ml [1045-7422] und Ang-2 1762 pg/ml [614-6940] [88]. Im Kontext mit diesen Werten sind die Konzentrationen von Ang-1 unseres Kontrollkollektivs mit einem Median von 3708 pg/ml in vergleichbarer Höhe angesiedelt. Die Konzentration von Ang-2 liegt in unserer Arbeit mit einem Median von 2645 pg/ml höher als in den erwähnten Studien. Unterschiede, die hier bei Ang-2 eine Rolle spielen können, sind zum einen die Abnahmetechnik und zum anderen das Kollektiv. Bei unserer Studie wurden alle Blutproben im Zuge einer RHK aus zentralvenösem Blut gewonnen, wogegen die genannten Studien ihre Blutentnahme peripher gewonnen haben [80,88].

Ein weiterer Punkt ist die Zusammensetzung unserer Kontrollgruppe. Auch wenn bei unseren Kontrollpatienten per RHK die Diagnose einer PH ausgeschlossen wurde, hat man alle Patienten zunächst aufgrund einer subjektiven Dyspnoe oder auch einer apparativ objektivierten Einschränkung der Atmung untersucht. Damit ist unsere Kontrollgruppe nicht als ganz lungengesund einzustufen.

### **5.1.2 Angiotensin-1**

Unsere Studie zeigt keine signifikant erhöhten Plasma-Konzentrationen von Ang-1 bei Patienten einer IPAH, CVD, CTEPH oder PVH. Damit können wir Ergebnisse, die eine erhöhte Expression von Ang-1 in Lungengewebe von Patienten mit einer PH festgestellt haben, in unseren Blutentnahmen nicht verifizieren [84,89]. Eine der Arbeitsgruppen untersuchte Lungengewebs-Proben von Patienten mit PH, die während verschiedener Eingriffe entnommen wurden. Dort hat man eine Erhöhung der Ang-1 messenger Ribonukleinsäure (m-RNA) im Gewebe gefunden, eine Untersuchung der Gefäßwand der PA sowie die Untersuchung von Serum dort entnommener Blutproben zeigte jedoch keine Erhöhung der Konzentration [84]. Dies warf die Vermutung auf, dass das Protein und dessen Wirkungen auf die Lunge selbst beschränkt seien. Diese Schlussfolgerung wäre ein Erklärungsansatz unserer Ergebnisse. Eine weitere Arbeitsgruppe fand bei Patienten mit IPAH ebenfalls erhöhte Konzentrationen von Ang-1 in Proben des Lungengewebes, hier wurden jedoch keine Untersuchungen der Konzentrationen in Blutproben erwähnt [90]. Jedoch differieren die gemessenen Plasma-Konzentrationen unserer Patienten mit einer IPAH deutlich gegenüber denen der Arbeitsgruppe von Kumpers et. al. [2849 pg/ml gegenüber 14800 pg/ml] [69].

Ein Vergleich der angegebenen Werte mit den von uns erhobenen Daten wird dadurch eingeschränkt, dass diese Arbeitsgruppe keine Angabe bezüglich des Ortes der Blutentnahme macht und die Messung der Konzentrationen über ein anderes Verfahren als in unserer Arbeit stattgefunden hat. Bemerkenswert ist aber, dass die Konzentrationen der Kontrollgruppen unserer beiden Studien sehr nah beieinander liegen [3908 pg/ml gegenüber 4400 pg/ml] [69]. In der Zusammenschau unserer Ergebnisse zeigt sich die Konzentration von Ang-1 im Blut von Patienten mit einer PH nicht als diagnostischer Marker. Auch eine Verbindung zwischen der Ang-1 Konzentration und dem Schweregrade der PH können wir nicht feststellen.

Dieses Ergebnis deckt sich wiederum mit der Arbeitsgruppe um Kümpers et. al., die bei ihrer Untersuchung der Ang-1 Konzentrationen im Patientenblut ebenfalls keine Korrelation mit verschiedenen Schweregrad-Parametern feststellen konnten [69]. Es steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen zweier Arbeitsgruppen, die bei Patienten mit unterschiedlichen Ätiologien einer PH einen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration von Ang-1 und der Aktivierung von TIE2 in untersuchtem Lungengewebe mit der Höhe des PVR der Patienten feststellten [84,91]. Aufgrund seiner Bedeutung als Wachstumsfaktor [10], sowohl für die Entwicklung embryonaler Gefäße [70], als auch für die Stabilisierung neuer und voll entwickelter Gefäße [69], liegt eine mögliche Beteiligung dieses Proteins bei pathophysiologischen Vorgängen bei der Entstehung der PH, wie der Entwicklung einer Mediahypertrophie, proliferativen und fibrotischen Veränderungen der Intima sowie inflammatorischen perivaskulären Infiltrationen [7–10] nahe.

Aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse, die einen erhöhten Ang-1-Spiegel eher protektiv zeigten [85], und anderer, die Ang-1 als Auslöser einer Proliferation von glatten Muskelzellen über einen Ang-1/TIE2/Serotonin-Signalweg sahen [86], bleibt auch vor dem Hintergrund unserer Untersuchungen die genaue Beteiligung ungeklärt. So könnte in weiteren Studien versucht werden zu klären, ob eine Steigerung von Ang-1 als Ursache oder Folge einer PH auftritt und ggf. von weiteren Co-Faktoren abhängig ist, ggf. auch von einer bestimmten Ang-1/Ang-2-Ratio. Weiterhin könnten Vergleiche von Blutproben gegenüber Lungenproben interessant sein um darzustellen, ob die Nachweisbarkeit auf die Lunge begrenzt und Ang-1 somit als peripherer Marker ungeeignet ist.

### **5.1.3 Angiopoietin-2**

Ang-2 ist ein Protein, das einer strengen Regulation unterliegt. Bei der Entwicklung des Gefäßsystems in der Lunge spielt es gemeinsam mit Ang-1 eine wichtige Rolle, ist sowohl bei der Angiogenese, als auch beim Remodelling beteiligt [75,76]. Mediahypertrophie, proliferative und fibrotische Veränderungen der Intima oder auch inflammatorische perivaskuläre Infiltration sind als pathophysiologische Grundlagen bei der Entwicklung einer PH hinreichend beschrieben [7–10]. Unsere Arbeit zeigt signifikant erhöhte Konzentrationen von Ang-2 im Plasma der Patienten, die an einer CVD oder PVH erkrankt sind, obwohl die primäre Ursache für die Entstehung der PH unterschiedliche sind.

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass hier die gemeinsame Endstrecke der Ätiologien wiedergegeben zu werden scheint, bei deren Pathogenese Ang-2 eine Rolle spielt, oder aber reaktiv durch die Erkrankung in erhöhtem Maße zur Verfügung gestellt wird. Bei Patienten mit IPAH oder einer CTEPH finden wir hingegen keine signifikanten Erhöhungen der Konzentrationen von Ang-2. Die Einordnung dieser Ergebnisse fällt schwer, da gerade Ang-2 in Bezug auf eine PH weniger beachtet wurde, als es bei Ang-1 der Fall gewesen ist. Ein Grund dafür könnte sein, dass frühere Studien zunächst keine Konzentrationssteigerung von Ang-2 bei Patienten mit PH zeigten [84,89].

Auch die von Kämpers et. al. 2010 festgestellte Erhöhung der Plasma-Konzentration von Ang-2 bei Patienten mit einer IPAH können wir in unserer Studie nicht reproduzieren [69]. Wir können bei Patienten mit einer IPAH in unserer Arbeit jedoch ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang feststellen zwischen der Höhe des LN Ang-2 im Plasma der Patienten und der Höhe des PVR ( $r=0,336$ ;  $p=0,45$ ) sowie des HI ( $r= -0,449$ ;  $p=0,006$ ), obgleich diese Ergebnisse nicht so deutlich waren wie bei Kämpers et. al. ( $r=0,6$ ;  $p < 0,001$  bzw.  $r= -0,53$ ;  $p < 0,001$ ) [69]. Der direkte Vergleich der Korrelationen ist an dieser Stelle nicht möglich, da Kämpers et. al. die statistische Auswertung mit den gemessenen Konzentrationswerten von Ang-2 durchgeführt haben, wir aber den LN Ang-2 verwendet haben, da sich in unserer Auswertung die Konzentration von Ang-2 nicht-normalverteilt zeigt.

Auch wenn oder gerade weil es nur wenige Vergleichsdaten gibt zur Konzentration von Ang-2 in Korrelation zum 6-MWT und hämodynamischen Parametern (MPAP, PAWP, HZV, CI, PVR) sind unsere Erkenntnisse besonders interessant. Da die Belastbarkeit im 6-MWT und verschiedene hämodynamische Parameter auch in aktuellen Leitlinien zur Beurteilung des Schweregrades der PH herangezogen werden, darf ich vermuten, dass auch der LN Ang-2 aufgrund der statisch signifikanten Korrelation mit diesen Werten zur Beurteilung des Schweregrades geeignet sein kann. Bei den von uns festgestellten Korrelationen vor allem bei Patienten mit einer IPAH, einer CVD und einer CTEPH, steht somit eine Möglichkeit der Verlaufskontrolle spezifischer Therapien über die Plasma-Konzentration von Ang-2 in Aussicht, die in prospektiven Studien sicher noch weiter untersucht werden muss.

Unsere Cox-Regressions-Analyse ergab bei einem grenzwertig signifikanten  $p=0,052$ , dass bei einem Anstieg des LN Ang-2 um 1 Punkt, das Risiko zu versterben um 74,1% steigt. Wir konnten diese Ergebnisse jedoch weder bei einer Dichotomisierung, noch bei einer Aufteilung in Quartile statistisch relevant präzisieren.

Wir haben neben der Überlebens-Analyse die Eskalation auf eine Kombinationstherapie als Endpunkt gewählt, wobei unsere Kaplan-Meier Darstellung einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe des LN Ang-2 aufgeteilt in Quartile und des Starts einer Kombinationstherapie ( $p=0,001$ ) sowohl im Gesamtkollektiv, als auch in den Subgruppe der Patienten mit IPAH ( $p 0,024$ ) und CVD ( $p 0,002$ ) ergab. Andere Studien haben dies noch um die Verschlechterung der Symptome des Patienten und eine Abnahme der Gehstrecke im 6-MWT erweitert [92,93].

Die Wahl eines neuen Endpunktes, auch als Kombination verschiedener Parameter, kann vor allem deswegen hilfreich sein, da therapiebedingte Änderungen der Hämodynamik alleine nicht sicher als ausreichende Marker für Änderungen des kurzfristigen Überlebens zu stehen scheinen [94]. Auch die bereits beendete jedoch noch nicht vollständig veröffentlichte AMBITION-Studie wählte zur Einschätzung der Prognoseverbesserung durch eine neue Kombinationstherapie unter anderem die Verschlechterung der Erkrankung als einen der Endpunkte. Die Wahl geeigneter neuer Endpunkte zur Beurteilung der Krankheitsprognose ist ein sehr wichtiger Punkt, dem aktuell einige Beachtung geschenkt wird. Auch vor diesem Hintergrund kann das Finden eines Markers, der mit unterschiedlichen Parametern stark korreliert, von großer Bedeutung sein.

## **5.2 Stärken und Schwächen der Studie**

Eine Schwäche unserer Arbeit kann wie bereits erwähnt die Kontrollgruppe darstellen. Hier wurden keine gesunden Probanden gewählt, um die Plasma-Konzentrationen der Subgruppen jeweils in gleichem Probenmaterial, welches per RHK gewonnen wurde, messen zu können. Vergleichswerte anderer Gruppen wurden bei nachweislich gesunden Patienten, dann aber in peripheren oder mutmaßlich peripheren Blutproben gemessen [69,80,88]. Es stellt sich hier die Frage, ob es einen Gradienten der Konzentration der untersuchten Marker gibt zwischen peripherem und zentralvenösem Blut. Einen solchen Gradienten als mögliche Fehlerquelle wollten wir bei unserer Analyse umgehen.

Obgleich die retrospektive Betrachtung der Daten und das Single-Center-Design eher als Schwäche gesehen werden könnten ist eine Stärke der vorliegenden Arbeit sicher die Größe des Patientenkollektivs, welches zur Untersuchung unserer Fragestellung zur Verfügung stand. Wir haben in der vorliegenden Arbeit 151 Proben bezüglich Ang-1 von Patienten mit einer PH unterschiedlicher Ätiologien und 137 Proben hinsichtlich Ang-2 untersuchen können.



Damit haben wir mit Blick auf die Anzahl der untersuchten Patienten deutlich mehr Datensätze als in vielen anderen vorliegenden Arbeiten [69,84,86,90,91], obgleich man einschränken kann, dass innerhalb der einzelnen Ätiologien die Datensätze größer sein könnten. Somit sind die Ergebnisse unserer statistischen Auswertungen der Subgruppen ggf. durch größere Kollektive zu bestätigen.

Weiterhin stehen zu den Patienten die jeweiligen hämodynamischen Parameter und auch Ergebnisse des 6-MWT zur Verfügung. So haben wir bei Ang-1 und auch Ang-2 bei allen Patienten die Plasma-Konzentrationen in Relation gesetzt zum MPAP, dem PAWP, HZV, CI und dem PVR. Auch bei dem 6-MWT standen uns mit 78,1% (PVH) bis zu 100% (IPAH) aller Patienten große Datenmengen für unsere Auswertung zur Verfügung. Da dies aber nicht bei allen Patienten der Fall war, haben wir bei der Wahl eines sekundären Endpunktes, der Zeit bis zum Start einer Kombinationstherapie, auf die Verbindung dieser Information mit den Ergebnissen des 6-MWT verzichtet. Wie Kämpers et. al. bereits in ihrer Arbeit feststellten, sind Daten zu Patientenstudien bezüglich Ang-1 und Ang-2 noch immer selten. Ein Grund dafür kann sein, dass experimentelle Studien verschiedener Arbeitsgruppen nahezu gegensätzliche Ergebnisse hinsichtlich der Rolle der Angiotensinogen II bei der PH erbrachten [74,85,86,89,95,96]. Damit bietet unsere Arbeit neben der der Arbeitsgruppe von Kämpers et. al. und wenigen anderen Gruppen einen seltenen Einblick in die Konzentrationsverhältnisse der Angiotensinogen II bei Patienten mit einer PH und zumindest bei Ang-2 dessen diagnostische und prognostische Bedeutung, sowie dessen Wert bei der Einschätzung des Schweregrades der PH.

### **5.3 Schlussfolgerung und Aussicht**

Die vorliegende Arbeit lässt den Schluss zu, dass Ang-2 bei der Diagnose einer CVD oder PVH hilfreich sein kann, Ang-1 jedoch nach unseren Erkenntnissen kein diagnostisches Potential bietet. Die widersprüchlichen Angaben in der Literatur bei Tierversuchen aber auch bei der Untersuchung von menschlichen Blutentnahmen oder Lungengewebsproben zeigen, dass die Funktionsweise von Ang-1 und dessen Rolle bei der Entstehung oder als Folge einer PH weiter untersucht werden muss. Bezüglich Ang-2, welches in unserer Studie mehr diagnostisches Potential zeigt, bleibt zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Plasma-Konzentration des Biomarkers zwischen einer peripheren und einer zentralvenösen Blutentnahme gibt.

Dazu könnten in einer prospektiven Studie parallel zentralvenöse und periphere Blutentnahmen von Patienten während einer RHK entnommen und miteinander verglichen werden. Bei Fehlen eines Gradienten könnte man dann eine erneute Betrachtung der Werte vornehmen im Vergleich zu einem nachweislich gesunden Kollektiv, von dem nur mittels peripherer Blutentnahme Messwerte erhoben werden.

Mit den von uns gewonnenen Erkenntnissen auch in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur lässt sich jedoch folgern, dass ohne weitere Untersuchungen weder Ang-1 noch Ang-2 als Ersatz der RHK bei der Diagnose einer PH dienen können. Wohl aber hat unseren Ergebnissen nach Ang-2 das Potential, als zukünftiger Marker für den Schweregrad der Erkrankung zu dienen und ggf. eine Evaluation über den Therapie-Erfolg zu ermöglichen. Ein nächster Schritt könnte eine prospektive Studie sein, die die Wirkung spezifischer Therapie auf die Plasma-Konzentration des Markers untersucht. Hier wurden bereits Reduktionen der Plasma-Konzentrationen bei Verlaufsbeobachtungen spezifisch therapierter Patienten berichtet [69,97].

Weiterhin könnte ein Schritt sein, die Fallzahl in den zu untersuchenden Ätiologien wie der CVD, IPAH oder auch CTEPH zu erhöhen, um die von uns gezogenen Schlüsse zu verifizieren oder zu korrigieren. Ebenfalls könnte ein weiterer Schritt sein, die Bedeutung von Ang-2 als prognostischer Marker in einem großen Patientenkollektiv mit einem längeren Follow-Up herauszustellen und die Konzentration des Markers in Relation zu neuen Endpunkten zu setzen. Hier könnte die Verschlechterung der Erkrankung mit einer Kombination verschiedener Marker, wie einer Verringerung der 6-MWT Strecke, einer Hospitalisation aufgrund der PH und eine Zunahme der klinischen Symptome mit einer Erweiterung der Therapie, gleichgesetzt werden, wie es bei der Evaluation neuer Therapie-Ansätze bereits getan wurde [92,93].

## 6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die PH ist eine schwerwiegende und fortschreitende Erkrankung, für die es bislang keine kurative medikamentöse Therapie gibt. Darüber hinaus ist die PH bislang nur invasiv über eine RHK zu diagnostizieren. Aktuell gibt es in der Forschung das Bestreben, Biomarker zu identifizieren, die die Diagnose einer PH vereinfachen, den Schweregrad der Erkrankung abschätzen lassen oder eine bessere Aussage zum Krankheitsverlauf zulassen. Der Entwicklung einer PH werden Veränderungen im Gefäßsystem zugeschrieben, im Wesentlichen eine Mediahypertrophie, proliferative und fibrotische Veränderungen der Intima sowie inflammatorisch perivaskuläre Infiltrationen.

Hypothese: Ang-1 und Ang-2 sind Proteine, die sowohl bei der physiologischen Entwicklung stabiler Gefäße beteiligt sind, aber auch im Zusammenhang mit Remodelling, EC-Proliferation und inflammatorischen Vorgängen genannt werden. Wir überprüften, ob signifikant erhöhte Konzentrationen der Proteine bei Patienten mit PH zu finden sind und ob sie diagnostisch, prognostisch oder zur Abschätzung des Schweregrades geeignet sind.

Methoden: Plasma von 151 Patienten bei Ang-1 und 137 Patienten bei Ang-2 wurde im Labor auf die Konzentration von Ang-1 und Ang-2 untersucht und statistisch in Korrelation gesetzt zum 6-MWT und der Hämodynamik der Patienten. Weiterhin wurden die Überlebensstatistiken des Kollektivs ausgewertet. Verglichen wurde es mit Plasma von 35 Kontroll-Patienten, bei denen eine PH mittels RHK ausgeschlossen wurde.

Ergebnisse: Bei Ang-1 fanden wir bei keiner der Ätiologien eine signifikante Erhöhung der Konzentration und keine Korrelation mit den Leistungs- oder Hämodynamikparametern. Es gab auch keine Korrelation mit dem Überleben der Patienten. Ang-2 hingegen war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht bei Patienten mit CVD und PVH. Weiterhin fanden wir Korrelationen mit der Hämodynamik bei Patienten mit einer IPAH, CVD und CTEPH.

Fazit: Ang-1 zeigte sich in unserer Studie ohne diagnostisches oder prognostisches Potential. Ang-2 könnte bei der Diagnose einer CVD oder PVH eine Rolle spielen. Zusätzlich scheint es ein guter Parameter zur Abschätzung des Schweregrades einer PH zu sein und ggf. als Verlaufsparemeter zur Evaluation des Erfolges einer spezifischen Therapie dienen.

## 7 Summary

Background: PH is a severe and progressive disease for which so far no curative drug therapy is available. In addition the only way to diagnose PH is the RHK. At the moment different scientific groups try to identify biomarkers which might help to diagnose PH, display the severity of the disease or that allow to make better predictions of the outcome. There are various changes in the structure of the vascular system during development of PH. These are media hypertrophy, proliferation and fibrotic changes of the intima and inflammatory infiltrations.

Hypothesis: Our focus was on two proteins, Ang-1 and Ang-2, known to be important in the development and stabilisation of human vascular system as well as causing vascular remodeling, EC proliferation and inflammation. We investigated if there are significant higher levels of these proteins in blood of patients with PH. Moreover we wanted to know if plasma levels of Ang-1 or Ang-2 have diagnostic or prognostic value or might help evaluating disease severity.

Methods: We analyzed plasma levels of Ang-1 in blood-samples of 151 PH patients and levels of Ang-2 in 137 samples. Then we statistically searched for correlations with 6-MWT and haemodynamics. In addition we analyzed survival rates of all patients as well as of each subgroup. Blood samples of 35 patients without PH were taken as control.

Results: Neither did we find significant higher levels of Ang-1 in blood samples of patients with PH compared to our control nor could we find any correlations between plasma levels of Ang-1 and disease severity or survival rates. Ang-2 on the other hand showed significant higher plasma levels in patients with CVD or PVH. We also found correlations with haemodynamics and therefore with disease severity in patients with IPAH, CVD and CTEPH. Similar to the analysis of Ang-1 we found no significant correlation with survival rates.

Conclusion: In our study Ang-1 did not show any diagnostic or prognostic value. Ang-2 might serve as a new marker in diagnosis of CVD or PVH in the future. In addition Ang-2 correlated strongly with other markers of disease severity and might be useful as a marker to evaluate success of specific therapy.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Galiè N, Humbert M, Vachiery J, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European respiratory journal* 2015;46:903–75.
2. Olschewski H, Hoeper M, Borst M, et al. Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie, Diagnosis and Therapy of Chronic Pulmonary Hypertension. *Pneumologie* 2006;60:749–71.
3. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur. Respir. J.* 2009;34:888–94.
4. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013;62:D34-41.
5. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54:S43-54.
6. Toshner M, Tajsic T, Morrell NW. Pulmonary hypertension: advances in pathogenesis and treatment. *Br. Med. Bull.* 2010;94:21–32.
7. Edwards WD, Edwards JE. Clinical primary pulmonary hypertension: three pathologic types. *Circulation* 1977;56:884–8.
8. Palevsky HI, Schloo BL, Pietra GG, et al. Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation* 1989;80:1207–21.
9. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* 1994;144:275–85.
10. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54:S20-31.
11. Cracowski J, Leuchte HH. The potential of biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Cardiol.* 2012;110:32S-38S.
12. Haddad F, Kudelko K, Mercier O, Vrtovec B, Zamanian RT, de Jesus Perez, Vinicio. Pulmonary hypertension associated with left heart disease: characteristics, emerging concepts, and treatment strategies. *Prog Cardiovasc Dis* 2011;54:154–67.
13. Hoeper MM, Mayer E, Simonneau G, Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 2006;113:2011–20.
14. Hoeper MM, Ghofrani HA, Gorenflo M, Grünig E, Schranz D, Rosenkranz S. Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie: Europäische Leitlinien 2009, Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: European Guidelines 2009 [Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: European guidelines 2009]. *Pneumologie* 2010;64:401–14.
15. Hoeper MM, Andreas S, Bastian A, et al. Pulmonale Hypertonie bei chronischen Lungenerkrankungen. Empfehlungen der Kölner Konsensus-Konferenz 2010 [Pulmonary hypertension due to chronic lung disease. Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010]. *Pneumologie* 2011;65:208–18.
16. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann. Intern. Med.* 1987;107:216–23.

17. Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension, The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* 2009;30:2493–537.
18. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;43:40S–47S.
19. Taleb M, Khuder S, Tinkel J, Khouri SJ. The diagnostic accuracy of Doppler echocardiography in assessment of pulmonary artery systolic pressure: a meta-analysis. *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 2013;30:258–65.
20. Hoeper MM, Pletz MW, Golpon H, Welte T. Prognostic value of blood gas analyses in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2007;29:944–50.
21. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001;163:1256–76.
22. Galiè N, Torbicki A, Barst R, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology, The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 2004;25:2243–78.
23. Tunariu N, Gibbs, Simon J R, Win Z, et al. Ventilation-perfusion scintigraphy is more sensitive than multidetector CTPA in detecting chronic thromboembolic pulmonary disease as a treatable cause of pulmonary hypertension. *J. Nucl. Med.* 2007;48:680–4.
24. Rich S, Kieras K, Hart K, Groves BM, Stobo JD, Brundage BH. Antinuclear antibodies in primary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1986;8:1307–11.
25. Chu JW, Kao PN, Faul JL, Doyle RL. High prevalence of autoimmune thyroid disease in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2002;122:1668–73.
26. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010;122:156–63.
27. Humbert M, Sitbon O, Yaïci A, et al. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2010;36:549–55.
28. Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension, Insights From the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation* 2010;122:164–72.
29. Shah SJ, Thenappan T, Rich S, Tian L, Archer SL, Gomberg-Maitland M. Association of serum creatinine with abnormal hemodynamics and mortality in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2008;117:2475–83.
30. Raymond RJ, Hinderliter AL, Willis PW, et al. Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002;39:1214–9.
31. Fritz JS, Blair C, Oudiz RJ, et al. Baseline and follow-up 6-min walk distance and brain natriuretic peptide predict 2-year mortality in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2013;143:315–23.

32. Paciocco G, Martinez FJ, Bossone E, Pielsticker E, Gillespie B, Rubenfire M. Oxygen desaturation on the six-minute walk test and mortality in untreated primary pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2001;17:647–52.
33. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann. Intern. Med.* 1991;115:343–9.
34. Sitbon O, Humbert M, Nunes H, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension, Prognostic Factors and Survival. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002;40:780–8.
35. van Wolferen, Serge A, Marcus JT, Boonstra A, et al. Prognostic value of right ventricular mass, volume, and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 2007;28:1250–7.
36. Mahapatra S, Nishimura RA, Sorajja P, Cha S, McGoon MD. Relationship of pulmonary arterial capacitance and mortality in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006;47:799–803.
37. Benza RL, Gomberg-Maitland M, Naeije R, Arneson CP, Lang IM. Prognostic factors associated with increased survival in patients with pulmonary arterial hypertension treated with subcutaneous treprostinil in randomized, placebo-controlled trials. *J. Heart Lung Transplant.* 2011;30:982–9.
38. Nickel N, Golpon H, Greer M, et al. The prognostic impact of follow-up assessments in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2012;39:589–96.
39. Tiede H, Sommer N, Milger K, et al. Short-term improvement in pulmonary hemodynamics is strongly predictive of long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation* 2013;3:523–32.
40. Warwick G, Thomas PS, Yates DH. Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2008;32:503–12.
41. Allanore Y, Borderie D, Meune C, et al. N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a diagnostic marker of early pulmonary artery hypertension in patients with systemic sclerosis and effects of calcium-channel blockers. *Arthritis Rheum.* 2003;48:3503–8.
42. Goetze JP, Videbaek R, Boesgaard S, Aldershvile J, Rehfeld JF, Carlsen J. Pro-brain natriuretic peptide as marker of cardiovascular or pulmonary causes of dyspnea in patients with terminal parenchymal lung disease. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2004;23:80–7.
43. Mauritz G, Rizopoulos D, Groepenhoff H, et al. Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Cardiol.* 2011;108:1645–50.
44. Aubert J. Biochemical markers in the management of pulmonary hypertension. *Swiss Med Weekly* 2005;(135):43–9.
45. Maeder M, Ammann P, Rickli H, Diethelm M. Elevation of B-type natriuretic peptide levels in acute respiratory distress syndrome. *Swiss Med Weekly* 2003;(133):515–8.
46. Antman EM. Decision making with cardiac troponin tests. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:2079–82.
47. Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, et al. Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Circulation* 2003;108:844–8.
48. Heresi GA, Tang, W H W, Aytakin M, Hammel J, Hazen SL, Dweik RA. Sensitive cardiac troponin I predicts poor outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2012;39:939–44.

49. Hoepfer MM, Hohlfeld JM, Fabel H. Hyperuricaemia in patients with right or left heart failure. *Eur. Respir. J.* 1999;13:682–5.
50. Voelkel MA, Wynne KM, Badesch DB, Groves BM, Voelkel NF. Hyperuricemia in severe pulmonary hypertension. *Chest* 2000;117:19–24.
51. Bendayan D, Shitrit D, Ygla M, Huerta M, Fink G, Kramer MR. Hyperuricemia as a prognostic factor in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2003;97:130–3.
52. Wensel R. Assessment of Survival in Patients With Primary Pulmonary Hypertension: Importance of Cardiopulmonary Exercise Testing. *Circulation* 2002;106:319–24.
53. Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, et al. Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;160:487–92.
54. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, Sheppard M, Corrin B, Hamid Q. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1993;341:1550–4.
55. Celik G, Karabiyikoğlu G. Local and peripheral plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 1998;65:289–94.
56. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:896–903.
57. Barst RJ, Langleben D, Frost A, et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004;169:441–7.
58. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;122:920–7.
59. Nickel N, Kempf T, Tapken H, et al. Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008;178:534–41.
60. Meadows CA, Risbano MG, Zhang L, et al. Increased expression of growth differentiation factor-15 in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2011;139:994–1002.
61. Ghofrani HA, Distler O, Gerhardt F, et al. Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH): Empfehlungen der Kölner Konsensus-Konferenz 2010 [Treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH): recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2010;135 Suppl 3:S87-101.
62. Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, et al. Accuracy of Doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009;179:615–21.
63. Arcasoy SM, Christie JD, Ferrari VA, et al. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in patients with advanced lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003;167:735–40.
64. WAGENVOORT CA, WAGENVOORT N. Primary Pulmonary Hypertension: A Pathologic Study of the Lung Vessels in 156 Clinically Diagnosed Cases. *Circulation* 1970;42:1163–84.
65. Maisonpierre PC. Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60.
66. Brindle, Nicholas P J, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ. Res.* 2006;98:1014–23.
67. Maliba R, Lapointe S, Neagoe P, Brkovic A, Sirois MG. Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signalling pathways. *Cell. Signal.* 2006;18:1947–57.



68. Cascone I, Audero E, Giraudo E, et al. Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1. *Blood* 2003;102:2482–90.
69. Kämpers P, Nickel N, Lukasz A, et al. Circulating angiopoietins in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 2010;31:2291–300.
70. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171–80.
71. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc. Res.* 2001;49:659–70.
72. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell* 2002;3:411–23.
73. Felcht M, Luck R, Schering A, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J. Clin. Invest.* 2012;122:1991–2005.
74. Kido M, Du L, Sullivan CC, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Gene transfer of a TIE2 receptor antagonist prevents pulmonary hypertension in rodents. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2005;129:268–76.
75. Hegen A, Koidl S, Weindel K, Marmé D, Augustin HG, Fiedler U. Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004;24:1803–9.
76. Hato T, Kimura Y, Morisada T, et al. Angiopoietins contribute to lung development by regulating pulmonary vascular network formation. *Biochemical and biophysical research communications* 2009;381:218–23.
77. Koga K, Todaka T, Morioka M, et al. Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis. *Cancer Res.* 2001;61:6248–54.
78. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin. Cancer Res.* 2000;6:1900–8.
79. Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K, Wands JR. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Invest.* 1999;103:341–5.
80. Caine GJ, Blann AD, Stonelake PS, Ryan P, Lip, G Y H. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003;33:883–90.
81. Nadar SK, Blann AD, Lip, G Y H. Plasma and platelet-derived vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in hypertension: effects of antihypertensive therapy. *J. Intern. Med.* 2004;256:331–7.
82. David S, Kämpers P, Lukasz A, Kielstein JT, Haller H, Fliser D. Circulating angiopoietin-2 in essential hypertension: relation to atherosclerosis, vascular inflammation, and treatment with olmesartan/pravastatin. *Journal of hypertension* 2009;27:1641–7.
83. Patel JV, Lim HS, Varughese GI, Hughes EA, Lip, Gregory Y H. Angiopoietin-2 levels as a biomarker of cardiovascular risk in patients with hypertension. *Annals of medicine* 2008;40:215–22.
84. Du L, Sullivan CC, Chu D, et al. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:500–9.

85. Zhao YD, Campbell, Andrew I M, Robb M, Ng D, Stewart DJ. Protective role of angiopoietin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 2003;92:984–91.
86. Sullivan CC, Du L, Chu D, et al. Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100:12331–6.
87. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* 2003;108:2613–8.
88. Treliński J, Wierzbowska A, Krawczyńska A, et al. Plasma levels of angiogenic factors and circulating endothelial cells in essential thrombocythemia: correlation with cytoreductive therapy and JAK2-V617F mutational status. *Leukemia & lymphoma* 2010;51:1727–33.
89. Kugathasan L, Dutly AE, Zhao YD, et al. Role of angiopoietin-1 in experimental and human pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2005;128:633S–642S.
90. Dewachter L, Adnot S, Fadel E, et al. Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;174:1025–33.
91. Thistlethwaite PA, Lee SH, Du LL, et al. Human angiopoietin gene expression is a marker for severity of pulmonary hypertension in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2001;122:65–73.
92. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2013;369:809–18.
93. Simonneau G, Torbicki A, Hoeper MM, et al. Selexipag: an oral, selective prostacyclin receptor agonist for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 2012;40:874–80.
94. Ventetuolo CE, Gabler NB, Fritz JS, et al. Are hemodynamics surrogate end points in pulmonary arterial hypertension? *Circulation* 2014;130:768–75.
95. Chu D, Sullivan CC, Du L, et al. A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin-1. *The Annals of Thoracic Surgery* 2004;77:449–56.
96. Kugathasan L, Ray JB, Deng Y, Rezaei E, Dumont DJ, Stewart DJ. The angiopoietin-1-Tie2 pathway prevents rather than promotes pulmonary arterial hypertension in transgenic mice. *J. Exp. Med.* 2009;206:2221–34.
97. Hiremath J, Thanikachalam S, Parikh K, et al. Exercise improvement and plasma biomarker changes with intravenous treprostinil therapy for pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled trial. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2010;29:137–49.

## 9 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum      Unterschrift

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die bei der Entstehung dieser Arbeit mitgeholfen haben.

Ich möchte mich natürlich bei Herrn Professor Dr. med. Werner Seeger ganz besonders für die Möglichkeit an seiner Klinik zu promovieren bedanken. Auch Herrn Professor Dr. med. Hossein Ardeschir Ghofrani gilt ein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas der Arbeit und die Unterstützung über weitreichende Anregungen.

Herrn Dr. med. Henning Gall danke ich herzlich für die enge Zusammenarbeit, die Hilfestellungen und die Geduld während meiner Betreuung auf dem Weg zur Promotion. Weiterhin gilt ein großer Dank dem gesamten Team der Lungenambulanz des Universitäts-Klinikums Gießen, sowie dem gesamten Team im Labor des biomedizinischen Forschungszentrums Seltersberg in Gießen unter der Leitung von Herrn Professor. Dr. Ralph Schermuly. Ohne ihre Mithilfe wäre eine Erhebung der Daten, ein Sammeln der Proben und eine Untersuchung dieser nicht möglich gewesen.

Frau Svenja Tiede gilt ebenfalls ein besonderer Dank als erste Ansprechpartnerin für die Arbeiten im Labor, die Überwachung meiner Tätigkeiten und die Mitsicht der Ergebnisse.

Natürlich danke ich von ganzem Herzen meinen beiden Familien für die Unterstützung, die Aufmunterungen und ihr Vertrauen. Allem voran danke ich meiner Frau Silvia, die zu jeder Zeit und in jeder Stimmungslage eine Stütze für mich war. Weiterhin danke ich natürlich auch allen weiteren Familienmitgliedern der Familien Schmidt und Göbel. Zum Schluss danke ich auch meiner kleinen Gießener Familie dafür, dass sie mich immer mal wieder auf andere Gedanken gebracht und etwas beruhigt haben: Markus, Francesco, Yuri, Sönke und nicht zu vergessen auch Johannes.

Vielen Dank euch allen!