

**Growth-differentiation-factor 15 und Activin A als
Biomarker für die pulmonale Hypertonie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Christoph Kempf
aus Radebeul

Gießen 2016

Aus dem Zentrum Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Herr Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. med. H. A. Ghofrani

Gutachter: PD Dr. med. O. Dörr

Tag der Disputation: 24.07.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die pulmonale Hypertonie	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Klassifikation	1
1.1.3	Pathophysiologie	4
1.1.4	Klinik	5
1.1.5	Diagnostik	5
1.1.6	Therapie der pulmonalen Hypertonie	6
1.2	Biomarker	6
1.3	<i>Transforming Growth Factor β</i>	7
1.3.1	<i>Growth-differentiation-factor 15</i>	8
1.3.2	Activin A	9
2	Fragestellung	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Material	12
3.1.1	Patientenkollektiv	12
3.1.2	Rechtsherzkatheter	12
3.1.3	Blutproben	13
3.2	ELISA	13
3.2.1	GDF-15	15
3.2.2	Activin A	16
3.3	Statistische Analyse	18
4	Ergebnisse	19
4.1	GDF-15	19
4.1.1	Patientenkollektiv	19
4.1.2	Mortalitätsanalyse	28
4.1.3	<i>Time to clinical worsening</i>	30
4.1.4	Uni- und Multivariate Cox Regression der GDF15 Konzentration	32
4.1.5	Uni- und Multivariate Cox Regression der dichotomisierten GDF15 Konzentration	34
4.1.6	Subgruppenanalyse	35
4.2	Activin A	45
4.2.1	Patientenkollektiv	45
4.2.2	Mortalitätsanalyse	50
4.2.3	<i>Time to clinical Worsening</i>	52
4.2.4	Uni- und Multivariate Cox Regression der Activin A Konzentration	53

4.2.5	Uni- und Multivariate Cox Regression der dichotomisierten Activin A Konzentration.....	55
4.2.6	Subgruppenanalyse	57
5	Diskussion.....	66
5.1	Erhöhte GDF-15 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie	66
5.2	Bedeutung von GDF-15 zur Beurteilung des Schweregrads der pulmonalen Hypertonie.....	68
5.3	Bedeutung von GDF-15 als diagnostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie	68
5.4	Bedeutung von GDF-15 als prognostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie.....	68
5.5	Erhöhte Activin A Plasmakonzentrationen bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie	70
5.6	Bedeutung von Activin A zur Beurteilung des Schweregrads der pulmonalen Hypertonie.....	71
5.7	Bedeutung von Activin A als diagnostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie	72
5.8	Bedeutung von Activin A als prognostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie.....	72
5.9	Limitation der Studie	74
6	Zusammenfassung	77
7	Abstract	79
8	Abkürzungsverzeichnis.....	80
9	Abbildungsverzeichnis	84
10	Tabellenverzeichnis	86
11	Literaturverzeichnis	87
12	Erklärung zur Dissertation.....	97
13	Danksagung.....	98
14	Lebenslauf	99

1 Einleitung

1.1 Die pulmonale Hypertonie

1.1.1 Definition

Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine fortschreitende Krankheit, die sowohl das Herz als auch die Lungengefäße betrifft [1, 2]. Sie führt über Umbauprozesse (*Remodeling*) der kleinen Lungengefäße zu einer erhöhten Druckbelastung des rechten Ventrikels und damit letzten Endes über ein Rechtsherzversagen zum vorzeitigen Tod [3, 4]. Definiert wird die pulmonale Hypertonie über einen permanent erhöhten pulmonal-arteriellen Mitteldruck (mPAP) von mehr als 25 mmHg in Ruhe, gemessen während einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung [5]. Da der mPAP unter Belastung bei älteren Patienten höher ist als bei jüngeren, wird eine Definition der pulmonalen Hypertonie über mPAP Drücke von mehr als 30 mmHg unter Belastung nicht mehr empfohlen [6]. Der Begriff „borderline PH“ für mPAP Drücke zwischen 21 und 24 mmHg wird allgemein nicht empfohlen, aber eine sorgfältige Beobachtung dieser Patienten wird angeraten [5]. Besonders Patienten mit systemischer Sklerose und idiopathischer Lungenfibrose sollten bei mPAP Drücken zwischen 21 und 24 mmHg beobachtet werden, weil diese leicht erhöhten Drücke bereits eine prognostische Signifikanz zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie aufweisen [7, 8].

1.1.2 Klassifikation

Die Klassifikation der pulmonalen Hypertonie des Welt Symposiums 2013 in Nizza ist Tabelle 1.1 zu entnehmen. Da diese Arbeit sich auf die Gruppen der idiopathischen pulmonalen Hypertonie (IPAH), der pulmonal-arteriellen Hypertonie assoziiert mit Kollagenosen (CTD), der chronisch thrombembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) und der pulmonalen Hypertonie bei Linksherzversagen (PVH) widmet, soll an dieser Stelle nur auf diese Gruppen näher eingegangen werden.

1.1.2.1 Idiopathische pulmonale Hypertonie

Die IPAH ist definiert als pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) unbekannter Ursache. Zudem ist sie durch einen mPAP von mehr als 25 mmHg in Ruhe, einem pulmonalkapillären Verschlussdruck (PAWP) kleiner oder gleich 15 mmHg, einem pulmonalvaskulären Widerstand (PVR) größer als 3 *Wood Units* (WU) definiert [5]. Patienten mit IPAH haben ein mittleres Überleben von 2,8 Jahren [9].

1.1.2.2 Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Kollagenosen

Die *Connective-Tissue-Disease-PH* (CTD-PH) ist definiert als pulmonal-arterielle Hypertonie assoziiert mit einer Kollagenose (z.B. systemischer Lupus Erythematoses (SLE), Sklerodermie, CREST-Syndrom usw.) [5]. Die Prävalenz der CTD-PH wird zwischen 7,85% und 13% geschätzt [10, 11]. Es zeigt sich, dass eine frühe Diagnostik der PAH bei Patienten mit systemischer Sklerose (SSc) das Überleben verbessert [12]. In der DETECT-Studie wiesen 19% der Patienten mit SSc eine pulmonale Hypertonie auf [13]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die spezifische Therapie der PH bei CTD-PH Patienten weniger effektiv ist als bei IPAH Patienten. Es zeigen jedoch 50% der CTD-PH Patienten mit einer gemischten Bindegewebserkrankung oder einem SLE eine gute Reaktion auf die Therapie mit Immunsuppressiva [14].

1.1.2.3 Chronisch Thrombembolische pulmonale Hypertonie

CTEPH ist eine potentiell heilbare Ätiologie der pulmonalen Hypertonie. Das beste Screening der CTEPH stellt die Ventilations/Perfusions-Szintigraphie dar. Bestätigt wird die Diagnose durch eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung (RHK) und eine Pulmonalis Angiographie (PAA) [15]. Die chirurgische Behandlung ist die Therapie der Wahl. Nur bei Non-Operabilität kommt eine spezifische medikamentöse Therapie der in Frage. Eine lebenslange Antikoagulation ist selbstverständlich [15, 16].

1.1.2.4 Pulmonale Hypertonie durch Linksherzversagen

Die PVH ist die häufigste Form der pulmonalen Hypertonie und eine Komplikation der Linksherzinsuffizienz [17]. Sie ist definiert über einen mPAP von mehr als 25 mmHg, einem PAWP von mehr als 15 mmHg und einem normalen oder reduzierten Herzzeitvolumen (HZV) [18, 19]. Der transpulmonale Gradient (TPG) wird benutzt, um zwischen einer „passiven“ (TPG<12 mmHg) und einer „reaktiven“ PH (TPG>12 mmHg) zu unterscheiden. Es wird empfohlen, die PVH in eine isolierte post-kapilläre PH mit einem PAWP > 15 mmHg und einer diastolischen Druck Differenz (DPD) < 7 mmHg sowie in eine kombinierte post-kapilläre und prä-kapilläre PH mit einem PAWP > 15 mmHg und einer DPD > 7 mmHg, einzuteilen [20].

Tabelle 1.1 Überarbeitete Klassifikation der pulmonalen Hypertonie von 2013
modifiziert nach Simonneau et al. 2013 [21].

- 1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)**
 - 1.1. Idiopathisch (IPAH)
 - 1.2. Hereditär
 - 1.2.1. BMPR2
 - 1.2.2. ALK1, Endoglin, SMAD9, CAV1, KCNK3
 - 1.2.3. Unbekannt
 - 1.3. Medikamenten- und Toxininduziert
 - 1.4. Assoziiert mit anderen Erkrankungen:
 - 1.4.1. Kollagenosen
 - 1.4.2. HIV-Infektion
 - 1.4.3. Portale Hypertension
 - 1.4.4. Kongenitaler Herzerkrankung
 - 1.4.5. Schistosomiasis
- 1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und/oder Pulmonal kapilläre Hämangiomatose (PCH)**
- 1''. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen**
- 2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen (PVH)**
 - 2.1. Systolische Dysfunktion
 - 2.2. Diastolische Dysfunktion
 - 2.3. Klappenerkrankungen
 - 2.4. Kongenitale/erworbene Obstruktion des linken Einfluss-/Ausflusstraktes und kongenitale Kardiomyopathien
- 3. Pulmonale Hypertonie assoziiert mit Erkrankungen der Lunge und/oder Hypoxie**
 - 3.1. COPD
 - 3.2. Interstitielle Lungenerkrankung
 - 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit kombinierten restriktiven und obstruktiven Mustern
 - 3.4. Schlafbezogene Atemstörungen
 - 3.5. Alveoläre Hypoventilationsstörungen
 - 3.6. Chronischer Aufenthalt in großer Höhe
 - 3.7. Entwicklungsstörungen
- 4. Chronisch Thrombembolische Pulmonale Hypertonie (CTEPH)**
- 5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen**
 - 5.1. Hämatologische Störungen: chronische hämolytische Anämie, Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
 - 5.2. Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Lymphangioleiomyomatose, Vaskulitis, Neurofibromatose
 - 5.3. Metabolische Störungen: Glykogenspeichererkrankung, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
 - 5.4. Andere: Tumorobstruktion, Fibrosierende Mediastinitis, Chronisches Nierenversagen oder Dialyse, segmentale pulmonale Hypertonie

1.1.3 Pathophysiologie

Der erhöhte Widerstand im Lungenkreislauf führt zu einer Druckbelastung des rechten Ventrikels [4]. Dies führt zu einer Erhöhung der rechtsventrikulären Wandspannung und weiter zur Aktivierung von neurohumoralen und immunologischen Prozessen, sowie zu veränderten bioenergetischen Prozessen (Ischämie, mitochondriale Umbauprozesse) [22]. Diese drei Faktoren führen zu Umbauprozessen (*Remodeling*) des Myokards. Dabei kommt es zu einer Hypertrophie, zu Veränderungen der Matrix und zu einer erhöhten Kontraktilität des rechten Ventrikels. Dieser Anpassungsprozess ermöglicht bei geringen Druckbelastungen einen gut an die Belastung adaptierten rechten Ventrikel. Übersteigt die Druckbelastung die maximale Anpassungsfähigkeit kommt es zu einer Dilatation und Insuffizienz des rechten Ventrikels. Begleitend können sich Arrhythmien und Ischämien zeigen [23]. Die maximale Anpassungsfähigkeit wird beeinflusst durch das Alter des Patienten und die Geschwindigkeit des Druckanstieges [24].

Die Pathophysiologie der pulmonalen Hypertonie in den Widerstandsgefäßen der Lunge wird durch die pathogenetischen Trias Vasokonstriktion, *Remodeling* und Thrombosen beschrieben [25]. Beim *Remodeling* handelt es sich um Umbauprozesse der Lungengefäße. Im Zusammenhang mit pulmonaler Hypertonie sind eine Fibrosierung der Intima, eine verstärkte Muskularisation periphere Lungenarterien, die mediale Hypertrophie muskulärer Arterien, der Verlust von kleinen präkapillären Arterien und Wucherungen des Endothels durch die Einwanderung von glatten Muskelzellen und der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen beschrieben [26, 27]. Diese endotheliale Proliferation geht einher mit einer Neoangiogenese, die zur Formation von glomerulären Strukturen sog. plexiformen Läsionen führt. Diese sind ein häufiges pathologisches Merkmal der Lungengefäße bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie. Zusätzlich wird ein Ungleichgewicht verschiedener vasoaktiver Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklinen, Endothelin-1, Serotonin und Thromboxan beschrieben. Viele dieser Mediatoren führen zu einer verstärkten Proliferation von glatten Muskelzellen. Daher wird ein Ungleichgewicht dieser Mediatoren mit einer Hypertrophie der Lungengefäße und deren *Remodeling* in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wird die endotheliale Dysfunktion und die damit verbundene verstärkte Präsentation von darunter liegenden Gewebestrukturen mit einer erhöhten Koagulabilität in Zusammenhang gebracht [28]. Außerdem werden Mutationen im *Bone-morphogenetic-protein-2* Rezeptor beschrieben, die zu einer verminderten

Apoptoserate der glatten Muskelzellen führen, dadurch kommt es zu Apoptose-resistenten Endothelzellen, die das Gefäßlumen verschließen können [24].

1.1.4 Klinik

Die anfängliche Klinik der Patienten ist häufig sehr unspezifisch und diskret. Die Patienten zeigen eine schnelle Ermüdbarkeit und eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit, die sich in einer Belastungsdyspnoe äußern kann. Hinzu kommen unspezifische Symptome, wie Schwindel oder Herzrhythmusstörungen. Bei einer Dekompensation des rechten Ventrikels äußern sich Zeichen, wie zum Beispiel eine Halsvenenstauung, Ödeme und eine Stauungsleber [26]. Die körperliche Untersuchung zeigt in einigen Fällen gestaute Halsvenen und einen gespaltenen zweiten Herzton [24].

1.1.5 Diagnostik

Die Diagnostik der pulmonalen Hypertonie sollte bei jedem Patienten mit dem klinischen Verdacht einer PH oder PAH, sowie bei Patienten mit ungeklärter Belastungsdyspnoe oder mit Zeichen der rechtsventrikulären Dysfunktion erfolgen. Dabei stellt die transthorakale Echokardiographie das beste nicht-invasive Screening dar. Die endgültige Diagnose sollte jedoch immer durch eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung gestellt werden [5].

1.1.5.1 Sechs-Minuten-Gehtest

Der Sechs-Minuten-Gehtest stellt einen einfachen submaximalen Belastungstest zur Ermittlung der kardiopulmonalen Belastbarkeit dar. Die Patienten gehen über sechs Minuten eine Strecke von ca. 30 Metern immer wieder auf und ab. Die in sechs Minuten zurückgelegte Gesamtstrecke stellt die *Six-Minute-Walk-Distance* (SMWD) dar [29]. Dieser Test zeigt eine sehr gute Reproduzierbarkeit und lässt sich auch an Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz durchführen, welche einen Belastungstest mit maximaler Belastung nicht tolerieren würden [30]. Darüber hinaus ist die SMWD ein prognostischer Marker bei pulmonaler Hypertonie. Patienten mit einer Distanz < 332 m haben eine signifikant schlechtere Überlebensrate als Patienten, die eine weitere Distanz laufen [31]. Eine SMWD < 300 m erhöht die Wahrscheinlichkeit zu versterben um den Faktor 2,4 [32].

1.1.5.2 Rechtsherzkatheter

Der Rechtsherzkatheter mit Messung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP), des HZV, des rechtsatrialen Druckes (RAP), des PAWP und der venösen und arteriellen Blutgase gilt weiterhin als Goldstandard bei der Sicherung der Diagnose der pulmonalen Hypertonie [3]. Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgt in der Regel mittels Thermodilution, welche auch bei sehr kleinem HZV verlässliche Ergebnisse liefert [33]. Zusätzlich bietet der Rechtsherzkatheter die Möglichkeit der pharmakologischen Testung. Dabei kommen inhalatives Stickstoffmonoxid (NO), Phosphodiesterase-5-Hemmer und Prostazyklin-Analoga zum Einsatz [34-37]. Der Rechtsherzkatheter stellt eine technisch anspruchsvolle Untersuchung dar, welche in 1,1% der Fälle mit einer ernsthaften Komplikation einhergeht. Die häufigsten Komplikationen sind mit dem venösen Zugang assoziiert (Hämatome, Pneumothorax), gefolgt von Arrhythmien und Hypotensionen während der pharmakologischen Testung [38]. Eine genaue Beschreibung der Durchführung des Rechtsherzkatheters am Universitätsklinikum Gießen erfolgt unter 3.1.2.

1.1.6 Therapie der pulmonalen Hypertonie

1.1.6.1 Spezifische medikamentöse Therapie

Zur spezifischen medikamentösen Therapie der pulmonalen Hypertonie sind neben Kalziumkanalblockern, Endothelin Rezeptor Antagonisten, Phosphodiesterase Typ 5 Inhibitoren, Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase, Prostazyklinanaloga und IP Prostazyklin Rezeptor Agonisten zugelassen [17, 39].

1.2 Biomarker

Der Begriff Biomarker leitet sich von *biological marker* ab und beschreibt ein weites Spektrum von medizinischen Zeichen, dabei handelt es sich um objektiv messbare und reproduzierbare medizinische Zustände [40]. Die *Biomarker Definitions Working Group* definiert einen Biomarker als ein Charakteristikum das objektiv messbar ist und als ein Indikator von normalen biologischen Prozessen, pathologischen Prozessen bzw. einen Indikator der eine Antwort auf eine pharmakologische therapeutische Intervention aufzeigt [41]. Es werden unter anderem drei verschiedene Arten von Biomarkern unterschieden: diagnostische, prognostische und Biomarker zur Beurteilung des Schweregrades. Für die pulmonale Hypertonie schließt dies zum Beispiel pathophysiologische Prozesse wie die endotheliale Dysfunktion, Thrombosen,

oxidativen Stress, aber auch eine rechtsventrikuläre Belastung und Insuffizienz ein [42]. Jedoch konnten bisher keine verlässlichen diagnostischen und nur wenige prognostische Laborparameter im Zusammenhang mit der pulmonalen Hypertonie identifiziert werden [43]. *Brain natriuretic peptide* (BNP) und das während der Spaltung von *Pro-Brain natriuretic peptide* (proBNP) entstehende *N-terminal B-type natriuretic peptide* (NT-proBNP) sind in verschiedenen Studien sowohl zum Zeitpunkt der Diagnose (*Baseline*) als auch im Verlauf (*Follow-up*) als unabhängiger Prädiktor für das Überleben für Patienten mit pulmonaler Hypertonie nachgewiesen [44-46]. Die Serum Konzentration von NT-proBNP stellt in Kombination mit der funktionellen Vitalkapazität, der Kohlenmonoxid Diffusionskapazität, dem Vorhandensein von Teleangiektasien, der Serum Harnsäurekonzentration, Anti-Zentromer Antikörpern und einer Rechtsverschiebung des Lagetyps im Elektrokardiogramm mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 82% einen guten Screening-Test für Patienten mit dem Verdacht einer pulmonalen Hypertonie dar [5]. Patienten mit NT-proBNP Spiegel >1800 ng/L haben dabei ein schlechteres Überleben als Patienten mit niedrigeren Werten [47]. Darüber hinaus wird ein verminderter arterieller Kohlendioxid Partialdruck (PaCO₂) in Ruhe mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [48]. Zudem ist die Serum Harnsäure-Konzentration als unabhängiger Prädiktor nachgewiesen. Die Konzentration der Harnsäure korreliert dabei negativ mit dem HZV, positiv mit der PVR und dem RAP und zeigt einen signifikanten Abfall während der vasodilatorischen Therapie [49, 50].

Außerdem stellt das C-reaktive Protein (CRP) einen Prädiktor für das Überleben und das Ansprechen auf eine Therapie für die PAH dar [51].

1.3 Transforming Growth Factor β

Zur *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) Familie zählen über 40 Mitglieder. Diese teilen sich wiederum auf in TGF- β s, Activine, Nodale, *Bone morphogenic* Proteine und *Growth differentiation factors* [52]. Bisher sind drei Isoformen der Transformierenden Wachstumsfaktoren Beta (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) in Säugetieren bekannt. Alle drei Isoformen werden von den meisten Zellen in einer inaktiven Form sekretiert und benötigen eine weitere Aktivierung [53]. Mitglieder der TGF- β Familie zeigen ein breites Spektrum von Effekten auf Zellen. Sie regulieren unter anderem das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, die Produktion der extrazellulären Matrix, die Apoptose und modulieren das Immunsystem. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige

Rolle bei der Zelldifferenzierung in der Embryonalentwicklung [54]. TGF- β Proteine aktivieren die SMAD-Kaskade durch Bindung an Serin/Threonin Kinase Rezeptoren vom Typ I und II. Der Begriff SMAD beschreibt eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die Einfluss auf die Signalkaskade von TGF- β nehmen. Dabei leitet sich der Name vom *Drosophila* Protein MAD (*Mothers Against Decapentaplegic*) und vom *Caenorhabditis elegans* Protein SMA (*Small body size*) ab [55]. Der intrazellulär ausgelöste Signalweg wird in SMAD-abhängig und SMAD-unabhängig eingeteilt [56]. Die SMAD Proteine werden in drei Klassen eingeteilt: Rezeptor-regulierende SMAD (R-SMAD), Co-mediator SMAD (Co-SMAD) und inhibitorische SMAD (I-SMAD). Das breite Spektrum an Effekten ergibt sich durch die große Vielfalt der spezifischen Genantwort der unterschiedlichen Zellen [57].

1.3.1 Growth-differentiation-factor 15

Growth-differentiation-factor 15 (GDF-15) ist identisch mit dem Makrophagen-inhibierenden Zytokin-1 (MIC-1), dem *placental bone morphogenetic protein* (PLAB), dem *placental transforming growth factor- β* (PTGFB) und dem *nonsteroidal antiinflammatory drug-activated gene-1* (NAG-1) [58-61].

Growth-differentiation-factor 15 wird als 40 kDa Prepropeptid translatiert. Nach einer Dimerisation mittels Disulfidbrücken am Endoplasmatischen Retikulum, wird das Dimer durch Proteasen an der Aminosäure 196 gespalten. Im Gegensatz zu anderen TGF- β Molekülen wird das Propeptid nicht für eine weitere Faltung und Sekretion benötigt. Von diesem Propeptid wird das N-terminale Ende abgespalten und GDF-15 wird als 30 kDa großes, durch Disulfidbrücken verbundenes, biologisch aktives Protein sekretiert. Die Sekretion wiederum wird durch multiple Faktoren und Zytokine verstärkt. Dabei verstärken Interleukin-1- β (IL-1 β), Interleukin-2 (IL-2) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) die Expression in Makrophagen [58, 62].

GDF-15 wird unter physiologischen Bedingungen vorrangig in der Leber, Prostata und der Plazenta exprimiert, [52, 59, 63]. Im Kardiovaskulären-System wird GDF-15 vor allem in Kardiomyozyten, Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Adipozyten exprimiert [64]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist wenig bekannt über die Expressierung in der Lunge [65]. Unter Hypoxie, oxydativen Stress sowie Entzündungen findet sich eine verstärkte Expressierung. Diese wird induziert durch einen Stickstoffmonoxid-abhängigen Signalweg. Des Weiteren findet sich eine verstärkte Expressierung bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie

Atherosklerose, einer erhöhten Vorlast und der damit verbundenen Herzinsuffizienz [52, 64]. Aufgrund der Assoziation von GDF-15 mit Biomarkern, der extrazellulären Matrix und Biomarkern, die eine endotheliale Dysfunktion aufzeigen wird vermutet, dass die Konzentration von GDF-15 die unterschiedlichsten Signalwege für die Entstehung und den Verlauf von Atherosklerose widerspiegelt [66]. Experimentelle Studien mit Kardiomyozyten bringen die Vermutung auf, dass GDF-15 eine protektive Rolle bei kardialen Schäden und der damit verbundenen Adaptation spielt [67].

Ferner sind erhöhte Plasmakonzentrationen bei Patienten mit Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) nachgewiesen und Zigarettenrauch erhöht die Produktion von GDF-15 in pulmonalen Epithelzellen, was zu einer Aktivierung von Phosphoinositol-3-Kinasen und der vermehrten Produktion von Mucin 5AC (MUC5AC) führt [68, 69].

Gesondert konnten in einer experimentellen Studie erhöhte Werte von GDF-15 in pulmonalen vaskulären Endothelzellen von Patienten mit Pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden. Die damit verbundenen Effekte auf die Proliferation und Apoptose der pulmonalen Endothelzellen lassen die Vermutung aufkommen, dass GDF-15 eine wichtige Rolle in der Homöostase der vaskulären Endothelzellen spielt [65].

GDF-15 ist ein starker unabhängiger Prädiktor für das Überleben von Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (KHK), sowohl für die stabile als auch für die instabile Angina Pectoris [70]. Darüber hinaus ist GDF-15 ein prognostischer Biomarker für Patienten mit einem *ST-elevation myocardial infarction* (STEMI), einem Herzinfarkt mit einer signifikanten ST-Streckenhebung im EKG [71]. In Bezug auf die pulmonale Hypertonie sind erhöhte GDF-15 Plasmaspiegel bei Patienten mit IPAH nachgewiesen. Dabei dient eine GDF-15 Konzentration > 1200 ng/l als oberes Limit. Diese korreliert in mehreren Studien unabhängig mit dem Überleben [72, 73]. Außerdem zeigen sich Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne CTEPH sowie zwischen Patienten die eine pulmonale Hypertonie assoziiert mit einer Sklerodermie haben und Sklerodermie Patienten ohne pulmonale Hypertonie [74, 75].

1.3.2 Activin A

Activin A ist ebenfalls ein Mitglied der TGF- β Superfamilie. Es besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundene β -Untereinheiten ($\beta\text{A}, \beta\text{B}$), die wiederum mit einer α -Untereinheit zum Inhibin dimerisieren können. Dabei können sich zwei unterschiedliche Formen bilden, Inhibin A ($\alpha\beta\text{A}$) und Inhibin B ($\alpha\beta\text{B}$). Aus den

jeweiligen β -Untereinheiten können sich folglich drei unterschiedliche Formen von Activin bilden, Activin A (β A, β A), Activin B (β B, β B) und Activin AB (β A, β B) [76]. Activin A wird in metaplastischen Epithelzellen, hyperplastischen glatten Muskelzellen, T-Helfer-Zellen (TH2), Trophoblasten, aktivierten Monozyten und Makrophagen exprimiert [77, 78]. Es zeigt sich eine verstärkte Expression in glatten Muskelzellen bei Patienten mit primärer und sekundärer pulmonaler Hypertonie und Asthma [78, 79]. Der Signalweg des Activin A verläuft analog zu anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie über SMAD2 und SMAD3 [80]. Zudem wird die Interaktion von Activin A mit dem Rezeptor durch Follistatin reguliert, indem es die Bindung verhindert [81]. Activin A wird innerhalb inflammatorischer Prozesse mit Fibrosierung und Gewebsumbau in Verbindung gebracht. Dabei wird Activin A während der frühen Kaskade fast zeitgleich mit TNF- α und vor Interleukin 6 (IL-6) ausgeschüttet [82]. Activin A führt zu einer Zunahme der Differenzierung von proinflammatorischen Makrophagen M1 und zu einer Reduzierung der immunsuppressiven M2 Makrophagen. Die Regulation der Polarisierung erfolgt über die SMAD2 Kaskade [83]. Es konnte gezeigt werden, dass die Activin A Konzentration mit dem Alter signifikant zunimmt, jedoch ausschließlich bei männlichen Patienten [84]. In experimentellen Studien konnten erhöhte Serumlevel von Activin A bei Patienten mit einem Herzversagen nachgewiesen werden. Zudem korrelierten die Spiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung, den hämodynamischen und neurohormonalen Parametern [85]. Außerdem wird Activin A eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des myokardialen Remodelings zugesprochen. Im Zusammenhang mit Matrix Metalloproteinasen (MMP) und *tissue inhibitors* der MMPs (TIMP) beeinflusst Activin die Balance der Synthese der extrazellulären Matrix [86, 87]. Zusätzlich scheint Activin A, die Ausschüttung des *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) zu verstärken, welches eine lokale Entzündungsreaktion hervorruft. Überdies zeigte sich, dass Activin A die Expression der Gene, die für BNP und das arteriale natriuretische Peptid (ANP) kodieren, erhöht [86, 88]. Bei gesunden Patienten im Alter zwischen 18 und 50 Jahren zeigen sich Serumkonzentrationen von Activin A von 87 ± 4 pg/ml, im Alter zwischen 51 und 65 Jahren 110 ± 5 pg/ml und über 65 Jahren 150 ± 9 pg/ml [89]. In Bezug auf die pulmonale Hypertonie sind erhöhte Activin A Konzentrationen im Plasma von Patienten mit IPAH, CTEPH und PH assoziiert mit anderen Erkrankungen, nachgewiesen. Darüber hinaus sind auch im Tiermodell erhöhte Konzentrationen nachgewiesen und es konnte gezeigt werden, dass Activin A die Genexpression von Endothelin-1 und *plasminogen activator*

inhibitor-1 (PAI-1) in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie verstärkt, die im Zusammenhang mit dem vaskulären Umbau stehen [90]. Zudem zeigen sich Korrelationen zwischen Mutationen im Activin A-Rezeptor bei Kindern mit kongenitaler PH [91].

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist zu überprüfen, ob es sich bei Growth Differentiation Factor-15 oder bei Activin A um einen diagnostischen, prognostischen oder einen Biomarker zur Beurteilung des Schweregrades für die pulmonale Hypertonie handelt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 3.1 Geräte und Materialien

Name	Hersteller
Human GDF-15 ELISA Kit	RayBiotech Inc. , Norcross, Vereinigte Staaten
Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine ELISA Kit	R&D Systems Inc., Minneapolis, Vereinigte Staaten
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

3.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasst 185 bzw. 170 Patienten für GDF-15 bzw. Activin A. Diese gliedern sich in fünf Untergruppen: 38 bzw. 35 Patienten mit IPAH, 40 bzw. 36 Patienten mit CTEPH, 38 bzw. 35 Patienten mit CTD, 27 bzw. 26 Patienten mit PVH und 42 bzw. 38 Patienten ohne pulmonale Hypertonie, die als Ausschlussgruppe dienen.

3.1.2 Rechtsherzkatheter

Die Rechtsherzkatheter-Untersuchung ist der Goldstandard zur Diagnostik der pulmonalen Hypertonie und hilft darüber hinaus, Entscheidungen zur genaueren Klassifizierung treffen zu können. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der pharmakologischen Testung während der Untersuchung. Im Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen, wird nach sonographischer Beurteilung der Halsvenen mittels Seldinger Technik ein zentralvenöser Zugang in aller Regel über die rechte Vena jugularis interna geschaffen. Über die in die Vene eingebrachte Schleuse wird ein vierlumiger 7,0 F Swan Ganz Katheter mit einer Länge von 110cm vorgeschoben. Der Rechtsherzkatheter ermöglicht die direkte Messung vieler hämodynamischer Werte. Dazu zählen der mittlere zentrale Venendruck (CVP), der mittlere rechtsatriale Druck (RAP), der rechtsventrikuläre Druck (RVP) und der pulmonalarterielle Druck (PAP). Darüber hinaus werden die Herzfrequenz (HF), der Blutdruck (RR), die O₂-Sättigung und die Blutgase (venös und arteriell) aufgezeichnet. Auf Grundlage dieser Parameter lassen sich weitere Werte ermitteln, wie der

pulmonalarterielle Gefäßwiderstand (*Pulmonary vascular resistance*, PVR), der Herzindex (*Cardiac Index*, CI) und viele weitere.

Seltene Komplikationen des Rechtsherzkatheters sind hämodynamisch relevante Herzrhythmusstörungen, Klappenschädigungen und punktionsbedingte Komplikationen. Sehr selten kann es zu einer Pulmonalarterienruptur kommen. Als häufigere Komplikationen zeigen sich jedoch katheterassoziierte Infektionen und Thrombenbildung. Am Universitätsklinikum Giessen werden daher prophylaktisch Cefazolin 2 g als „*single shot*“, sowie Heparin 5000IE intravenös (i.v.) als Bolus gegeben.

3.1.3 Blutproben

Allen Patienten werden während der Rechtsherzkatheter-Untersuchung nach der ersten Basismessung Blutproben aus der Pulmonalarterie entnommen. Dabei werden jeweils zwei kleine Citrat Blutentnahmeröhrchen und zwei große Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Blutentnahmeröhrchen entnommen.

Diese werden anschließend in der Zentrifuge bei 3000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wird bei beiden Citrat und bei einem EDTA Blutentnahmeröhrchen entnommen. Das zweite EDTA Blutentnahmeröhrchen wird als Vollblut verwendet. Danach werden die Proben aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Im Labor werden die Proben aufgetaut und in der Zentrifuge bei 3000 rpm 3 Minuten zentrifugiert. Danach werden die Proben ein weiteres Mal aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2 ELISA

ELISA steht für *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*, übersetzt Enzym-gebundenes Immunabsorptionsverfahren. Es handelt sich um ein auf Antikörperbindung basierendes Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, Viren oder auch Hormonen [92]. Diese Nachweismethode wurde simultan von der Forschungsgruppe um Peter Perlmann und Eva Engvall an der Universität von Stockholm, als auch von der Forschungsgruppe um Anton Schuurs und Bauke van Weemen aus den Niederlanden ab 1960 entwickelt. Sie ist heutzutage in vielen medizinischen Labors in automatischen Analysegeräten vertreten. Der Einfluss der Methodik wird dadurch bestärkt, dass sie seit 1970 als Schlüsselwort in der Literatur aufgeführt wird und heute als etabliertes Verfahren Ärzte und Patienten täglich unterstützt [93].

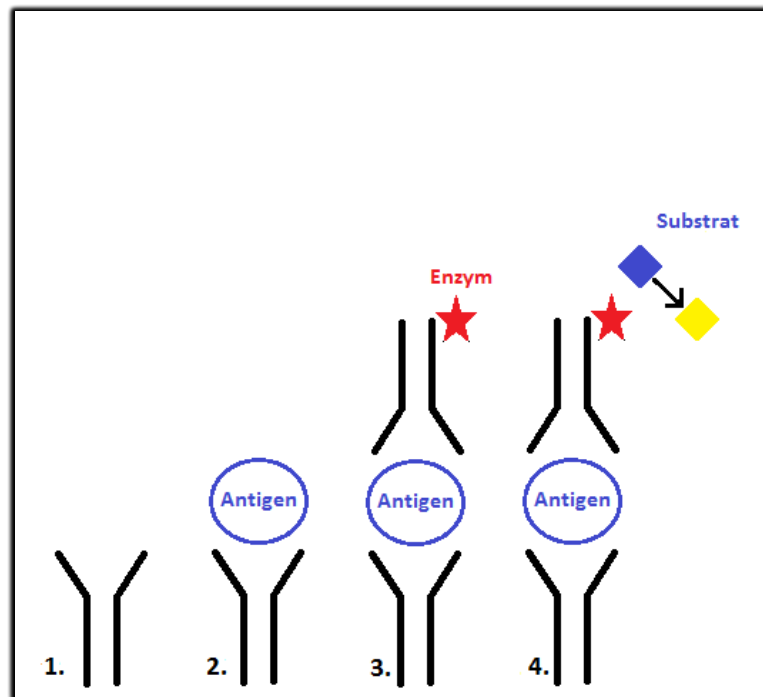


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Schritte eines ELISA

Im ersten Arbeitsschritt (1.) werden die als *Wells* bezeichneten Vertiefungen mit dem für das Antigen spezifischen Antikörper beschichtet. Im Anschluss daran, wird das Antigen zu dem *Well* hinzugegeben und bindet an den am Boden befindlichen Antikörper (2). Im anschließenden Waschvorgang werden alle nicht gebundenen Probenbestandteile aus dem *Well* entfernt. Im dritten Arbeitsschritt, wird ein mit einem Enzym versehener Antikörper hinzugeben, der spezifisch an die zuvor gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe bindet (3.). Im anschließenden Waschvorgang werden alle nicht gebundenen Antikörper entfernt. Es wird ein Substrat hinzugegeben, das durch das Enzym in einen Indikator umgewandelt wird. Die Lösung färbt sich stärker blau, je mehr Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe vorhanden sind und lässt somit eine Aussage über die Quantität des Antigens zu. Im letzten Schritt wird eine Säure hinzugeben, die den pH-Wert der Lösung senkt und somit die Aktivität des Enzyms beendet. Die Lösung färbt sich aufgrund der pH-Wert Veränderung gelb (4.). Die Stärke der Gelbfärbung ist weiterhin proportional zur Konzentration des Antigens. Anschließend wird die Absorption der jeweiligen Lösung in einem Photometer gemessen und in Bezug zu der Absorption des Standardantigens gebracht, um eine Aussage über die absolute Konzentration treffen zu können.

3.2.1 GDF-15

Zur der Bestimmung der GDF-15 Konzentration wird ein Sandwich ELISA der Firma Ray Biotech benutzt. Zunächst werden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (RT) aufgewärmt. Das konzentrierte *Assay Diluent* wird 5-fach mit deionisierten Wasser verdünnt. Die EDTA-Blutplasma Proben werden 1:25 mit dem vorbereiteten *Assay Diluent* verdünnt. Im Anschluss wird der GDF-15 Standard vorbereitet, indem die Standardampulle 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert wird, sodass sich das Pulver vollständig am Boden der Ampulle sammelt. Danach werden 400 µl *Assay Diluent* hinzugegeben, um eine 50 ng/ml Standardlösung zu erstellen. Die Ampulle wird 5 min auf dem Wipptisch gelagert, um das Pulver vollständig aufzulösen. Im nächsten Schritt werden 8 µl der Standardlösung in ein Mikroreaktionsgefäß mit 492 µl *Assay Diluent* gegeben, um eine 800 pg/ml Standardlösung herzustellen. Diese dient als der höchste Standard. Zur Herstellung der weiteren Verdünnungen werden 200 µl der vorbereiteten 800 pg/ml Standardlösung in ein Mikroreaktionsgefäß mit 300 µl *Assay Diluent* gegeben. Aus diesem Mikroreaktionsgefäß werden 200 µl in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß mit 300 µl *Assay Diluent* gegeben. Dieser Schritt wird viermal wiederholt, um Standardlösungen mit den Konzentrationen 800 pg/ml, 266,7 pg/ml, 88,89 pg/ml, 29,63 pg/ml, 9,88 pg/ml, 3,29 pg/ml und 1,10 pg/ml herzustellen. Das letzte Mikroreaktionsgefäß mit ausschließlich *Assay Diluent* dient als *Blank*, der von allen Werten subtrahiert wird.

Im nächsten Arbeitsschritt werden jeweils 100 µl des Standards und der Proben als Duplikate auf die 96 *Well* Platte aufgetragen und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Mini Rocker Wipptisch inkubiert. Währenddessen wird der Waschpuffer 20-fach mit deionisierten Wasser verdünnt. Die Ampulle des biotinylierten Antikörpers wird eine Minute bei 3000 rpm zentrifugiert. Danach werden 100 µl *Assay Diluent* hinzugegeben, um ein Antikörperkonzentrat zu erstellen. Dieses Konzentrat wird 80-fach mit *Assay Diluent* verdünnt. Im Anschluss an die Inkubation, werden die *Wells* viermal mit jeweils 300 µl des vorbereiteten Waschpuffers gewaschen. Nach dem Waschen werden die Flüssigkeiten durch Invertieren der Platte und Klopfen gegen Papiertücher vollständig entfernt.

Im Anschluss, werden jeweils 100 µl des vorbereiteten biotinylierten Antikörpers zu jedem *Well* hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Mini Rocker Wipptisch inkubiert. Während der Inkubation wird die HRP-Streptavidin Ampulle eine Minute bei 3000 rpm zentrifugiert und hoch und runter pipettiert, um die

Lösung gleichmäßig zu vermischen. Anschließend wird das Streptavidin Konzentrat 500 fach mit *Assay Diluent* verdünnt.

Im Anschluss an die einstündige Inkubation werden die *Wells* viermal mit jeweils 300 µl des vorbereiteten Waschpuffers, wie bereits oben beschrieben, gewaschen. Nach dem Waschen werden die Flüssigkeiten durch Invertieren der Platte und Klopfen gegen Papiertücher vollständig entfernt. In die *Wells* werden jeweils 100 µl des TMB Substrats gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur, im Dunkeln, auf dem Mini Rocker Wipptisch inkubiert. Die Lösung färbt sich nun in Relation zur Konzentration stärker blau. Im letzten Arbeitsschritt, werden jeweils 50 µl der *Stop Solution* hinzugegeben und die Lösung färbt sich entsprechend der Konzentration gelb. Die Platte wird direkt im Anschluss bei 450 nm im Photometer gemessen. Die Achsen zur Darstellung der Standardkurve werden beide in logarithmischer Form gewählt. Auf der X-Achse wird die Absorption aufgetragen, auf der Y-Achse die Konzentration.

Die Berechnung der Konzentration der Proben erfolgt anhand der Stärke der Absorption der jeweiligen Probe in Relation zur Standardkurve.

3.2.2 Activin A

Zur der Bestimmung der Activin A Konzentration wird ein Sandwich ELISA der Firma R&D benutzt. Da hohe Konzentrationen von Activin A im Speichel gefunden werden können, wird während der gesamten Messung ein Mundschutz getragen. Zunächst werden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur aufgewärmt. Anschließend werden 200 µl des biotinylierten Activin A Antikörpers in jedes *Well* gegeben und 20 min auf dem Orbital Mischer bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wird der Waschpuffer 25-fach mit deionisierten Wasser verdünnt. Im Anschluss an die Inkubation werden die *Wells* zweimal mit jeweils mit 400 µl des vorbereiteten Waschpuffers gewaschen. Nach dem Waschen werden die Flüssigkeiten durch Invertieren der Platte und Klopfen gegen Papiertücher vollständig entfernt. Es werden direkt 100 µl der *Assay Diluent RD1-81* in jedes *Well* gegeben. Die EDTA-Blutplasmaproben werden 1:5 mit dem *Calibrator Diluent RD5-54* verdünnt. Im Anschluss wird der Activin A Standard vorbereitet, indem 100 µl des Standards in ein Mikroreaktionsgefäß mit 900 µl *Calibrator Diluent RD5-54* gegeben werden, um einen 1000 pg/ml Standard herzustellen. Diese dient als der höchste Standard. Zur Herstellung der weiteren Verdünnungen, werden 500 µl der vorbereiteten 1000 pg/ml Standardlösung in ein Mikroreaktionsgefäß mit 500 µl *Calibrator Diluent RD5-54*

gegeben. Aus diesem Mikroreaktionsgefäß werden 500 µl in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß mit 500 µl *Calibrator Diluent RD5-54* gegeben. Dieser Schritt wird viermal wiederholt, um Standardlösungen mit den Konzentrationen 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml und 15,6 pg/ml herzustellen. Das letzte Mikroreaktionsgefäß mit ausschließlich *Calibrator Diluent RD5-54* dient als *Blank*, der von allen Werten subtrahiert wird.

Im nächsten Arbeitsschritt werden jeweils 100 µl des Standards und der Proben als Duplikate auf die 96 *Well* Platte aufgetragen und 3 h bei Raumtemperatur auf dem Orbital-Inkubationsmischer bei 500 rpm inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation, werden die *Wells* sechsmal mit jeweils 400 µl des vorbereiteten Waschpuffers gewaschen. Nach dem Waschen werden die Flüssigkeiten durch Invertieren der Platte und Klopfen gegen Papiertücher vollständig entfernt. Danach werden 200 µl *Activin A* Konjugat zu jedem *Well* hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Orbital-Inkubationsmischer bei 500 rpm inkubiert.

Die *Color Reagents A* und *B* werden 15 min vor dem Ende der Inkubationszeit zu einem Substrat zusammengemischt und vor Licht geschützt. Im Anschluss an die einstündige Inkubation werden die *Wells* sechsmal mit jeweils mit 400 µl des vorbereiteten Waschpuffers gewaschen. Nach dem Waschen werden die Flüssigkeiten durch Invertieren der Platte und Klopfen gegen Papiertücher vollständig entfernt.

In die *Wells* werden jeweils 200 µl des Substrats gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur, im Dunkeln, auf der Arbeitsbank inkubiert. Die Lösung färbt sich nun in Relation zur Konzentration stärker blau. Im letzten Arbeitsschritt werden jeweils 50 µl der *Stop Solution* hinzugegeben und die Lösung färbt sich entsprechend der Konzentration gelb. Die Platte wird direkt im Anschluss bei 540 nm im Photometer gemessen. Die Achsen zur Darstellung der Standardkurve werden beide in logarithmischer Form gewählt. Auf der X-Achse wird die Absorption aufgetragen, auf der Y-Achse die Konzentration.

Die Berechnung der Konzentration der Proben erfolgt anhand der Stärke der Absorption der jeweiligen Probe in Relation zur Standardkurve.

3.3 Statistische Analyse

Die Datenanalyse erfolgt mit Hilfe von SPSS 21 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois). Die Verfahren werden der jeweiligen Fragestellung angepasst. Zur Darstellung der Überlebensanalysen wird die Kaplan-Meier-Methode gewählt. Zusätzlich wird die Cox-Regressionsanalyse benutzt, um Aussagen über den Einfluss des Biomarkers auf das Überleben treffen zu können.

Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik werden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) für normalverteilte bzw. Median und Interquartilabstand (IQR) für nicht normalverteilte Werte angegeben. Vergleiche zwischen diskreten Werten erfolgen mittels nichtparametrischen Test (Kruskal-Wallis Test). Vergleiche der Konzentration des Biomarkers in den unterschiedlichen Ätiologien erfolgen mittels ANOVA und anschließendem Post Hoc Test (Tukey HSD). Die Korrelationen der hämodynamischen Parameter mit der Konzentration des Biomarkers werden mittels Pearson-Korrelationskoeffizient dargestellt. Das Signifikanzniveau wird mit 0,05 definiert. Das Signifikanzniveau für die Cox Regression wird mit 0,124 definiert.

Die Analyse der Überlebenszeit erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode.

In dieser Arbeit wird die Kaplan-Meier-Analyse benutzt, um das Überleben bezogen auf den Biomarker und die Zeit bis zur Therapieerweiterung bezogen auf den Biomarker, darzustellen. In der multivariaten Cox-Analyse wird der Einfluss des Biomarkers auf das Überleben in Abhängigkeit des Geschlechts, PVR, SMWD und der NYHA-Klassifikation untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 GDF-15

4.1.1 Patientenkollektiv

Die GDF-15-Konzentration wird bei 185 Patienten gemessen. Von diesen sind 112 weiblich (61%) und 73 männlich (39%). 38 Patienten (20%) haben eine idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie (IPAH) davon sind 23 weiblich (61%), 38 Patienten (20%) haben eine pulmonal arterielle Hypertonie assoziiert mit Kollagenosen (CTD) davon sind 31 weiblich (81%), 40 Patienten (21%) haben eine chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) davon sind 17 weiblich (43%), 27 Patienten (15%) haben eine pulmonale Hypertonie bei Linksherzversagen (PVH) davon sind 15 weiblich (56%) und 42 Patienten (23%) haben keine pulmonale Hypertonie und dienen als Ausschlussgruppe von diesen sind 26 weiblich (62%).

4.1.1.1 NYHA-Klassifikation

45 Patienten (24%) sind in NYHA-Klasse II, 100 Patienten (54%) sind in NYHA-Klasse III und 26 Patienten (14%) sind in NYHA-Klasse IV. Bei 14 Patienten fehlt die NYHA-Klassifikation. Bezogen auf die unterschiedlichen Diagnosen sind 13 der 38 IPAH Patienten in NYHA-Klasse II, 20 in NYHA-Klasse III und 5 in NYHA-Klasse IV. 6 der 38 CTD Patienten sind in NYHA-Klasse II, 20 in NYHA-Klasse III und 11 in NYHA-Klasse IV, bei einem Patienten fehlt die NYHA-Klassifikation. 10 der 40 CTEPH Patienten sind in NYHA-Klasse II, 24 in NYHA-Klasse III und 5 in NYHA-Klasse IV, bei einem Patienten fehlt die NYHA-Klassifikation. 10 der 27 PVH Patienten sind in NYHA-Klasse II, 14 in NYHA-Klasse III und 3 in NYHA-Klasse IV. 6 der 42 Ausschluss Patienten sind in NYHA-Klasse II, 22 in NYHA-Klasse III und 2 in NYHA-Klasse IV, bei 12 Patienten fehlt die NYHA-Klassifikation.

Die hämodynamischen Parameter des gesamten Patientenkollektivs sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. In Tabelle 4.2 sind die hämodynamischen Parameter der jeweiligen Ätiologien dargestellt.

Tabelle 4.1 Charakteristika des gesamten GDF-15-Kollektivs

Hämodynamik	Einheit		Mittelwert±SD Median [IQR]
SMWD	m	(n=152)	320±123
mPAP	mmHg	(n=185)	37±15
PAWP	mmHg	(n=185)	10±5
HZV	l/min	(n=185)	4,5±1,2
CI	l/min/m ²	(n=185)	2,4±0,6
PVR	dyn*sec*cm ⁻⁵	(n=185)	443 [536]

Tabelle 4.2 Charakteristika der einzelnen Ätiologien des GDF-15-Kollektivs

Hämo- dynamik	Einheit	IPAH	CTD	CTEPH	PVH	Ausschluss
SMWD	m	356±133 (n=37)	309±130 (n=33)	303±111 (n=35)	307±97 (n=21)	319±132 (n=26)
mPAP	mmHg	48±15 (n=38)	44±11 (n=38)	40±9 (n=40)	39±10 (n=27)	18±4 (n=42)
PAWP	mmHg	8±3 (n=38)	8±4 (n=38)	9±4 (n=40)	17±6 (n=27)	8±4 (n=42)
HZV	l/min	4,0±1,0 (n=38)	4,2±0,9 (n=38)	4,5±1,3 (n=40)	4,9±1,2 (n=27)	5,2±1,3 (n=42)
CI	l/min/m ²	2,2±0,6 (n=38)	2,4±0,5 (n=38)	2,3±0,6 (n=40)	2,5±0,6 (n=27)	2,7±0,7 (n=42)
PVR	dyn* sec*cm ⁻⁵	739 [593] (n=38)	655 [510] (n=38)	505 [408] (n=40)	320 [279] (n=27)	154 [104] (n=42)

4.1.1.2 Genauere Charakterisierung der Ausschluss-Gruppe

Die Patienten des Ausschluss-Kollektivs sind zum Zeitpunkt des Katheters im Mittel 67 ± 11 Jahre alt und haben einen mittleren *Body-Mass-Index* (BMI) von $27,43 \pm 7,20$. In der Echokardiographie zeigen sie eine mittlere linksventrikuläre Ejektionsfraktion von 59 ± 17 , diese Untersuchung fehlt bei 16 Patienten. 16 der 42 Patienten (38,1%) weisen eine in der Echokardiographie beschriebene diastolische Compliancestörung des linken Ventrikels auf. Bei 26 Patienten (61,9%) fehlt diese Angabe oder die Untersuchung wurde nicht durchgeführt. 15 der 42 Patienten (35,7%) weisen eine kardiologische Begleiterkrankung auf, 19 Patienten (45,2%) eine pneumologische, 3 Patienten (7,1%) eine thrombembolische und 5 Patienten (11,9%) haben eine Kollagenose als Begleiterkrankung.

4.1.1.3 Plasmakonzentrationen von GDF-15

Die Konzentration von GDF-15 zeigen im gesamten Kollektiv eine Spannweite von 11 pg/ml bis 11821 pg/ml, mit einem Mittelwert $\pm$ SD von $2174,39 \pm 2032,06$ pg/ml. Die Abweichung, innerhalb der Kontrollen der verschiedenen GDF-15 Messungen, kann durch das eventuelle wiederholte Auftauen der Proben bedingt sein. Entsprechend dieser Abweichung der Kontrollen wird eine Messung zweimal wiederholt und es zeigt sich eine konstante Abweichung innerhalb der Proben. Bei dieser Abweichung ist das Verhältnis für die Proben innerhalb der drei Messungen für alle Proben konstant. Nach intensiver Analyse der Daten wird die Abweichung der Mittelwerte der einzelnen Messungen untersucht. Diese befindet sich unterhalb der vom Hersteller angegebenen 12%. Somit werden die erhobenen Daten für valide befunden.

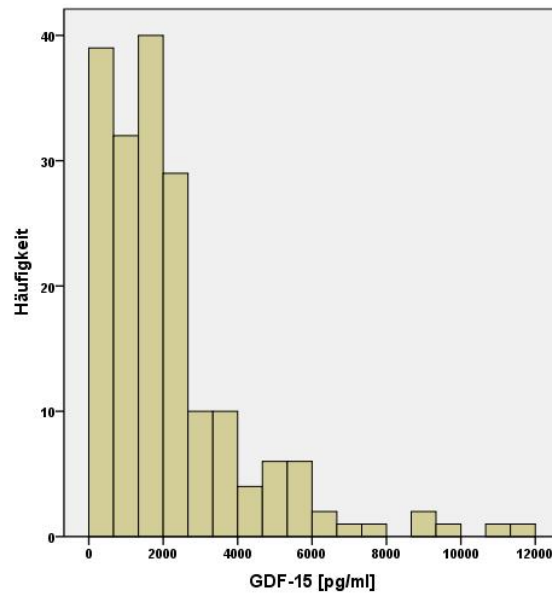


Abbildung 4.1 GDF-15Konzentrationen des Gesamtkollektivs

Nach logarithmieren der GDF-15 Konzentrationen zur Anpassung an eine Normalverteilung, ergibt sich ein Mittelwert $\pm$ SD von $7,27\pm 1,00$.

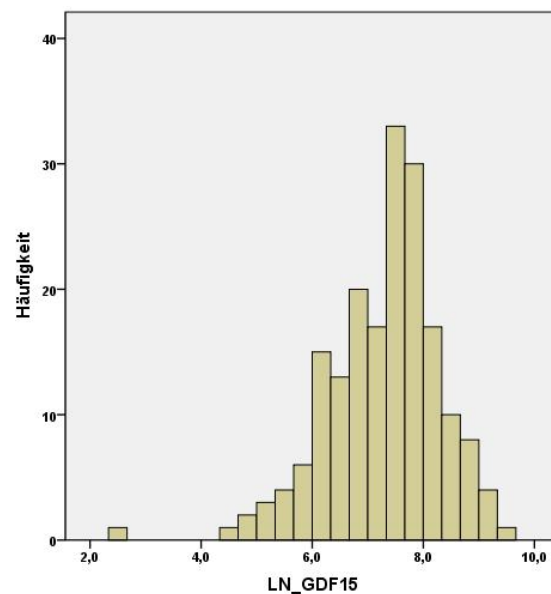


Abbildung 4.2 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des Gesamtkollektivs

Bezogen auf die unterschiedlichen Diagnosen zeigt sich bei den IPAH Patienten ein Mittelwert $\pm$ SD der GDF-15 Konzentration von $1447,51\pm 1348,83$ pg/ml, bei den CTD Patienten von $2781,81\pm 2504,05$ pg/ml, bei den CTEPH Patienten von $1933,35\pm 1378,70$ pg/ml, bei den PVH Patienten von $2780,38\pm 2572,40$ pg/ml und in der Ausschlussgruppe von $2122,48\pm 2023,26$ pg/ml.

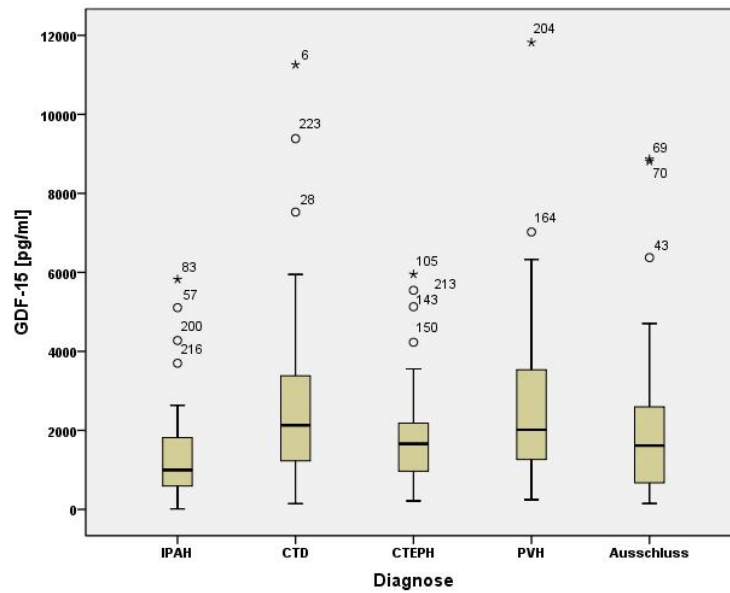


Abbildung 4.3 Boxplot GDF-15 Konzentrationen für die unterschiedlichen Diagnosen
 Nach logarithmieren weisen die IPAH Patienten einen Mittelwert $\pm$ SD von $6,80\pm 1,19$, die CTD Patienten von $7,54\pm 0,99$, die CTEPH Patienten von $7,32\pm 0,74$, die PVH Patienten von $7,54\pm 0,96$ und die Ausschlussgruppe von $7,25\pm 0,97$ auf.

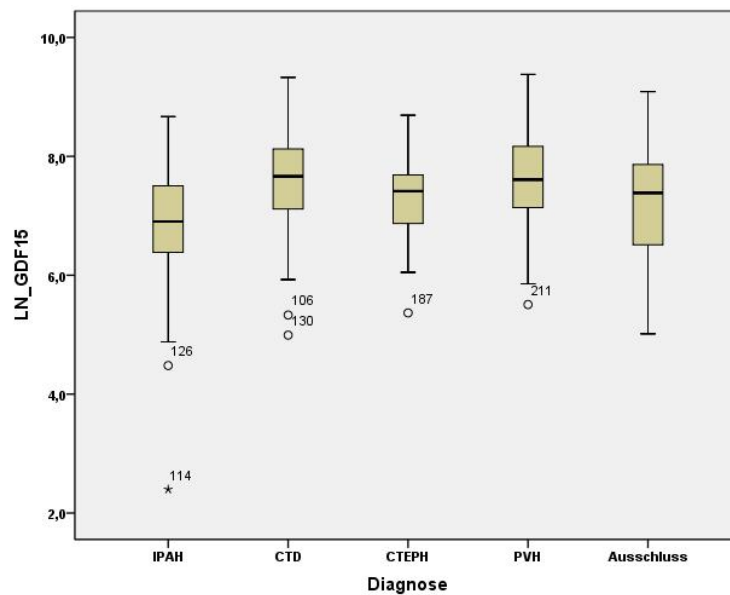


Abbildung 4.4 Boxplot der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen der unterschiedlichen Diagnosen

Die Varianzanalyse zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,01$). Nach anschließender Überprüfung mittels Tukey HSD Test erweist sich der Unterschied zwischen den IPAH Patienten und den CTD Patienten als signifikant ($p=0,011$), jedoch als klinisch nicht relevant. Zudem ist der Unterschied zwischen den IPAH Patienten und den PVH Patienten signifikant ($p=0,026$), jedoch ebenfalls nicht klinisch relevant. Die Unterschiede zwischen den Erkrankten und der Ausschlussgruppe sind nicht signifikant. Daher kann die GDF-15 Konzentration im Plasma von Patienten mit pulmonaler Hypertonie nicht als diagnostischer Biomarker genutzt werden.

Die anschließenden Analysen werden ohne die Ausschluss-Gruppe durchgeführt. Dies dient der korrekten Darstellung der Ergebnisse mit der Fokussierung auf die an pulmonaler Hypertonie erkrankten Patienten.

4.1.1.4 Korrelation mit der funktionellen Klasse

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test der logarithmierten Plasmakonzentration von GDF-15 mit den funktionellen Klassen zeigt keinen signifikanten Wert ($p=0,281$).

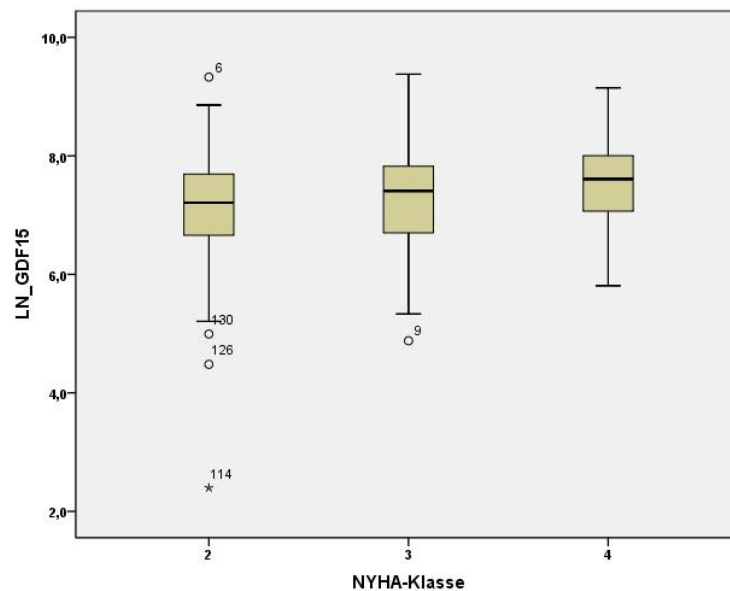


Abbildung 4.5 Boxplot Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen für die NYHA-Klassen

4.1.1.5 Korrelation mit dem Geschlecht

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p=0,723$).

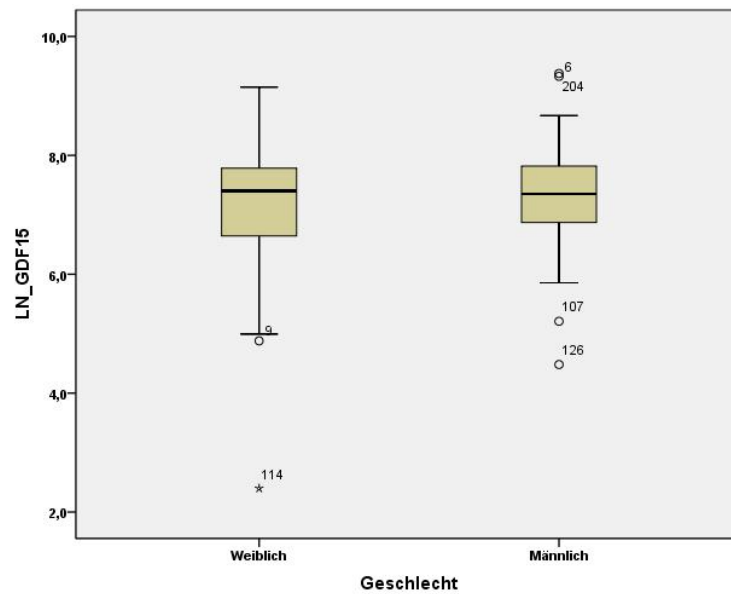


Abbildung 4.6 Boxplot Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen für die Geschlechter

4.1.1.6 Korrelation der hämodynamischen Parameter

Die Korrelation der unterschiedlichen hämodynamischen Parameter mit der logarithmierten Plasmakonzentration von GDF-15 ist signifikant für den PAWP ($p=0,048$) bei einem Signifikanzniveau von 0,05 mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,165, sowie signifikant für die SMWD bei einem Signifikanzniveau von 0,01 ($p=0,001$) mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von -0,302.

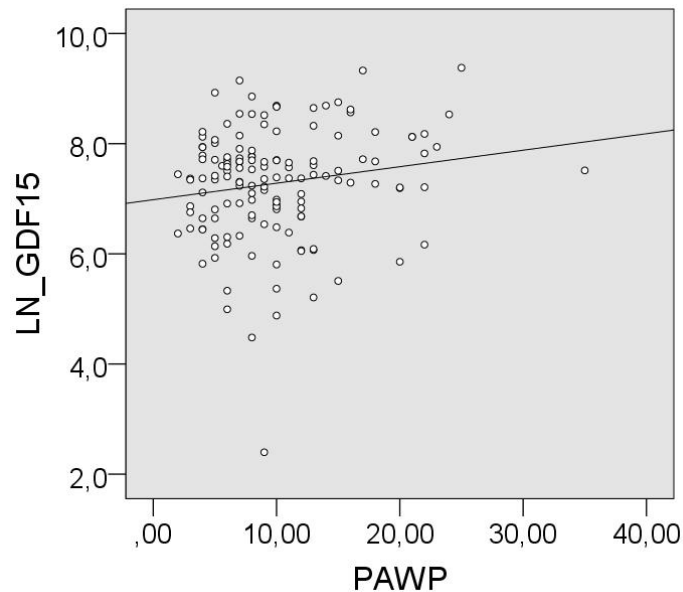


Abbildung 4.7 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit PAWP für das Gesamtkollektiv

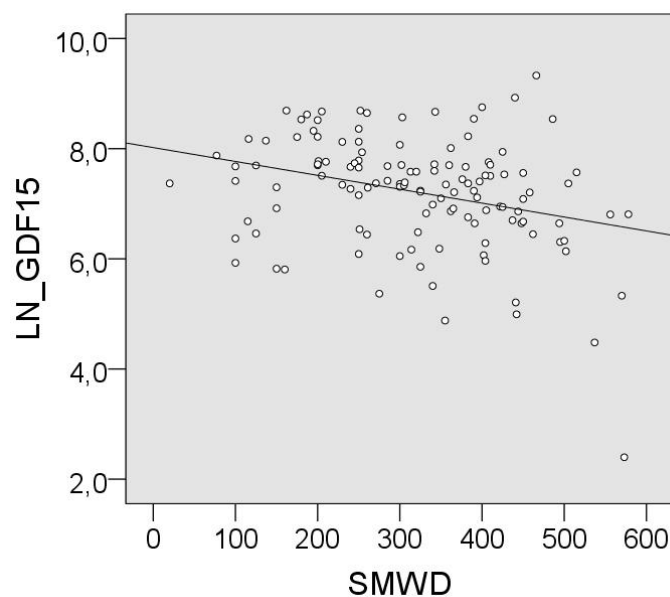


Abbildung 4.8 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit SMWD für das Gesamtkollektiv

In Tabelle 4.3 sind die Korrelationen der hämodynamischen Parameter dargestellt.

Tabelle 4.3 Korrelation der hämodynamischen Parameter

Korrelationen		mPAP	PAWP	HZV	CI	PVR	SMWD
mPAP	Pearson		-0,32	-0,364	-0,374	0,813	0,036
	Korrelation Sig. (2 Seitig)		0,701	<0,001	<0,001	<0,001	0,686
PAWP	Pearson	-0,32		0,185	0,081	-0,330	-0,155
	Korrelation Sig. (2 Seitig)	0,701		0,027	0,338	<0,001	0,084
HZV	Pearson	-0,364	0,185		0,888	-0,661	0,048
	Korrelation Sig. (2 Seitig)	<0,001	0,027		<0,001	<0,001	0,597
CI	Pearson	-0,374	0,081	0,888		-0,606	0,127
	Korrelation Sig. (2 Seitig)	<0,001	0,338	<0,001		<0,001	0,158
PVR	Pearson	0,813	-0,330	-0,661	-0,606		0,020
	Korrelation Sig. (2 Seitig)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		0,820
SMWD	Pearson	0,036	-0,155	0,048	0,127	0,020	
	Korrelation Sig. (2 Seitig)	0,686	0,084	0,597	0,158	0,820	

4.1.2 Mortalitätsanalyse

Es werden 142 Patienten in die Analyse einbezogen. Von diesen verstarben 26 Patienten (18,3%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 91,2%, 75,3% bzw. 70,1%.

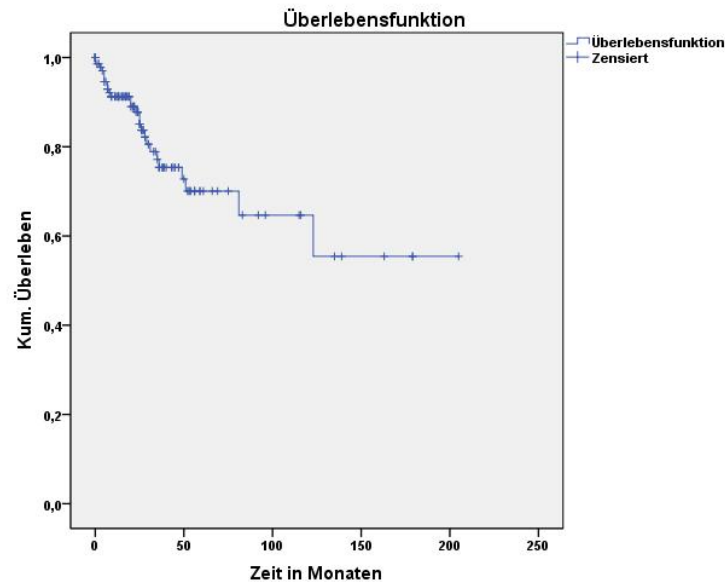


Abbildung 4.9 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtkollektiv

Die Konzentrationen werden in Quartile aufgeteilt. Diese Zuteilung zu einem Quartil wird in allen weiteren Analysen verwendet. Das erste Quartil umfasst 33 Patienten, davon versterben vier im Beobachtungszeitraum (12,1%). Das erste Quartil weist ein mittleres Überleben von 172 Monaten (95% Konfidenzintervall 142-202 Monate) auf. Das zweite Quartil umfasst 33 Patienten, davon versterben zwei Patienten im Beobachtungszeitraum (6,1%). Das zweite Quartil weist ein mittleres Überleben von 160 Monaten (135-185 Monate) auf. Das dritte Quartil umfasst 40 Patienten, von diesen versterben 8 im Beobachtungszeitraum (20,0%). Das dritte Quartil zeigt ein mittleres Überleben von 93 Monaten (67-120 Monate). Das vierte Quartil umfasst 36 Patienten, von diesen versterben 12 im Beobachtungszeitraum (33,3%). Das vierte Quartil weist ein mittleres Überleben von 44 Monaten (30-57 Monate) auf.

Der Log-Rang Test ist signifikant ($p=0,001$) für die Mortalität bezogen auf die logarithmierte GDF15 Konzentration. Die anschließende Cox Regression ist ebenfalls signifikant ($p=0,004$) mit einem *Hazard Ratio* (HR) von 2,009. Das *Hazard Ratio* jeweils betrachtet gegen das vierte Quartil, ist für das erste Quartil 4,61 ($p=0,009$), für das zweite Quartil 10,53 ($p=0,003$) und für das dritte Quartil 2,31 ($p=0,069$).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung von GDF-15 als prädiktiver Biomarker für die pulmonale Hypertonie.

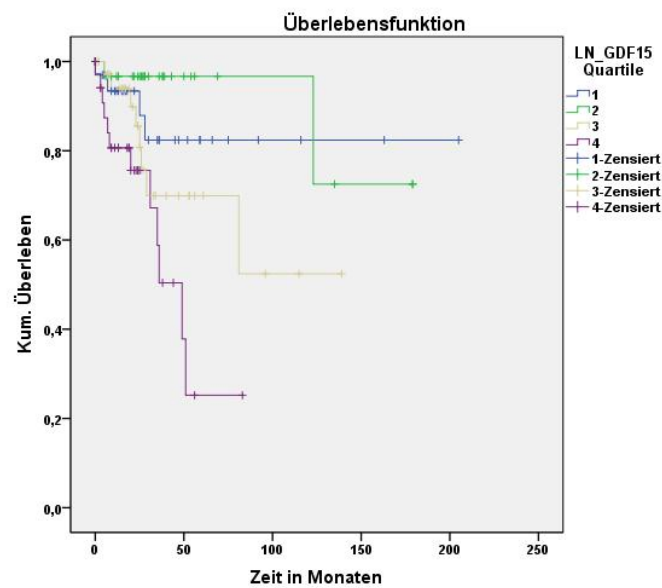


Abbildung 4.10 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das Gesamtkollektiv

4.1.3 Time to clinical worsening

Die *Time to clinical worsening* (TTCW) beschreibt die Zeit bis, aufgrund einer Verschlechterung der Klinik der Patienten, eine Kombination mehrerer Medikamente zur Behandlung der Pulmonalen Hypertonie gewählt wird. Dieser Parameter dient der unterstützenden Beschreibung der Mortalitätsanalyse.

Es werden 133 Patienten in die Analyse einbezogen. Von diesen erhalten 53 Patienten (39,8%) innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie.

Die Wahrscheinlichkeit innerhalb von 1, 3 und 5 Jahren eine Kombinationstherapie zu erhalten liegt bei 24,2%, 46,9% bzw. 60,3%.

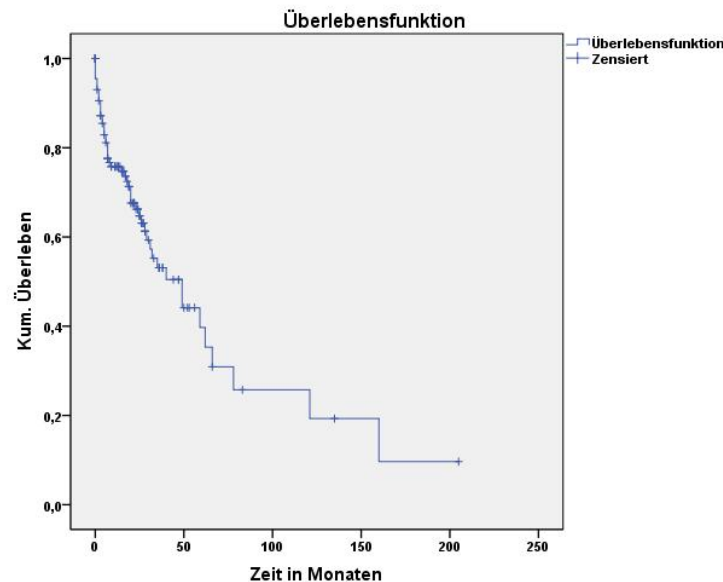


Abbildung 4.11 Kaplan-Meier Kurve für die TTCW für das Gesamtkollektiv

Das erste Quartil umfasst 30 Patienten, davon erhalten 13 innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (43,3%). Das erste Quartil weist eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 74 Monaten (95% Konfidenzintervall 29-120 Monate) auf. Das zweite Quartil umfasst 32 Patienten, davon erhalten 10 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (31,2%). Das zweite Quartil weist eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 87 Monaten (49-124 Monate) auf. Das dritte Quartil umfasst 39 Patienten, von diesen erhalten 16 innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (41,0%). Das dritte Quartil zeigt eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 39 Monaten (26-52 Monate). Das vierte Quartil umfasst 32 Patienten, von diesen

erhalten 14 innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (43,7%). Das vierte Quartil weist eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 33 Monaten (17-48 Monate) auf.

Der Log-Rang Test ist nicht signifikant ($p=0,160$) für die TTCW bezogen auf die logarithmierte GDF15 Konzentration. Die anschließende Cox Regression ist signifikant ($p=0,096$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,307.

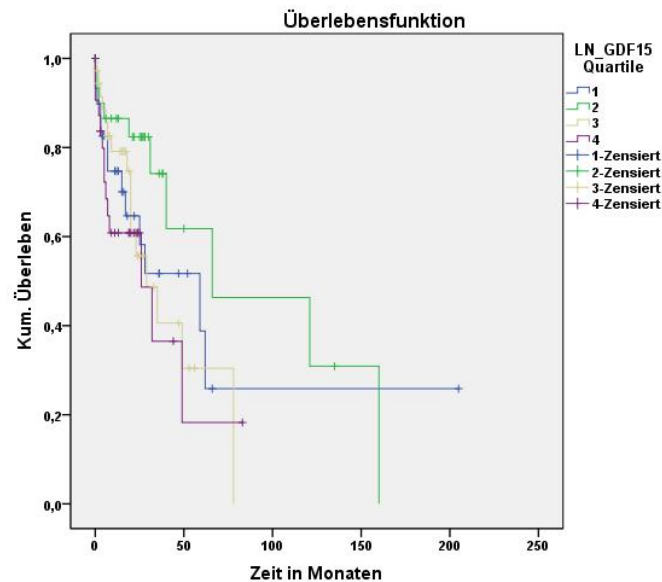


Abbildung 4.12 Kaplan-Meier Kurven für die TTCW nach Quartilen für das Gesamtkollektiv

4.1.4 Uni- und Multivariate Cox Regression der GDF15 Konzentration

In der univariaten Cox Regression zeigt sich der logarithmierte Wert der GDF-15 Konzentration (LN_GDF-15) als signifikanter Prädiktor für das Überleben ($p=0.004$). In der multivariaten Analyse zeigt sich, dass LN_GDF-15 weiterhin signifikant ist und nach der SMWD den zweitstärksten Prädiktor für das Überleben darstellt.

Tabelle 4.4 Uni- und multivariate Cox Regression mit Geschlecht und PVR

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN_GDF-15	2,009 (1,256 bis 3,212)	0,004	2,031 (1,272 bis 3,242)	0,003
PVR			1,001 (1,000 bis 1,001)	0,171
Geschlecht			1,883 (0,820 bis 4,325)	0,136

Tabelle 4.5 Multivariate Cox Regression zusätzlich mit SMWD

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN_GDF-15	2,009 (1,256 bis 3,212)	0,004	1,552 (0,891 bis 2,705)	0,121
PVR			1,001 (1,000 bis 1,002)	0,223
Geschlecht			1,288 (0,480 bis 3,459)	0,615
SMWD			0,990 (0,984 bis 0,995)	<0,001

Tabelle 4.6 Multivariate Cox Regression zusätzlich mit NYHA

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN_GDF-15	2,009 (1,256 bis 3,212)	0,004	1,396 (0,805 bis 2,419)	0,235
PVR			1,000 (0,999 bis 1,001)	0,728
Geschlecht			0,851 (0,301 bis 2,408)	0,762
SMWD			0,990 (0,985 bis 0,996)	0,001
NYHA 3			0,651 (0,147 bis 2,877)	0,571
NYHA 4			0,254 (0,073 bis 0,884)	0,031

Betrachtet man LN_GDF-15 in der univariaten Cox Regression in den jeweiligen Ätiologien, so lassen sich die signifikanten Werte des gesamten Kollektivs nicht reproduzieren vgl. Tab. 4.7. Dies lässt sich jedoch durch die geringe Größe und die nicht gegebene Anzahl an Todesfällen der Untergruppen erklären.

Tabelle 4.7 Vergleich der univariaten Cox Regression in den einzelnen Ätiologien

Ätiologien		
	Sig.	HR (95% CI)
IPAH	0,317	1,590 (0,641 bis 3,942)
CTD	0,052	1,901 (0,995 bis 3,632)
CTEPH	0,167	2,530 (0,677 bis 9,451)
PVH	Nicht möglich	

4.1.5 Uni- und Multivariate Cox Regression der dichotomisierten GDF15

Konzentration

Die logarithmierte Konzentration von GDF15 wird in zwei Kollektive jeweils größer bzw. kleiner des Median (7,39) aufgeteilt. Diese Variable wird als LN-GDF-15_dicho definiert. Anschließend wird eine uni- und multivariate Cox Regression durchgeführt.

Tabelle 4.8 Uni- und Multivariate Cox Regression der logarithmierten und dichotomisierten GDF-15 Konzentration mit dem Geschlecht und der SMWD

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN_GDF-15_dicho	4,191 (1,655 bis 10,614)	0,003	3,215 (0,805 bis 2,419)	0,033
Geschlecht			1,252 (0,301 bis 2,408)	0,640
SMWD			0,990 (0,985 bis 0,996)	<0,001

In der univariaten Cox Regression zeigt sich ein signifikanter Unterschied für das Überleben ($p=0.003$) bezogen auf eine LN-GDF-15 Konzentration größer bzw. kleiner als der Median. In der multivariaten Analyse zeigt sich, dass LN_GDF-15_dicho weiterhin signifikant ist, jedoch die SMWD den stärksten Prädiktor für das Überleben darstellt. Abbildung 4.13 verdeutlicht den Unterschied des Überlebens abhängig davon, ob die LN_GDF-15 Konzentration größer bzw. kleiner ist als der Median ist.

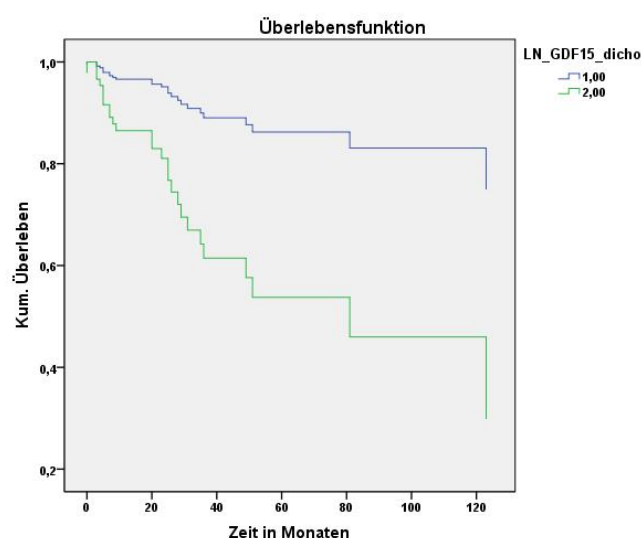


Abbildung 4.13 Kaplan-Meier Kurven für die dichotomisierten logarithmierten GDF15 Konzentrationen

4.1.6 Subgruppenanalyse

4.1.6.1 IPAH Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des IPAH-Kollektivs sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Die Plasmakonzentration des GDF-15 weist eine Spannweite von 11 pg/ml bis 5823 pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von $1447,51 \pm 1348,83$ pg/ml auf.

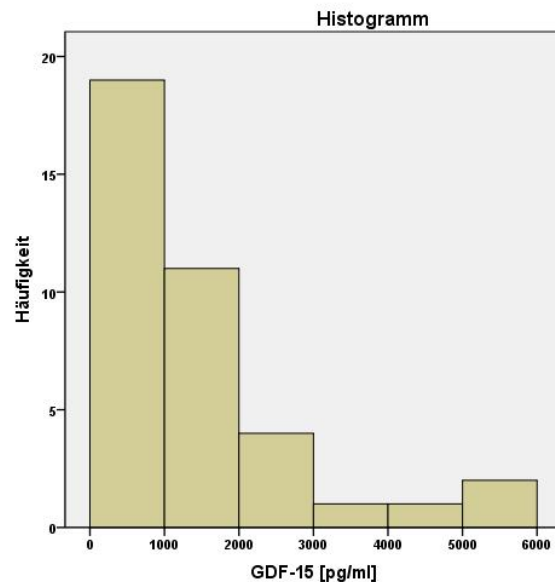


Abbildung 4.14 GDF-15 Konzentrationen des IPAH-Kollektivs

Nach logarithmieren der GDF-15 Konzentrationen zur Anpassung an eine Normalverteilung, ergibt sich ein Mittelwert $\pm$ SD von $6,80 \pm 1,19$.

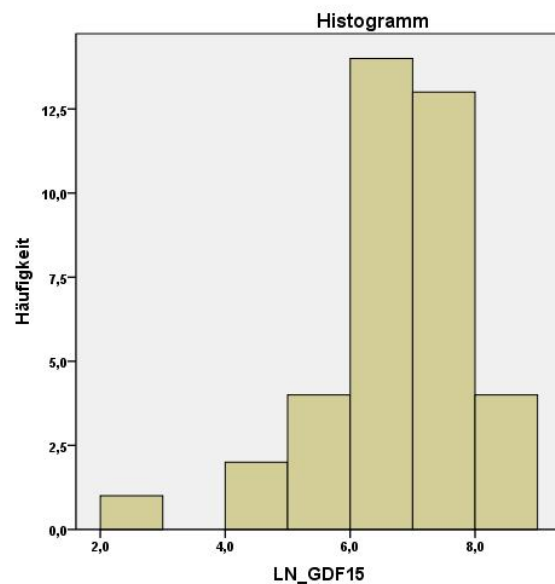


Abbildung 4.15 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des IPAH-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,199$). Darüber hinaus findet sich

kein Unterschied zwischen den Geschlechtern, sowohl für die rational skalierten Werte, als auch für die logarithmierten Werte. Die Korrelationen der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit den hämodynamischen Parametern zeigen keinen signifikanten Zusammenhang.

Es werden 38 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen sterben 7 Patienten (18,4%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 94,7%, 81,1% bzw. 81,1%.

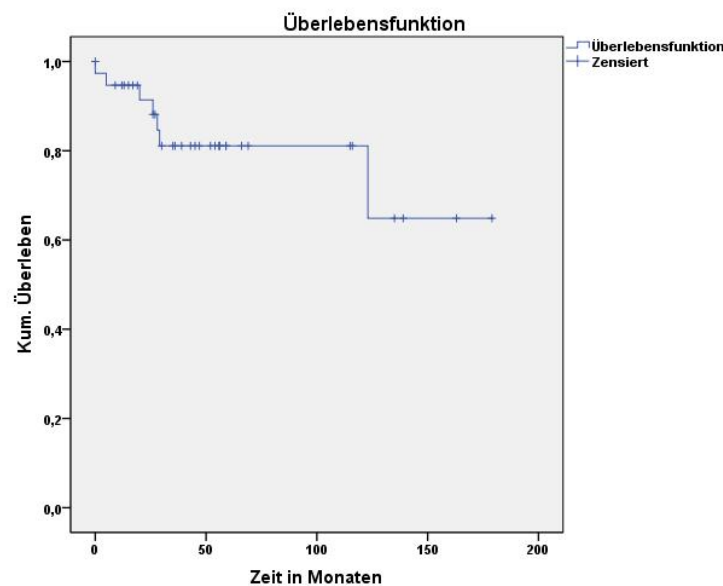


Abbildung 4.16 Kaplan-Meier Kurve für das IPAH-Kollektiv

Das erste Quartil hat ein mittleres Überleben von 142 Monaten (95% Konfidenzintervall 114-169 Monate), das zweite Quartil 160 Monaten (130-190 Monate), das dritte Quartil 82 Monaten (36-128 Monate) und das vierte Quartil 43 Monaten (22-65 Monate).

Der Log-Rang Test ist nicht signifikant ($p=0.219$) für die Mortalität bezogen auf die logarithmierte GDF-15 Konzentration. Die anschließende Cox Regression ist ebenfalls nicht signifikant ($p=0.317$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,590. Das *Hazard Ratio* betrachtet gegen das vierte Quartil ist für das erste Quartil 3,773 ($p=0,291$), für das zweite Quartil 7,194 ($p=0,179$) und für das dritte Quartil 1,186 ($p=0,887$).

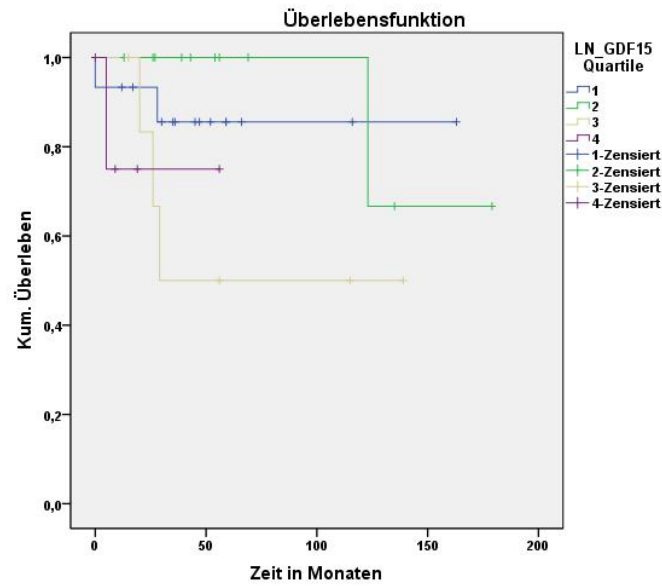


Abbildung 4.17 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das IPAH-Kollektiv

4.1.6.2 CTD Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des CTD-Kollektivs sind in Tab. 4.2 aufgeführt.

Die Plasmakonzentration des GDF-15 weist eine Spannweite von 147 pg/ml bis 11256 pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von 2781,81 $\pm$ 2504,05 pg/ml auf.

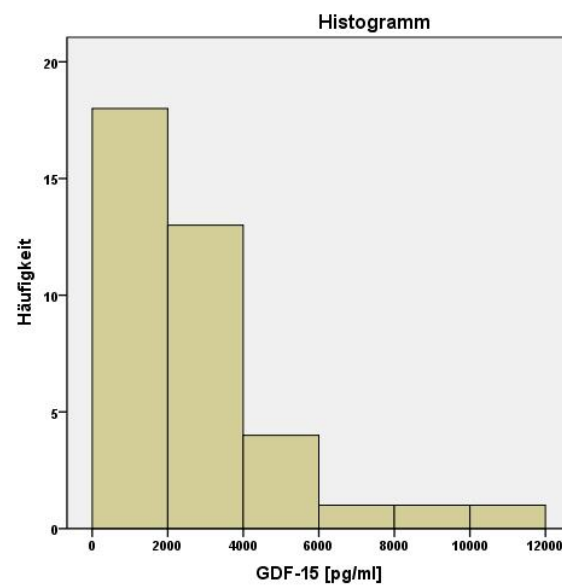


Abbildung 4.18 GDF-15 Konzentrationen des CTD-Kollektivs

Nach logarithmieren der GDF-15 Konzentrationen zur Anpassung an eine Normalverteilung, ergibt sich ein Mittelwert $\pm$ SD von $7,54\pm 0,99$

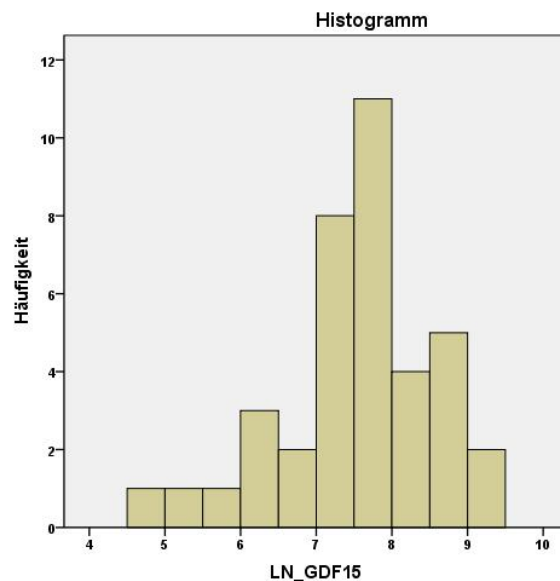


Abbildung 4.19 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des CTD-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,700$). Darüber hinaus findet sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern, sowohl für die rational skalierten Werte, als auch für die logarithmierten Werte. Die Korrelationen der logarithmierten GDF-15 Konzentration mit den hämodynamischen Parametern, zeigt nur für den PAWP einen signifikanten Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,324 ($p=0,047$).

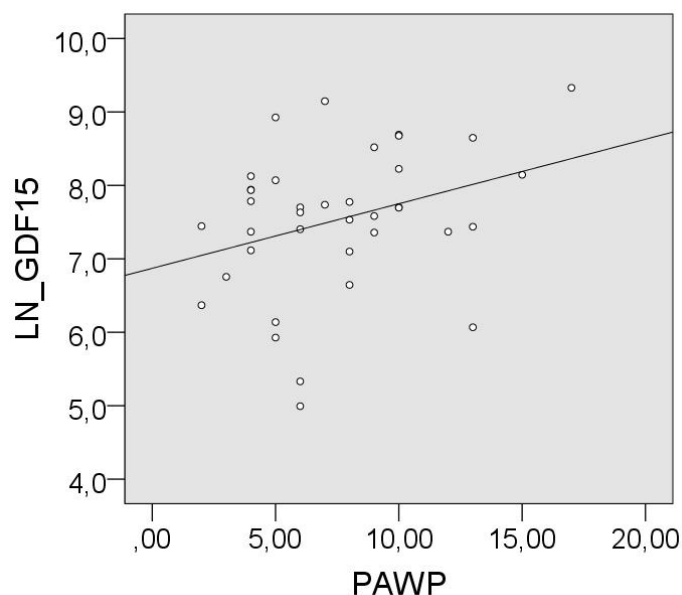


Abbildung 4.20 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit dem PAWP

Es werden 38 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen sterben 14 Patienten (36,8%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 85,3%, 62,1% bzw. 50,8%.

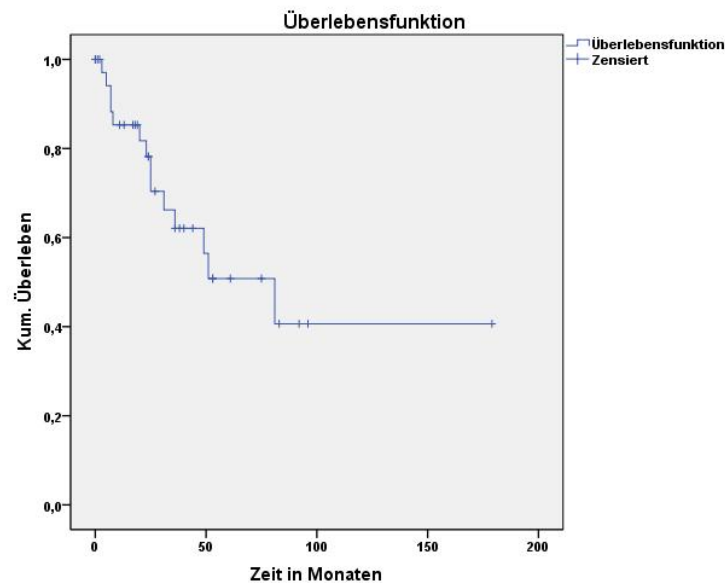


Abbildung 4.21 Kaplan-Meier Kurve für das CTD-Kollektiv

Der Log-Rang Test ist nicht signifikant ($p=0.124$) für die Mortalität bezogen auf die logarithmierte GDF-15 Konzentration.

Die anschließende Cox Regression ist signifikant ($p=0.052$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,901. Das *Hazard Ratio* betrachtet gegen das vierte Quartil ist für das erste Quartil 2,500 ($p=0,247$), für das zweite Quartil 0,000 ($p=0,982$) und für das dritte Quartil 2,740 ($p=0,102$).

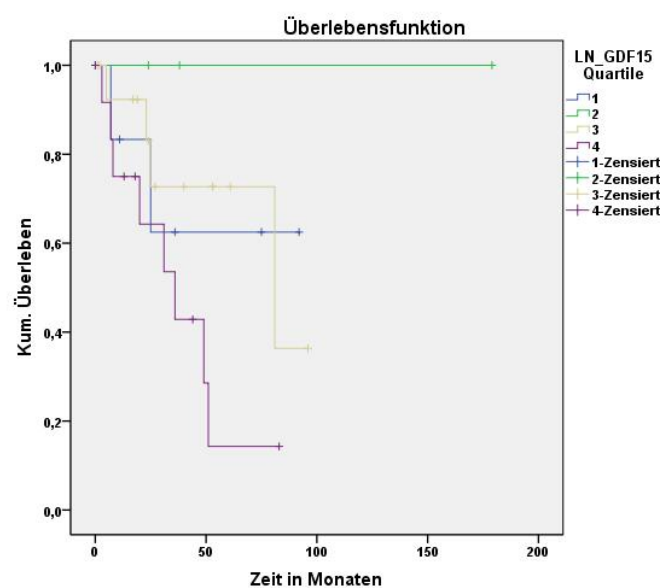


Abbildung 4.22 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTD-Kollektiv

4.1.6.3 CTEPH Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des CTEPH-Kollektivs sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Die Plasmakonzentration des GDF-15 weist eine Spannweite von 214 pg/ml bis 5952 pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von $1933,35 \pm 1378,70$ pg/ml auf.

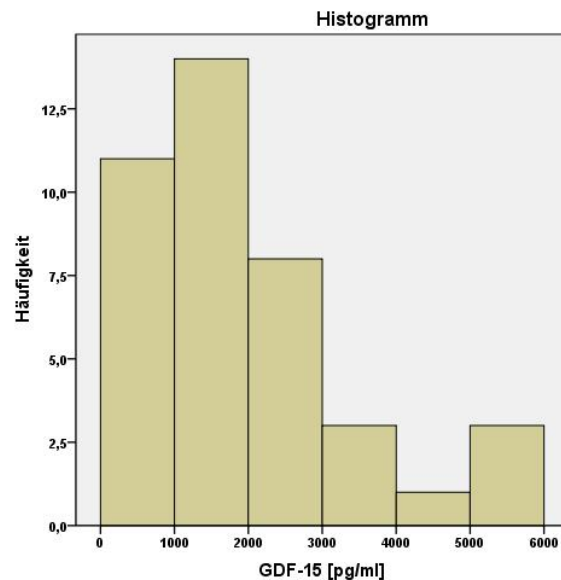


Abbildung 4.23 GDF-15 Konzentrationen des CTEPH-Kollektivs

Nach logarithmieren der GDF-15 Konzentrationen zur Anpassung an eine Normalverteilung, ergibt sich ein Mittelwert $\pm$ SD von $7,32 \pm 0,74$

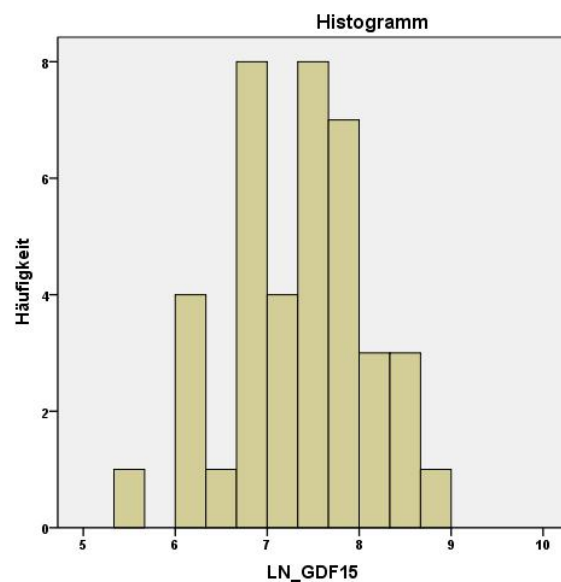


Abbildung 4.24 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des CTEPH-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,192$). Darüber hinaus findet sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern, sowohl für die rational skalierten Werte,

als auch für die logarithmierten Werte. Die Korrelationen der logarithmierten GDF-15 Konzentration mit den hämodynamischen Parametern, zeigt nur für die SMWD einen signifikanten Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von $-0,357$ ($p=0,035$).

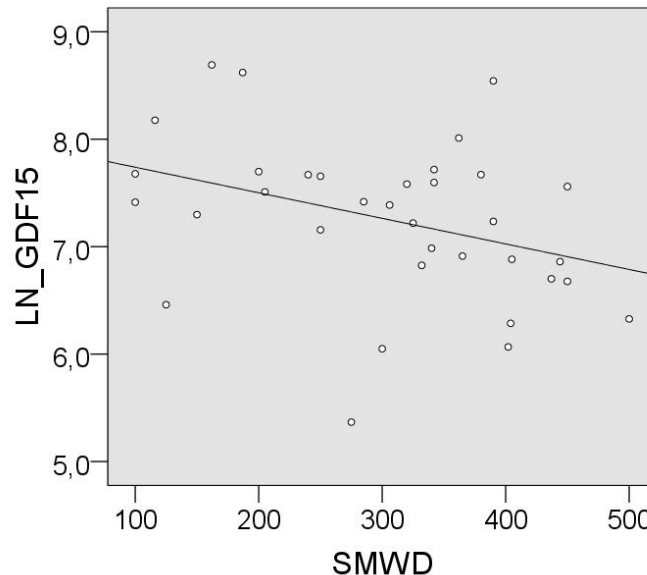


Abbildung 4.25 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit der SMWD für das CTEPH-Kollektiv

Es werden 39 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen sterben 5 Patienten (12,8%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 88,0%, 73,4% bzw. 73,4%.

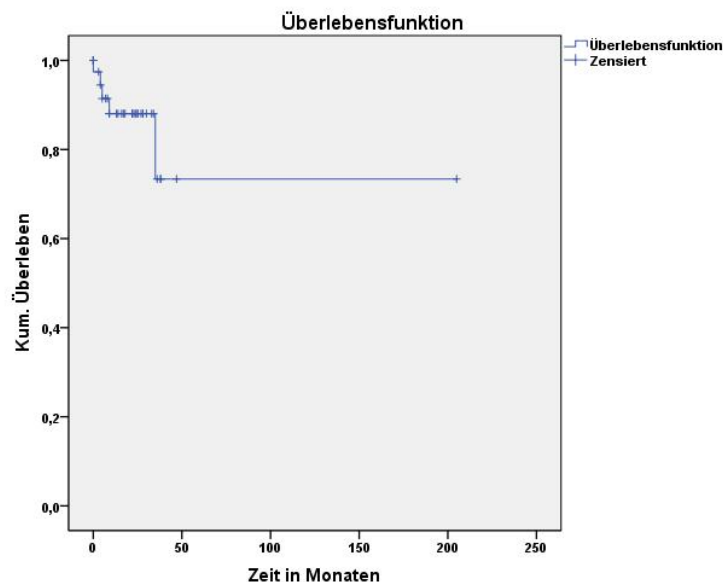


Abbildung 4.26 Kaplan-Meier Kurve für das CTEPH-Kollektiv

Der Log-Rang Test ist nicht signifikant ($p=0.789$) für die Mortalität bezogen auf die logarithmierte GDF-15 Konzentration. Die anschließende Cox Regression ist ebenfalls nicht signifikant ($p=0.167$) mit einem *Hazard Ratio* von 2,530. Das *Hazard Ratio* betrachtet gegen das vierte Quartil ist für das erste Quartil 0,000 ($p=0,983$), für das zweite Quartil 4,651 ($p=0,185$) und für das dritte Quartil 4,545 ($p=0,196$).

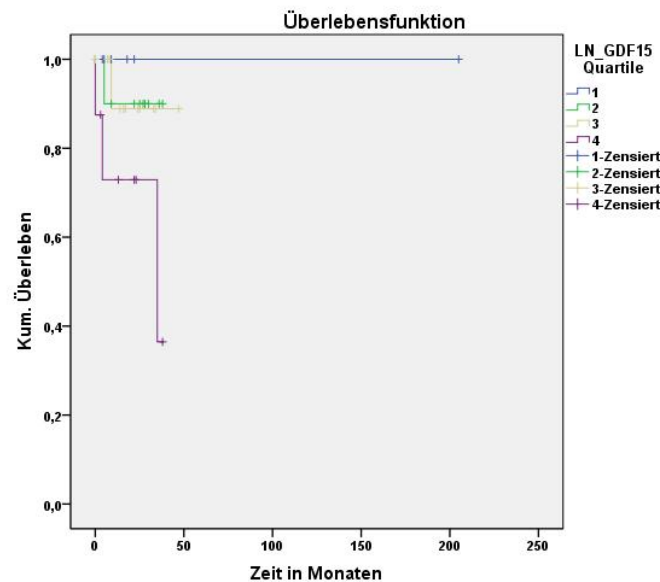


Abbildung 4.27 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTEPH-Kollektiv

4.1.6.4 PVH Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des PVH-Kollektivs sind in Tab. 4.2 aufgeführt. Die Plasmakonzentration des GDF-15 weist eine Spannweite von 247 pg/ml bis 11821 pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von $2780,38 \pm 2572,40$ pg/ml auf.

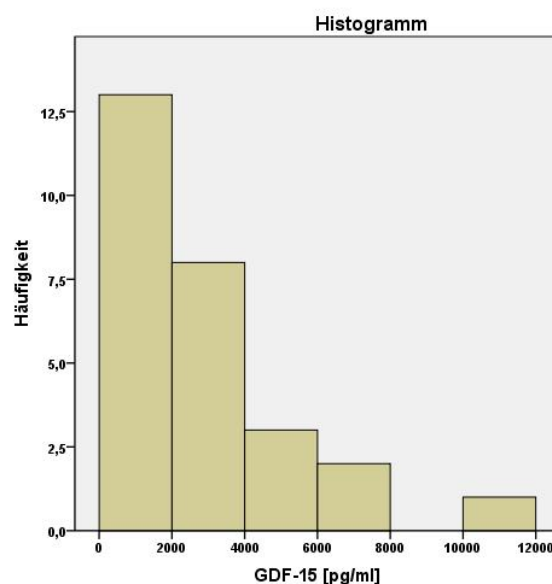


Abbildung 4.28 GDF-15 Konzentrationen des PVH-Kollektivs

Nach logarithmieren der GDF-15 Konzentrationen zur Anpassung an eine Normalverteilung, ergibt sich ein Mittelwert $\pm$ SD von $7,54 \pm 0,96$

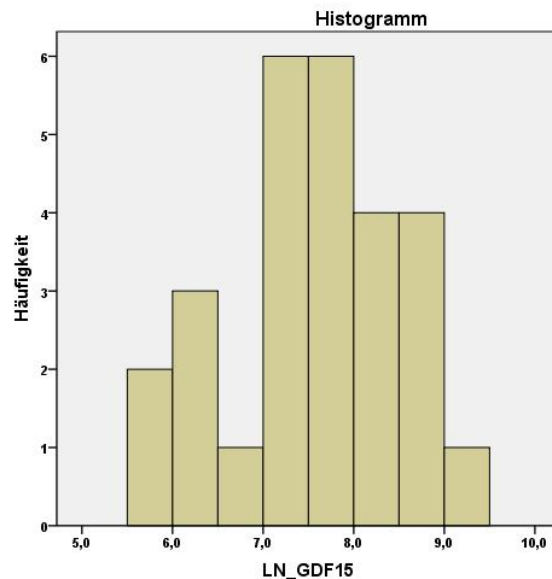


Abbildung 4.29 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des PVH-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,604$). Darüber hinaus findet sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern, sowohl für die rational skalierten Werte, als auch für die logarithmierten Werte. Die Korrelationen der logarithmierten GDF-15 Konzentration mit den hämodynamischen Parametern, zeigt für den mPAP einen signifikanten Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,391 ($p=0,044$).

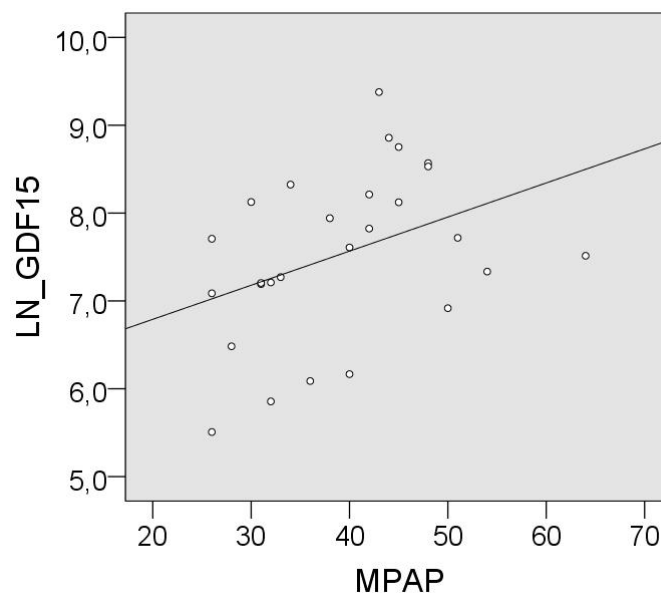


Abbildung 4.30 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentration mit dem mPAP

Es werden 27 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen versterben keine Patienten (0%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Daher kann das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben und die Cox Regression nicht ermittelt werden.

4.2 Activin A

4.2.1 Patientenkollektiv

Es werden 170 Patienten auf ihre Activin A Konzentration untersucht. Von diesen 170 sind 103 weiblich (60,6%) und 67 männlich (39,4%). 35 Patienten (20,6%) haben eine idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie (IPAH) davon sind 20 weiblich (57,1%), 35 Patienten (20,6%) haben eine pulmonal arterielle Hypertonie assoziiert mit Kollagenosen (CTD) davon sind 29 weiblich (82,9%), 36 Patienten (21,2%) haben eine chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) davon sind 15 weiblich (41,7%), 26 Patienten (15,3%) haben eine pulmonale Hypertonie bei Linksherzversagen (PVH) davon sind 15 weiblich (57,7%) und 38 Patienten (22,4%) haben keine pulmonale Hypertonie und dienen als Ausschlussgruppe von diesen sind 24 weiblich (63,2%).

4.2.1.1 NYHA-Klassifikation

43 Patienten (25,3%) sind in NYHA-Klasse II, 90 Patienten (52,9%) sind in NYHA-Klasse III und 23 Patienten (13,5%) sind in NYHA-Klasse IV. Bei 14 Patienten fehlt die NYHA-Klassifikation. Bezogen auf die unterschiedlichen Diagnosen sind 13 der 35 IPAH Patienten in NYHA-Klasse II, 18 in NYHA-Klasse III und 4 in NYHA-Klasse IV. 5 der 35 CTD Patienten sind in NYHA-Klasse II, 19 in NYHA-Klasse III und 10 in NYHA-Klasse IV. Bei einem Patienten fehlt die Angabe zur NYHA-Klasse. 9 der 36 CTEPH Patienten sind in NYHA-Klasse II, 21 in NYHA-Klasse III und 5 in NYHA-Klasse IV. Bei einem Patienten fehlt die Angabe zur NYHA-Klasse. 10 der 26 PVH Patienten sind in NYHA-Klasse II, 14 in NYHA-Klasse III und 2 in NYHA-Klasse IV. 6 der 38 Ausschluss Patienten sind in NYHA-Klasse II, 18 in NYHA-Klasse III und 2 in NYHA-Klasse IV. Bei 12 Patienten fehlt die Angabe zur NYHA-Klasse.

Die hämodynamischen Parameter des gesamten Patientenkollektivs sind in Tabelle 4.9 aufgeführt. In Tabelle 4.10 sind die hämodynamischen Parameter der jeweiligen Diagnose dargestellt.

Tabelle 4.9 Charakteristika des gesamten Activin A Kollektivs

Hämodynamik	Einheit		Mittelwert±SD Median [IQR]
SMWD	m	(n=139)	325±124
mPAP	mmHg	(n=170)	37±15
PAWP	mmHg	(n=170)	10±5
HZV	l/min	(n=170)	4,6±1,2
CI	l/min/m ²	(n=170)	2,4±0,6
PVR	dyn*sec*cm ⁻⁵	(n=170)	430 [534]

Tabelle 4.10 Charakteristika der einzelnen Ätiologien für das Activin A Kollektiv

Hämo- dynamik	Einheit	IPAH	CTD	CTEPH	PVH	Ausschluss
SMWD	m	357±132 (n=34)	314±135 (n=30)	306±115 (n=32)	307±97 (n=21)	339±130 (n=22)
mPAP	mmHg	48±15 (n=35)	43±11 (n=35)	40±9 (n=36)	40±10 (n=26)	18±4 (n=38)
PAWP	mmHg	8±3 (n=35)	7±4 (n=35)	9±4 (n=36)	17±7 (n=26)	8±4 (n=38)
HZV	l/min	4,0±1,0 (n=35)	4,3±0,9 (n=35)	4,6±1,3 (n=36)	4,9±1,3 (n=26)	5,1±1,4 (n=38)
CI	l/min/m ²	2,2±0,6 (n=35)	2,4±0,5 (n=35)	2,4±0,6 (n=36)	2,6±0,6 (n=26)	2,7±0,7 (n=38)
PVR	dyn* sec*cm ⁻⁵	727 [759] (n=35)	632 [494] (n=35)	457 [412] (n=36)	332 [282] (n=26)	146 [97] (n=38)

4.2.1.2 Genauere Charakterisierung der Ausschluss-Gruppe

Die Patienten des Ausschluss-Kollektivs sind zum Zeitpunkt des Katheters im Mittel 66 ± 11 Jahre alt und haben einen mittleren BMI von $27,75 \pm 7,12$. In der Echokardiographie zeigen sie eine mittlere linksventrikuläre Ejektionsfraktion von $59 \pm 17\%$, diese Untersuchung fehlt bei 15 Patienten. 13 der 38 Patienten (34,2%) weisen eine in der Echokardiographie beschriebene diastolische Compliancestörung des linken Ventrikels auf. Bei 25 Patienten (65,8%) fehlt diese Angabe oder die Untersuchung wurde nicht durchgeführt.

15 der 38 Patienten (39,5%) weisen eine kardiologische Begleiterkrankung auf, 16 Patienten (42,1%) eine pneumologische, 2 Patienten (5,3%) eine thrombembolische und 5 Patienten (13,2%) haben eine Kollagenose als Begleiterkrankung.

4.2.1.3 Plasmakonzentrationen von Activin A

Die Konzentration von Activin A zeigen im gesamten Kollektiv eine Spannweite von 238,37 pg/ml bis 6800,00 pg/ml, mit einem Mittelwert $\pm$ SD von $2733,51 \pm 1255,00$ pg/ml. Die Abweichung innerhalb der Kontrollen der verschiedenen Activin A Messungen liegt bei 13%. Die erhobenen Daten werden für valide befunden.

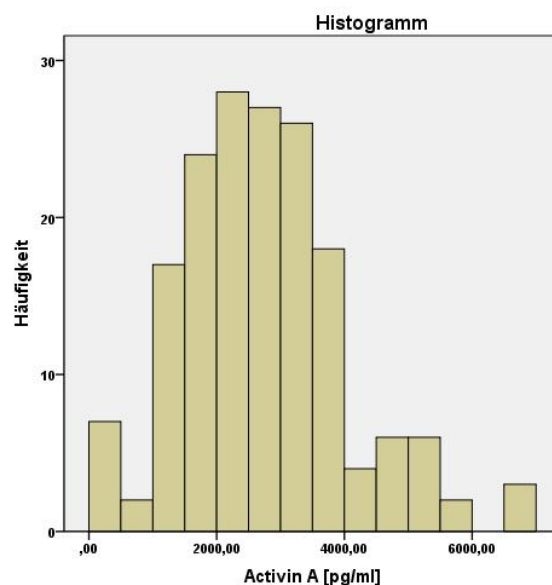


Abbildung 4.31 Activin A Konzentrationen für das Gesamtkollektiv

Bezogen auf die unterschiedlichen Ätiologien zeigt sich bei den IPAH Patienten ein Mittelwert $\pm$ SD der Activin A Konzentration von $2499,93\pm 701,08$ pg/ml, bei den CTD Patienten von $3461,05\pm 1372,07$ pg/ml, bei den CTEPH Patienten von $2457,79\pm 1149,55$ pg/ml, bei den PVH Patienten von $2978,84\pm 1182,52$ pg/ml und in der Ausschlussgruppe von $2371,89\pm 1415,28$ pg/ml.

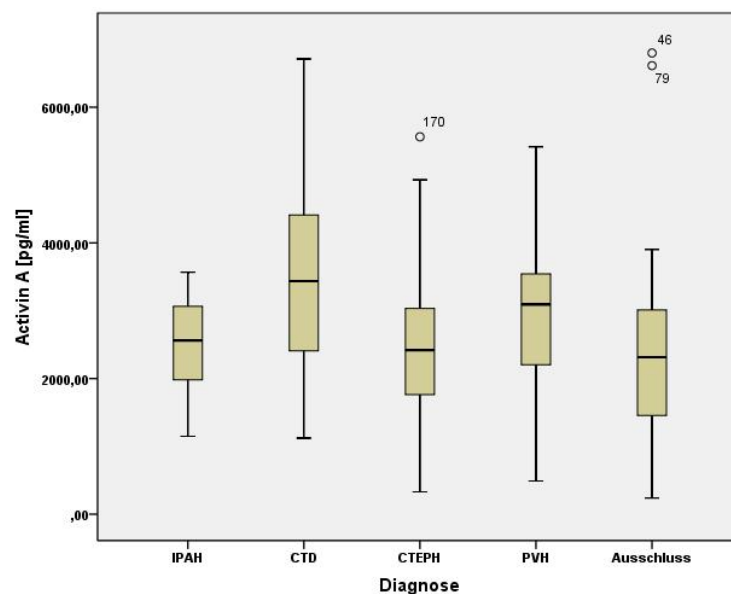


Abbildung 4.32 Boxplot Activin A Konzentrationen der einzelnen Ätiologien

Die Varianzanalyse der Activin A Konzentrationen weist einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,001$) auf.

Der anschließende Tukey HSD Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der CTD Gruppe und der IPAH-Gruppe ($p=0,009$), der CTEPH-Gruppe ($p=0,005$) und der Ausschluss-Gruppe ($p=0,001$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Plasmakonzentration von Activin A nicht als diagnostischer Biomarker zur Unterscheidung von Patienten, die an pulmonaler Hypertonie erkrankt sind und denen, die nicht erkrankten, dienen kann. Jedoch besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit CTD und dem Ausschluss-Kollektiv, was einen eventuellen diagnostischen Nutzen mit sich bringt.

Die anschließenden Analysen werden ohne die Ausschluss-Gruppe durchgeführt. Dies dient der korrekten Darstellung der Ergebnisse mit der Fokussierung auf die an pulmonaler Hypertonie erkrankten Patienten.

4.2.1.4 Korrelation mit der funktionellen Klasse

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt einen signifikanten Wert für die Plasmakonzentration von Activin A bezogen auf die funktionelle Klasse ($p=0,002$).

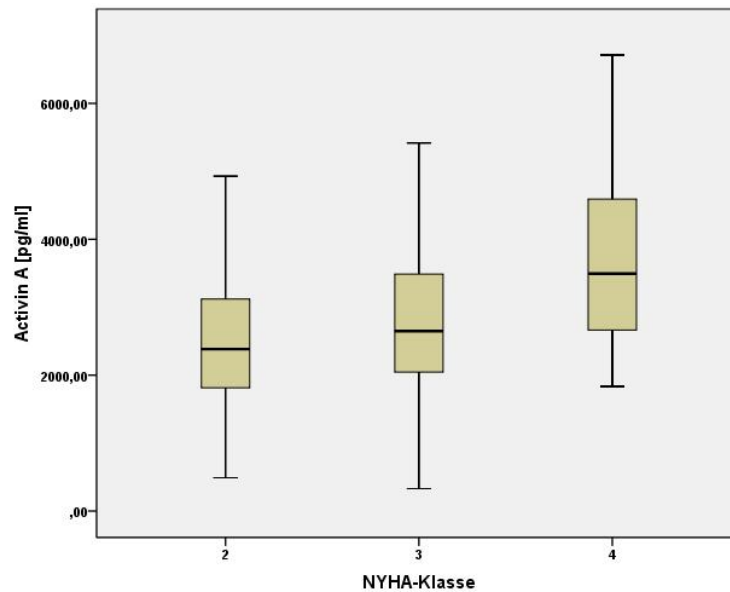


Abbildung 4.33 Boxplot Activin A Konzentrationen bezogen auf die NYHA-Klassen im Gesamtkollektiv

4.2.1.5 Korrelation mit dem Geschlecht

Es gibt keinen signifikanten Unterschied der Activin A Konzentration zwischen den Geschlechtern ($p=0,223$).

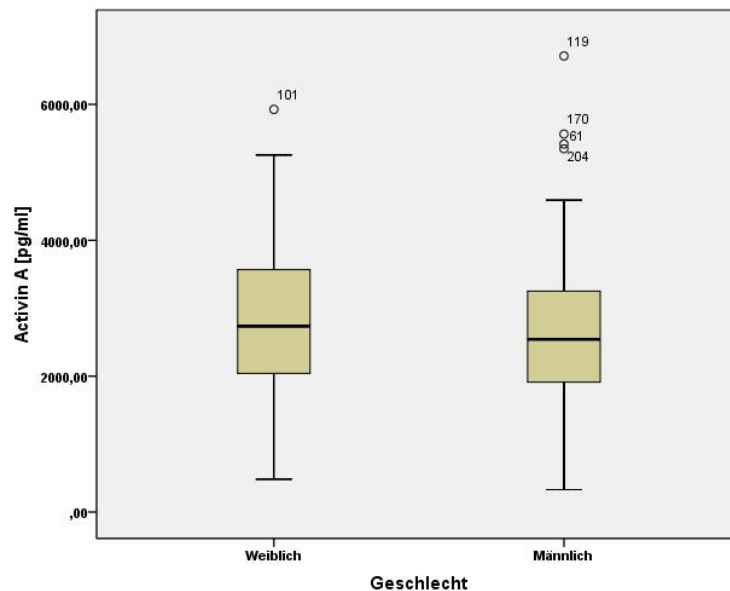


Abbildung 4.34 Boxplot Activin A Konzentrationen bezogen auf das Geschlecht

4.2.1.6 Korrelation der hämodynamischen Parameter

Die Korrelation der hämodynamischen Parameter mit der Plasmakonzentration von Activin A zeigt einen signifikanten Zusammenhang für die SMWD ($p=0,008$) bei einem Signifikanzniveau von 0,01 und einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von -0,243.

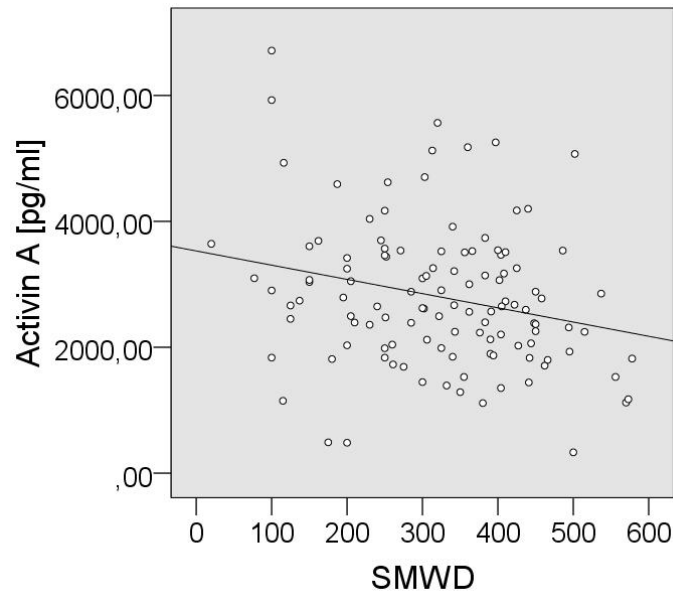


Abbildung 4.35 Korrelation der Activin A Konzentrationen mit der SMWD im Gesamtkollektiv

4.2.2 Mortalitätsanalyse

131 Patienten werden in die Analyse einbezogen. Von diesen sterben 21 Patienten (16%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 91,2%, 78,5% bzw. 72,2%.

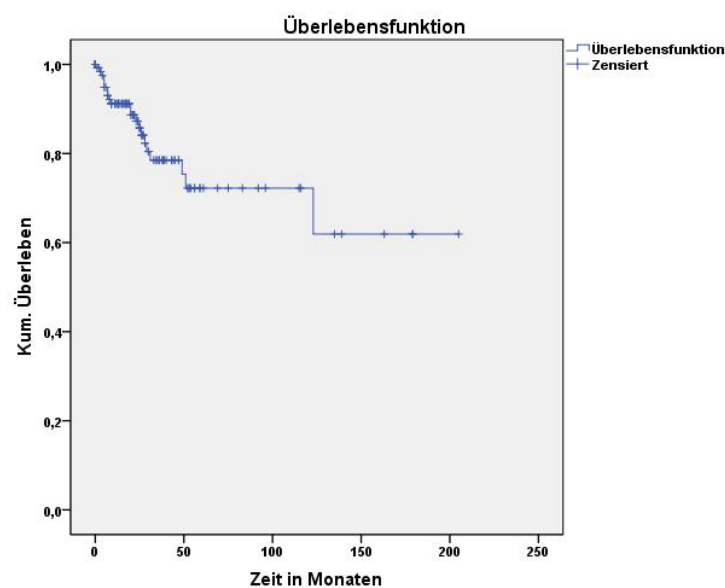


Abbildung 4.36 Kaplan-Meier Kurve für das Activin A Gesamtkollektiv

Die Konzentration werden in 4 Quartile aufgeteilt. Diese Zuteilung zu einem Quartil wird in allen weiteren Analysen verwendet. Das erste Quartil umfasst 30 Patienten, davon versterben drei im Beobachtungszeitraum (10,0%). Das erste Quartil weist ein mittleres Überleben von 151 Monaten (95% Konfidenzintervall 120-183 Monate) auf. Das zweite Quartil umfasst 28 Patienten, davon verstirbt ein Patient im Beobachtungszeitraum (3,6%). Das zweite Quartil weist ein mittleres Überleben von 129 Monaten (110-148 Monate) auf. Das dritte Quartil umfasst 33 Patienten, von denen drei im Beobachtungszeitraum (9,1%) versterben. Das dritte Quartil zeigt ein mittleres Überleben von 177 Monaten (147-207 Monate). Das vierte Quartil umfasst 40 Patienten, von diesen versterben 14 im Beobachtungszeitraum (35,0%). Das vierte Quartil weist ein mittleres Überleben von 63 Monaten (38-88 Monate) auf.

Der Log-Rang Test ist hoch signifikant ($p < 0,001$) für die Mortalität bezogen auf die Activin A Konzentration. Die anschließende Cox Regression ist ebenfalls hoch signifikant ($p = < 0,001$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,001. Das *Hazard Ratio* jeweils betrachtet gegen das vierte Quartil ist für das erste Quartil 5,35 ($p = 0,009$), für das zweite Quartil 12,66 ($p = 0,015$) und für das dritte Quartil 4,98 ($p = 0,012$).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle des Activin A als prädiktiver Biomarker für die pulmonale Hypertonie.

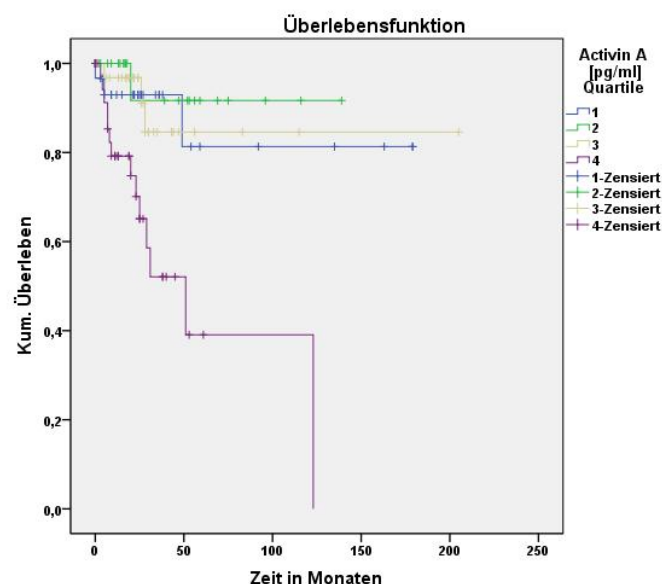


Abbildung 4.37 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das Activin A Gesamtkollektiv

4.2.3 Time to clinical Worsening

Es werden 122 Patienten in die Analyse einbezogen. Von diesen erhalten 48 Patienten (39,3%) innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie.

Die Wahrscheinlichkeit innerhalb von 1, 3 und 5 Jahren eine Kombinationstherapie zu erhalten liegt bei 23,9%, 46,5% bzw. 62,1%.

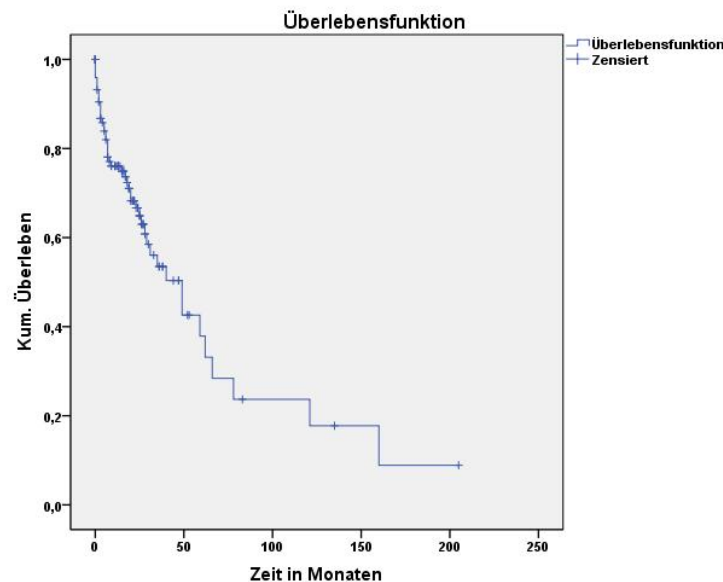


Abbildung 4.38 Kaplan-Meier Kurve für TTCW im Activin A Gesamtkollektiv

Das erste Quartil umfasst 29 Patienten, davon erhalten 11 innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (37,9%). Das erste Quartil weist eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 74 Monaten (95% Konfidenzintervall 37-111 Monate) auf. Das zweite Quartil umfasst 26 Patienten, davon erhalten 8 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (30,8%). Das zweite Quartil weist eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 48 Monaten (31-65 Monate) auf. Das dritte Quartil umfasst 30 Patienten, von diesen erhalten 10 innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (33,3%). Das dritte Quartil zeigt eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 95 Monaten (38-152 Monate). Das vierte Quartil umfasst 37 Patienten, von diesen erhalten 19 innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Kombinationstherapie (51,4%). Das vierte Quartil weist eine mittlere Zeit bis zur Erweiterung der Therapie von 37 Monaten (15-60 Monate) auf.

Der Log-Rang Test ist signifikant ($p=0,047$) für die TTCW bezogen auf die Activin A Konzentration. Die anschließende Cox Regression ist ebenso signifikant ($p=0,012$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,000.

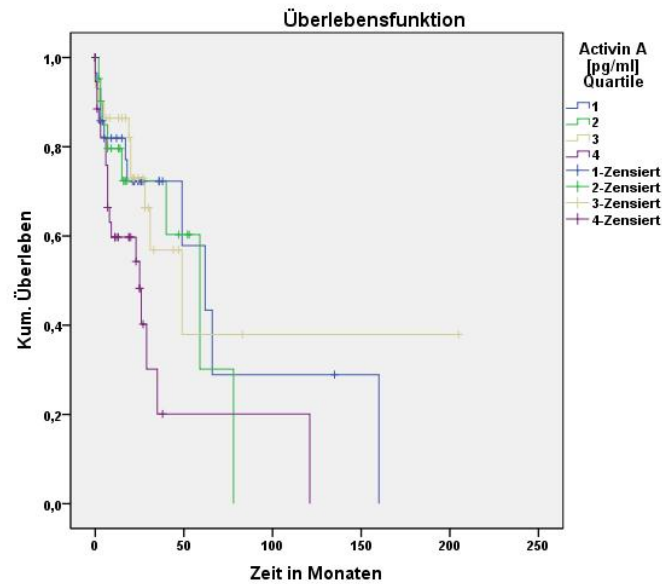


Abbildung 4.39 Kaplan-Meier Kurven für die TTCW nach Quartilen für das Activin A Gesamtkollektiv

4.2.4 Uni- und Multivariate Cox Regression der Activin A Konzentration

In der univariaten Cox Regression zeigt sich die Activin A Konzentration als hoch signifikanter Prädiktor für das Überleben ($p < 0,001$) mit einem Hazard Ratio von 1,001. Dies bedeutet, dass eine Konzentrationserhöhung um eine Einheit, im Fall von Activin A pg/ml, eine Erhöhung des relativen Risikos um 0,1% zur Folge hat. Dies erscheint zunächst gering, jedoch ergibt sich bei einer Spannweite von 238,37 pg/ml bis 6800,00 pg/ml eine Erhöhung des relativen Risikos zwischen diesen beiden Messwerten von 656,2%. In der multivariaten Analyse bestätigt sich die Rolle des Activin As als prädiktiver Biomarker.

Tabelle 4.11 Uni- und Multivariate Cox Regression für das Activin A Gesamtkollektiv

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
Activin A	1,001 (1,000 bis 1,001)	<0.001	1,001 (1,000 bis 1,001)	0,004
PVR			1,000 (0,999 bis 1,002)	0,845
Geschlecht			1,618 (0,475 bis 5,506)	0,442
SMWD			0,993 (0,987 bis 0,999)	0,029
NYHA 3			0,888 (0,142 bis 5,541)	0,898
NYHA 4			0,454 (0,094 bis 2,185)	0,325

Betrachtet man Activin A in der univariaten Cox Regression in den jeweiligen Ätiologien, so lassen sich die signifikanten Werte des gesamten Kollektivs nur im CTD-Kollektiv und IPAH-Kollektiv reproduzieren (vgl. Tab. 4.11). Dies lässt sich jedoch durch die geringe Größe und die nicht gegebene Anzahl an Todesfällen der Untergruppen erklären.

Tabelle 4.12 Vergleich der univariaten Cox Regression in den einzelnen Ätiologien

Ätiologien		
	Sig.	HR (95% CI)
IPAHA	0,024	1,002 (1,000 bis 1,003)
CTD	0,015	1,001 (1,000 bis 1,001)
CTEPH	0,564	1,000 (0,999 bis 1,001)
PVH	Nicht möglich	

4.2.5 Uni- und Multivariate Cox Regression der dichotomisierten Activin A Konzentration

Die Konzentration von Activin A wird in zwei Kollektive, jeweils größer bzw. kleiner des Median (2671,80 pg/ml), aufgeteilt. Diese Variable wird als Activin A_dicho definiert. Anschließend wird eine uni- und multivariate Cox Regression durchgeführt.

Tabelle 4.13 Uni- und Multivariate Cox Regression der dichotomisierten Activin A Konzentration mit dem Geschlecht und der SMWD

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
Activin A_dicho	4,216 (1,396 bis 12,727)	0,011	6,124 (1,242 bis 30,198)	0,026
Geschlecht			1,893 (0,629 bis 5,697)	0,256
SMWD			0,992 (0,987 bis 0,997)	0,003
CI			0,855 (0,224 bis 3,259)	0,818
PVR			1,000 (0,999 bis 1,002)	0,609

In der univariaten Cox Regression zeigt sich ein signifikanter Unterschied für das Überleben ($p=0.003$) bezogen auf eine Activin A Konzentration größer bzw. kleiner als der Median mit einem Hazard Ratio von 4,216. Daraus ergibt sich ein vierfach erhöhtes relatives Risiko für Patienten mit einer Activin A Plasmakonzentration größer als 2671,80 pg/ml. In der multivariaten Analyse zeigt sich, dass Activin A_dicho weiterhin signifikant ist, jedoch die SMWD den stärksten Prädiktor für das Überleben darstellt. In Abbildung 4.13 sind die Kaplan-Meier Kurven für die dichotomisierten Activin A Konzentrationen aufgetragen. Diese verdeutlichen den Unterschied des Überlebens abhängig davon, ob die Activin A Konzentration größer bzw. kleiner als der Median ist.

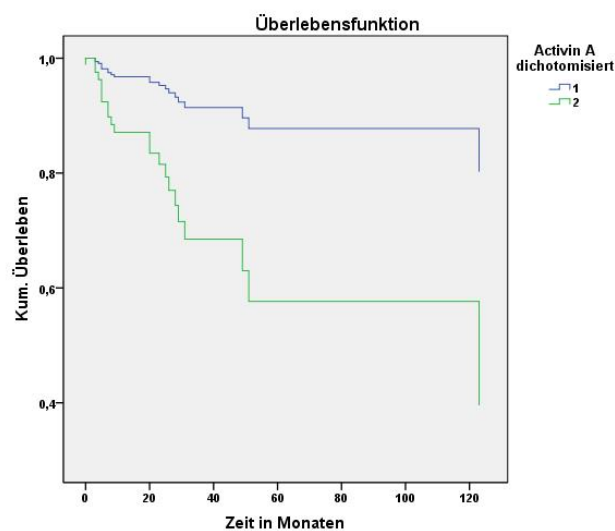


Abbildung 4.40 Kaplan-Meier Kurven für die dichotomisierten Activin A Konzentrationen

4.2.6 Subgruppenanalyse

4.2.6.1 IPAH Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des IPAH-Kollektivs sind in Tab. 4.10 aufgeführt. Die Plasmakonzentration des Activin A weist eine Spannweite von 1149,20 pg/ml bis 3567,40 pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von 2499,93 $\pm$ 710,08 pg/ml auf.

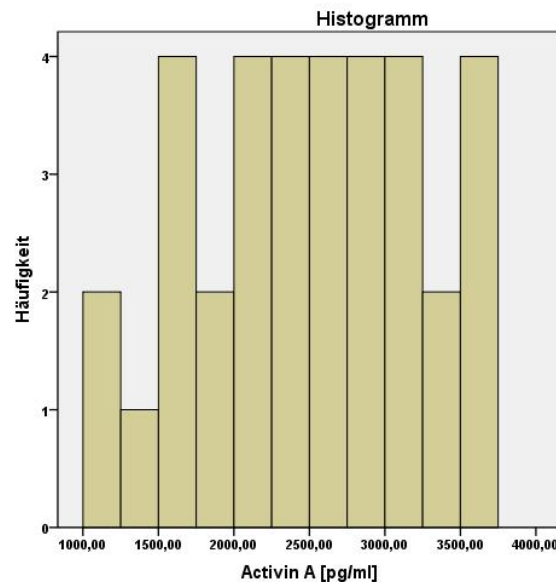


Abbildung 4.41 Activin A Konzentrationen des IPAH-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,071$). Darüber hinaus findet sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die Korrelationen der Activin A Konzentration mit den hämodynamischen Parametern, zeigen keine signifikanten Zusammenhänge.

Es werden 35 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen sterben 6 Patienten (17,1%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 97,1%, 82,1% bzw. 82,1%.

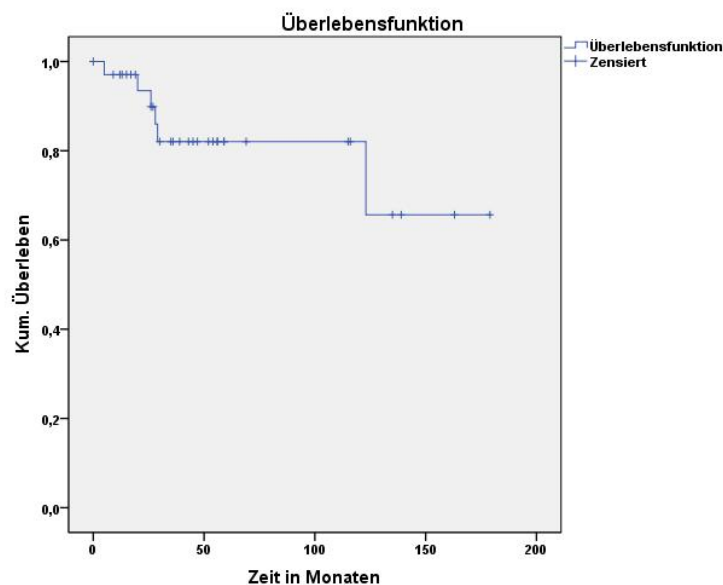


Abbildung 4.42 Kaplan-Meier Kurve für das IPAH-Kollektiv

Der Log-Rang Test ist nicht signifikant ($p=0.116$) für die Mortalität bezogen auf die Activin A Konzentration. Die anschließende Cox Regression ist signifikant ($p=0.024$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,002.

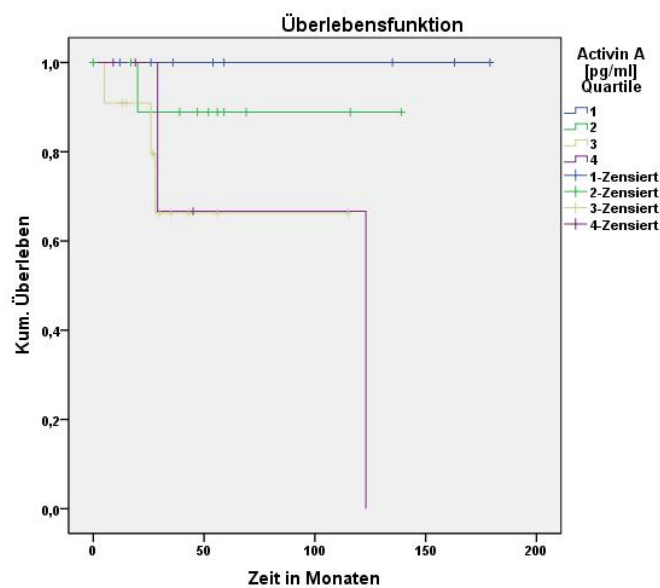


Abbildung 4.43 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das IPAH-Kollektiv

In der multivariaten Cox Regression ist die Plasmakonzentration von Activin A im IPAH-Kollektiv nach der SMWD der zweitstärkste Prädiktor für das Überleben ($p=0,038$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,004 (95% CI 1,000 bis 1,007).

4.2.6.2 CTD Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des CTD-Kollektivs sind in Tab. 4.10 aufgeführt. Die Plasmakonzentration des Activin A weist eine Spannweite von 1122,10 pg/ml bis 6712,00 pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von 3461,05 $\pm$ 1372,07 pg/ml auf.

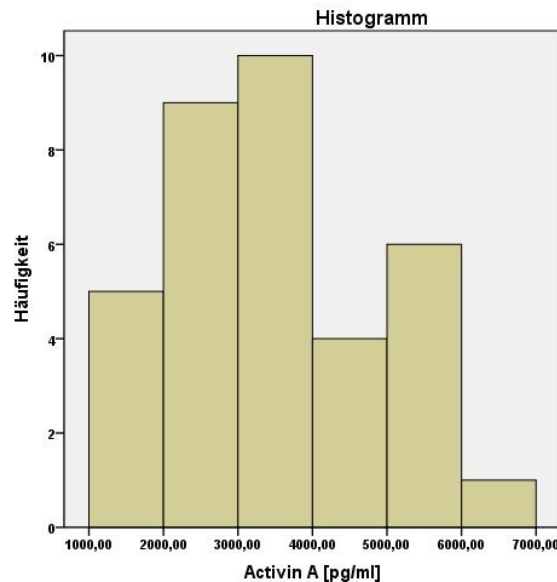


Abbildung 4.44 Activin A Konzentrationen des CTD-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,274$). Darüber hinaus findet sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die Korrelationen der Activin A Konzentration mit den hämodynamischen Parametern, zeigen für den PAWP und die SMWD signifikante Zusammenhänge bei einem Signifikanzniveau von 0,05 mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,343 ($p=0,044$) bzw. -0,403 ($p=0,027$).

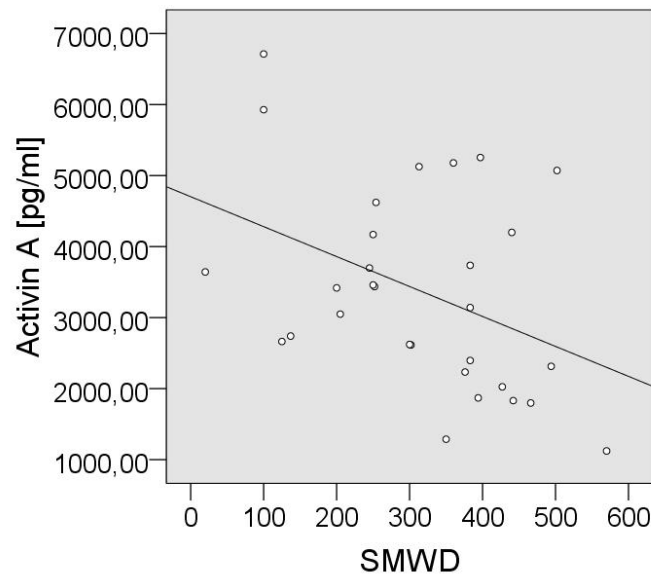


Abbildung 4.45 Korrelation der Activin A Konzentrationen mit der SMWD für das CTD-Kollektiv

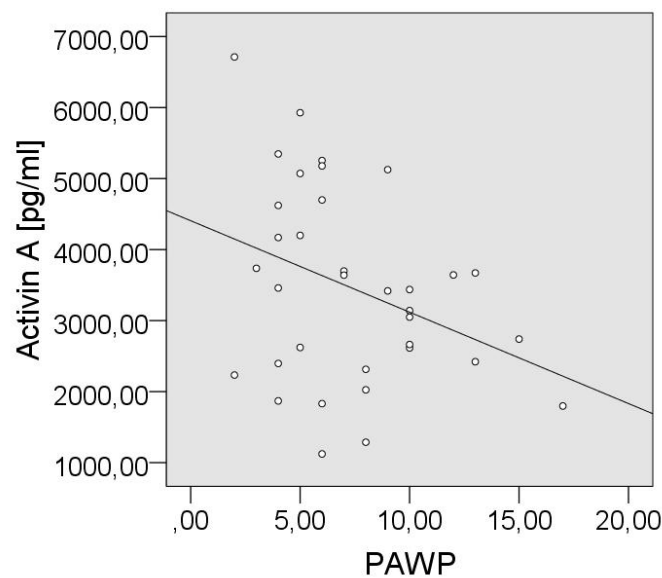


Abbildung 4.46 Korrelation der Activin A Konzentrationen mit dem PAWP für das CTD-Kollektiv

Es werden 38 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen sterben 14 Patienten (36,8%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 85,3%, 62,1% bzw. 50,8%.

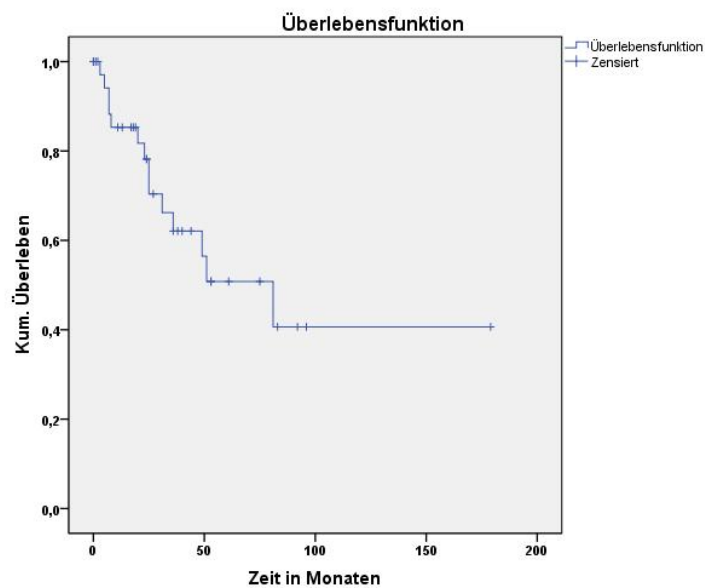


Abbildung 4.47 Kaplan-Meier Kurve für das CTD-Kollektiv

Der Log-Rang Test ist signifikant ($p=0.022$) für die Mortalität bezogen auf die Activin A Konzentration. Zudem ist der Log-Rang Test bezogen auf die TTCW signifikant ($p=0.019$). Die anschließende Cox Regression für die Mortalität ist ebenfalls signifikant ($p=0.015$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,001, sowie die Cox Regression für die TTCW ($p=0.017$) und einem *Hazard Ratio* von 1,000.

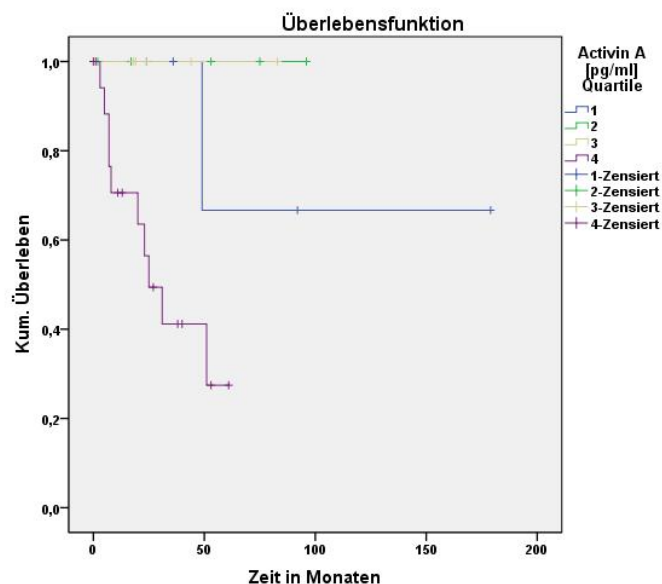


Abbildung 4.48 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTD-Kollektiv

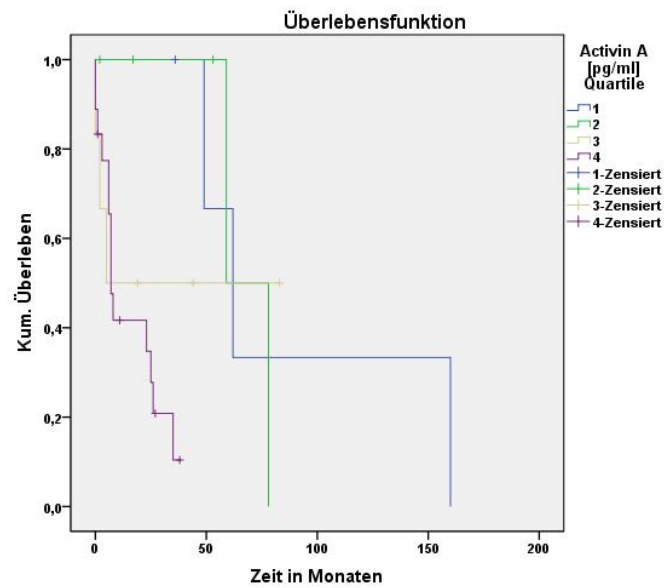


Abbildung 4.49 Kaplan-Meier Kurven für die TTCW nach Quartilen für das CTD-Kollektiv

Tabelle 4.14 Uni- und Multivariate Cox Regression für das CTD-Kollektiv

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
Activin A	1,001 (1,000 bis 1,001)	0,015	1,000 (1,000 bis 1,001)	0,022
PVR			1,002 (0,999 bis 1,004)	0,203
Geschlecht			4,357 (0,777 bis 24,444)	0,094

Tabelle 4.15 Multivariate Cox Regression für das CTD-Kollektiv zusätzlich mit SMWD

Variablen	Einzel Analyse		Multi Analyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
Activin A	1,001 (1,000 bis 1,001)	0,011	1,000 (1,000 bis 1,001)	0,519
PVR			1,001 (0,999 bis 1,003)	0,439
Geschlecht			4,228 (0,455 bis 39,282)	0,205
SMWD			0,992 (0,985 bis 1,000)	0,049

4.2.6.3 CTEPH Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des CTEPH-Kollektivs sind in Tab. 4.10 aufgeführt. Die Plasmakonzentration des Activin A weist eine Spannweite von 330,45pg/ml bis 5564,30 pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von 2457,79 $\pm$ 1149,55 pg/ml auf.

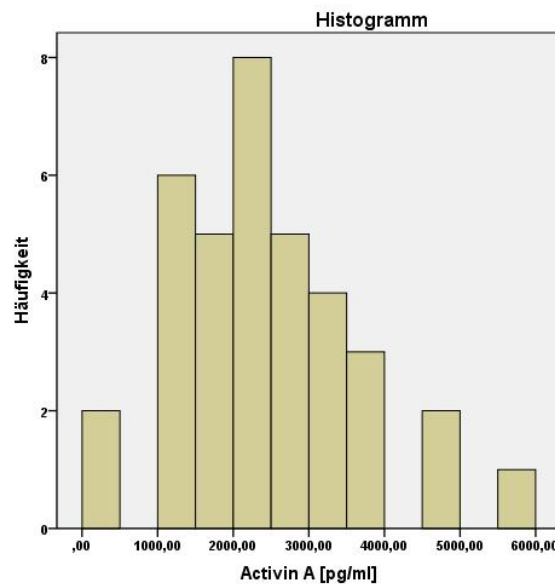


Abbildung 4.50 Activin A Konzentrationen des CTEPH-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,085$). Darüber hinaus findet sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die Korrelationen der Activin A Konzentration mit den hämodynamischen Parametern, zeigen keine signifikanten Zusammenhänge.

Es werden 39 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen sterben 5 Patienten (5,4%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 88,0%, 73,4% bzw. 73,4%.

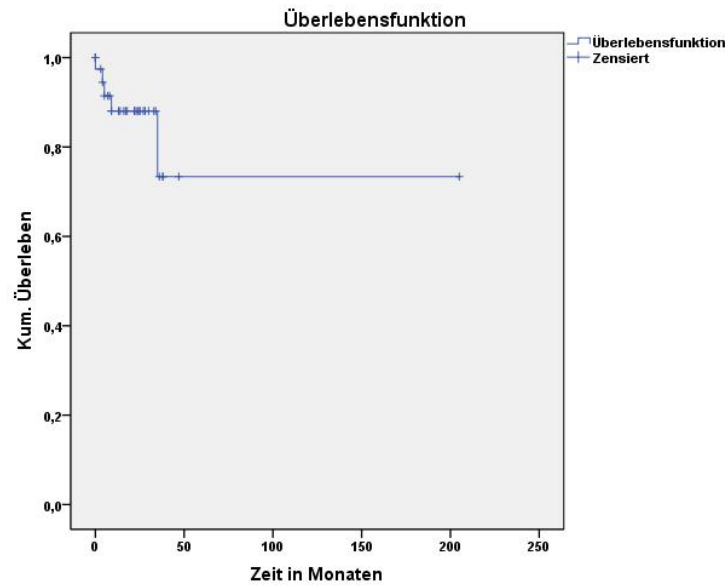


Abbildung 4.51 Kaplan-Meier Kurve für das CTEPH-Kollektiv

Der Log-Rang Test ist nicht signifikant ($p=0,283$) für die Mortalität bezogen auf die Activin A Konzentration. Die anschließende Cox Regression für die Mortalität ist ebenfalls nicht signifikant ($p=0,564$) mit einem *Hazard Ratio* von 1,001.

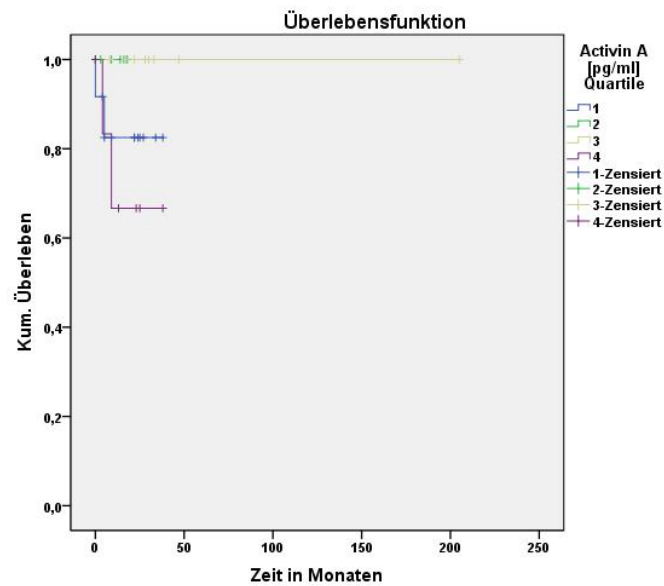


Abbildung 4.52 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTEPH-Kollektiv

4.2.6.4 PVH Kollektiv

Die hämodynamischen Charakteristika des PVH-Kollektivs sind in Tab. 4.10 aufgeführt. Die Plasmakonzentration des Activin A weist eine Spannweite von 489,73pg/ml bis 5416,60pg/ml und einen Mittelwert $\pm$ SD von 2978,84 $\pm$ 1182,52 pg/ml auf.

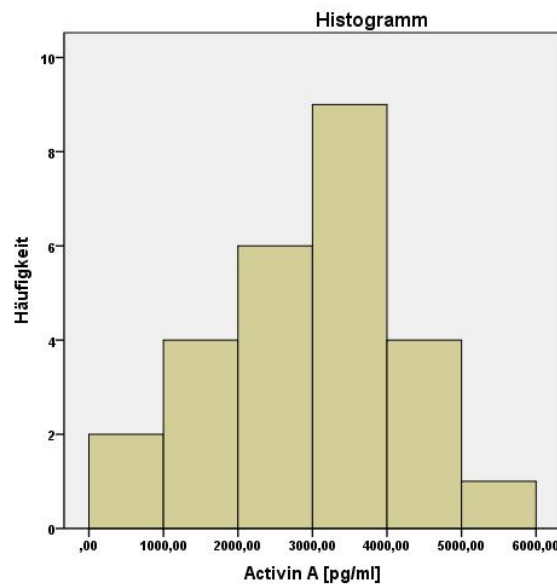


Abbildung 4.53 Activin A Konzentrationen des PVH-Kollektivs

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen funktionellen Gruppen ($p=0,760$). Darüber hinaus findet sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern. Die Korrelationen der Activin A Konzentration mit den hämodynamischen Parametern, zeigt keine signifikanten Zusammenhänge.

Es werden 26 Patienten in die Mortalitätsanalyse einbezogen. Von diesen verstirbt kein Patient (0%) innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Daher kann das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben und die Cox Regression nicht ermittelt werden.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob es sich bei Growth Differentiation Factor-15 oder bei Activin A um einen diagnostischen, besser prognostischen oder einen Biomarker zur Beurteilung des Schweregrades für die pulmonale Hypertonie handelt.

5.1 Erhöhte GDF-15 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Die in der Literatur beschriebenen erhöhten Plasmakonzentrationen von GDF-15 bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Nickel et al. 2008 haben erhöhte Plasmakonzentrationen von GDF-15 in einer Kohorte von 76 IPAH Patienten beschrieben [72]. Diese Kohorte hatte eine mediane Konzentration von 1481 pg/ml mit einem Interquartilsabstand (IQR) von 1960 pg/ml. Das Kollektiv der an pulmonaler Hypertonie erkrankten Patienten unserer Studie umfasst 143 Patienten und weist eine mediane Konzentration von 1615,70 pg/ml mit einem IQR von 1818,90 pg/ml auf. Das IPAH Kollektiv unserer Studie umfasst 38 Patienten und hat eine mediane Konzentration von 996,03 pg/ml mit einem IQR von 1265,89 pg/ml. Nickel et al. 2008 nutzen zur Bestimmung der GDF-15 Plasmakonzentrationen einen immunoradiometrischen Assay, im Gegensatz dazu wurden die GDF-15 Plasmakonzentrationen in dieser Arbeit mit Hilfe eines *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay* bestimmt. Darüber hinaus wird aus der Studie von Nickel et al. 2008 nicht ersichtlich, ob die Blutproben aus peripheren Gefäßen oder aus der Pulmonalarterie entnommen wurden, was eine Vergleichbarkeit der gemessenen Konzentrationen einschränkt [72]. Meadows et al. 2011 verglichen die GDF-15 Plasmakonzentration von 30 Patienten mit pulmonaler Hypertonie assoziiert mit einer systemischen Sklerose und von 24 Patienten mit systemischer Sklerose ohne pulmonale Hypertonie und von 44 IPAH Patienten und 13 Gesunden. Die Patienten mit pulmonaler Hypertonie assoziiert mit systemischer Sklerose wiesen eine mittlere GDF-15 Plasmakonzentration von $422,3 \pm 369,5$ pg/ml auf, die IPAH Patienten wiesen eine mittlere GDF-15 Plasmakonzentration von $173,0 \pm 193,0$ pg/ml auf. Zusätzlich konnten Meadows et al. 2011 zeigen, dass eine GDF-15 Plasmakonzentration > 125 pg/ml mit einem verschlechterten Überleben einhergeht [75]. Das CTD Kollektiv dieser Arbeit umfasst 38 Patienten und weist eine mittlere GDF-15 Konzentration von $2781,81 \pm 2504,05$ pg/ml auf, welche im Vergleich zu den von Meadows et al. gemessenen Werten deutlich höher liegt. Die Messung der Plasmakonzentrationen erfolgte in der Studie von Meadows et al. 2011 analog zu unserer Studie mit Hilfe eines *Enzyme-Linked-*

Immunosorbent Assay, jedoch wurden die Blutproben aus peripheren Venen gewonnen, was ein Grund für die großen Unterschiede der gemessenen Konzentrationen darstellen könnte.

Betrachtet man weitere kardiovaskuläre Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer pulmonalen Hypertonie oder der zugrundeliegenden Pathophysiologie stehen, konnte gezeigt werden, dass die Plasmakonzentration von GDF-15 in einem Kollektiv von Patienten über 70 Jahren mit kardiovaskulären Risikofaktoren, wie dem männlichen Geschlecht, Nikotinabusus, Diabetes, erhöhten Triglyceriden, niedrigem HDL-Cholesterin und einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate signifikant korreliert [94]. Rhodes et al. 2013 haben, in einer dem Alter und Geschlecht angepassten Ausschlussgruppe, eine mittlere GDF-15 Plasmakonzentration von 315 ± 131 pg/ml nachgewiesen [73]. Im Vergleich dazu zeigte das Ausschlusskollektiv dieser Studie eine mittlere GDF-15 Plasmakonzentration von $2122,48 \pm 2023,26$ pg/ml. Diese Konzentration liegt auch über der von Nickel et al. definierten Obergrenze von 1200 ng/l für ältere Erwachsene [72]. Die Patienten des GDF-15 Ausschluss-Kollektivs sind in 62,0% der Fälle weiblich und haben einen mittleren BMI von 27,43. Die Mehrheit der Patienten weist eine wegweisende kardiologische Vorerkrankung auf. Zudem ist bei 38,1% der Patienten eine, in der Echokardiographie beschriebene, diastolische Compliancestörung nachgewiesen. Dies verdeutlicht nochmals, dass es sich nicht um gesunde Patienten, sondern um Patienten mit dem begründeten Verdacht einer pulmonalen Hypertonie handelt. Diese wurden aufgrund der von Ihnen dargebotenen Beschwerden im Rechtsherzkatheter untersucht und eine pulmonale Hypertonie wurde ausgeschlossen. Es handelt sich somit um ein sehr gutes Ausschluss Kollektiv zur Evaluation eines diagnostischen Biomarkers, da es die Trennung zwischen Patienten mit und ohne pulmonale Hypertonie bei der gleichen unspezifischen Symptomatik möglich macht.

Zusammenfassend konnten die in der Literatur beschriebenen erhöhten GDF-15 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit IPAH und CTD bestätigt werden. Auch wenn sich deutliche Abweichungen in den gemessenen Dimensionen der Konzentrationen zeigten. Die von uns erhobenen Daten konnten erstmals erhöhte GDF-15 Plasmakonzentrationen in einem großen Kollektiv von Patienten mit pulmonaler Hypertonie unterschiedlicher Ätiologien nachweisen. Ferner konnten erstmalig erhöhte GDF-15 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit CTEPH und PVH beschrieben werden.

5.2 Bedeutung von GDF-15 zur Beurteilung des Schweregrads der pulmonalen Hypertonie

Die Korrelationen der Plasmakonzentrationen von GDF-15 mit den hämodynamischen Parametern zeigen einen signifikanten negativen Zusammenhang mit der SMWD. In der Subgruppenanalyse zeigen sich signifikante Korrelationen im CTD-Kollektiv zwischen der GDF-15 Konzentration und dem PAWP. Im CTEPH-Kollektiv zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen der GDF-15 Konzentration und der SMWD.

Diese Ergebnisse sind zwar statistisch signifikant, jedoch aufgrund des zu geringen Korrelationskoeffizienten klinisch nicht relevant [95]. Sie zeigen dennoch einen möglichen negativen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Biomarkers und der als guter Prädiktor für das Überleben etablierten SMWD [32]. Die in der Literatur beschriebenen signifikanten Korrelationen der GDF-15 Plasmakonzentration mit hämodynamischen Parametern wie dem mPAP, dem CI, der SMWD, dem PAWP konnten somit nur begrenzt bestätigt werden [72, 73]. Durch die fehlenden klinisch relevanten Korrelationen von GDF-15 mit den hämodynamischen Parametern ist eine pathologische Rolle, welche nicht direkt im Zusammenhang mit einer Erhöhung des pulmonal vaskulären Drucks und der damit verbundenen Belastung des rechten Ventrikels, zu vermuten.

5.3 Bedeutung von GDF-15 als diagnostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie

Die Ergebnisse dieser Arbeit können Growth Differentiation Factor-15 nicht als einen diagnostischen Biomarker für die pulmonale Hypertonie bestätigen. Die Varianzanalyse zeigt bei der GDF-15 Konzentration zwar einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Erkrankten und der Ausschluss-Gruppe. Der post-hoc-Test weist einen signifikanten Unterschied zwischen der CTD-Gruppe und der IPAH Gruppe auf. Somit wäre zwar eine Unterscheidung zwischen Patienten mit IPAH und CTD denkbar, diese ist jedoch klinisch nicht relevant.

5.4 Bedeutung von GDF-15 als prognostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie

Nickel et al. 2008 beschrieben in einer Kohorte von 76 Patienten mit IPAH zum Zeitpunkt des diagnostischen Rechtsherzkatheters die Serumkonzentration von GDF-15 als unabhängigen Prädiktor für das *Outcome* [72]. In unserer Studie konnte die Rolle von GDF-15 als prognostischer Biomarker für die pulmonale Hypertonie bestätigt werden. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Quartilen

der logarithmierten Plasmakonzentration von GDF-15 bezogen auf das Überleben. Die anschließend durchgeführte Cox Regression ist ebenfalls signifikant mit einem *Hazard Ratio* von 2,009. Dies entspricht aufgrund der logarithmischen Skalierung einer Verdopplung des relativen Risikos bei einer ca. Verdreifachung der GDF-15 Konzentration. Das *Hazard Ratio*, jeweils betrachtet gegen das vierte Quartil, ist für das erste Quartil 4,61 und für das zweite sogar 10,53. Was in Bezug auf GDF-15 Plasmakonzentrationen im zweiten Quartil im Vergleich zum vierten Quartil, einer mehr als zehnfachen Erhöhung des relativen Risikos zu Versterben entspricht. Diese Ergebnisse verdeutlichen die enorme prognostische Bedeutung der GDF-15 Plasmakonzentration. Insbesondere zeigen diese Ergebnisse den drastischen Einfluss einer hohen GDF-15 Konzentration auf das relative Risiko zu Versterben. Nickel et al. 2008 definierten eine Konzentration > 1200 ng/l, respektive > 1200 pg/ml als oberes Limit und konnten zeigen, dass eine Konzentration über diesem Limit mit einem erhöhten Risiko zu Versterben oder transplantiert zu werden einhergeht. Durch die nicht gegebene Normalverteilung der GDF-15 Plasmakonzentration in unserer Studie und die dadurch zwingende Logarithmierung zur Anpassung an die Normalverteilung, ergeben sich leider dimensionslose Werte für die Konzentrationen, die eine einfache Vergleichbarkeit mit konkreten wie dem von Nickel et al. 2008 definierten oberen Grenzwert einschränkt. Dennoch zeigen die Ergebnisse der uni- und multivariaten Cox Regression nochmals die starke Rolle von GDF-15 als prognostischen Biomarker. Die logarithmierte Konzentration von GDF-15 ist nach der *Six Minute Walk Distance* (SMWD) der zweitstärkste Prädiktor für das Überleben. Die multivariate Cox Regression der dichotomisierten und logarithmierten GDF-15 Konzentration zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bezogen auf das Überleben für eine GDF-15 Konzentration größer bzw. kleiner des Medians (7,29) mit einem *Hazard Ratio* von 4,191. Dies entspricht einem vierfach erhöhten relativen Risiko zu versterben für Patienten mit einer logarithmierten GDF-15 Plasmakonzentration größer als 7,29.

Betrachtet man weitere kardiovaskuläre Erkrankungen, konnte in der Literatur GDF-15 als prognostischer Biomarker für ein akutes Koronarsyndrom mit und ohne ST-Streckenhebung nachgewiesen werden, dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezogen auf die Mortalität der Patienten mit einer Plasmakonzentration >1800 ng/l [71, 96]. Ebenfalls zeigt sich eine erhöhte GDF-15 Plasmakonzentration bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz verglichen mit einer Kontrollgruppe, dabei wurden 1200 ng/l als Obergrenze für gesunde ältere Patienten definiert [97]. Gesondert konnte

gezeigt werden, dass die GDF-15 Plasmakonzentration ein unabhängiger Prädiktor für das *Outcome* bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist und dabei mit dem Alter, der funktionellen Klasse und der NT-proBNP Konzentration korreliert [98]. Ferner diene die Plasmakonzentration von GDF-15 zur Risikostratifizierung von Blutungen und des Überlebens bei Patienten mit Vorhofflimmern unter Antikoagulation [99]. Außerdem kann GDF-15 als unabhängiger Biomarker für die Risikoabschätzung bei einer akuten Lungenembolie genutzt werden [100]. Diese Erkenntnisse heben die mögliche Bedeutung von GDF-15 bei der Adaptation an eine rechtsventrikuläre Belastung hervor und unterstreichen die Bedeutung von GDF-15 als prognostischen Biomarker für Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Rhodes et al. 2013 haben in einem Kollektiv von 139 IPAH Patienten gezeigt, dass die Plasmakonzentration von GDF-15 in Kombination mit mehreren etablierten Biomarkern, wie der Erythrozytenverteilungsbreite und der NT-proBNP Konzentration genutzt werden kann, um prognostische Aussagen über den Krankheitsverlauf bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie zu treffen [73, 101]. Unsere Ergebnisse verdeutlichen erneut das Potential von GDF-15 als prognostischer Biomarker und zeigen, dass in Zukunft multiple Marker in Kombination genutzt werden sollten, um präzise Aussagen über die Prognose von Patienten mit pulmonaler Hypertonie treffen zu können.

5.5 Erhöhte Activin A Plasmakonzentrationen bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Yndestad et al. 2009 haben erhöhte Activin A Konzentrationen in einer Kohorte von 15 IPAH-, 18 PAH- und 14 CTEPH-Patienten nachgewiesen [90]. Diese Kohorte wies eine mediane Activin A Konzentration von 738 pg/ml in der Pulmonalarterie auf. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu einer dem Geschlecht und Alter angepassten Kontrollgruppe mit 14 Patienten. In unserer Studie konnten die erhöhten Plasmakonzentrationen von Activin A in der Pulmonalarterie von Patienten, die an pulmonaler Hypertonie unterschiedlicher Ätiologie erkrankt sind, bestätigt werden. Das Kollektiv umfasste 132 Patienten und wies eine mediane Activin A Konzentration von 2671,80 pg/ml (IQR 1523,70 pg/ml) auf. Es zeigte sich kein Unterschied zu der in unserer Studie verwendeten Kontrollgruppe. Allerdings handelt es sich bei dem in dieser Studie verwendeten Ausschluss-Kollektiv um Patienten mit dem klinischen Verdacht einer pulmonalen Hypertonie. Bei diesen wurde während einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung eine pulmonale Hypertonie ausgeschlossen. Es

handelt sich demzufolge nicht um gesunde Patienten. Darüber hinaus sind die Patienten des Ausschluss-Kollektivs nicht dem Alter oder Geschlecht der erkrankten Patienten angepasst. Die Konzentrationen wurden von Yndestad et al. 2009 ebenfalls mit Hilfe eines *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay* aus der Pulmonalarterie bestimmt. Leider sind in der Studie keine konkreten Konzentrationen mit Standardabweichung der jeweiligen Gruppen veröffentlicht, was eine Vergleichbarkeit mit den von uns ermittelten Daten erschwert. Die von uns erhobenen Konzentrationen liegen deutlich über den von Yndestad et al., jedoch ist das in unserer Studie verwendete Patientenkollektiv deutlich größer und heterogener. Es sind weitere Studien nötig um die von uns gemessenen Werte zu untersuchen und gegebenenfalls zu bestätigen. Zusammenfassend konnten in unserer Studie die erhöhten Konzentrationen von Activin A bestätigt werden und erstmalig erhöhte Activin A Konzentrationen bei Patienten mit CTD und PVH beschrieben werden.

5.6 Bedeutung von Activin A zur Beurteilung des Schweregrads der pulmonalen Hypertonie

Die Korrelationen der Plasmakonzentrationen von Activin A mit den hämodynamischen Parametern zeigen einen signifikanten negativen Zusammenhang mit der SMWD. Zusätzlich ist im CTD-Kollektiv die Korrelation zwischen der Activin A Konzentration und der SMWD und dem PAWP signifikant. Diese Ergebnisse sind zwar statistisch signifikant, jedoch aufgrund des zu geringen Korrelationskoeffizienten klinisch nicht relevant [95]. Sie zeigen dennoch einen möglichen negativen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Biomarkers und der als guter Prädiktor für das Überleben etablierten SMWD [32]. Yndestad et al. 2009 konnten lediglich signifikante Korrelationen der Activin A Konzentration mit der maximalen Sauerstoffaufnahme und der arteriellen Sauerstoffsättigung nachweisen. Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Activin A Konzentration und dem CI, dem RAP, der PVR oder der NT-proBNP Konzentration [90]. Die fehlenden klinisch relevanten Korrelationen von Activin A mit den hämodynamischen Parametern lassen analog zu GDF-15 eine pathologische Rolle, welche nicht direkt im Zusammenhang mit einer Erhöhung des pulmonal vaskulären Drucks und der damit verbundenen Belastung des rechten Ventrikels, vermuten.

5.7 Bedeutung von Activin A als diagnostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie

Die Ergebnisse dieser Arbeit können Activin A nicht als einen diagnostischen Biomarker für die pulmonale Hypertonie bestätigen. Die Varianzanalyse für die Activin A Konzentration zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Erkrankten und der Ausschluss-Gruppe. Es zeigt sich aber im post-hoc-Test ein signifikanter Unterschied zwischen der CTD-Gruppe und anderen Gruppen (IPAH; CTEPH; Ausschluss). Der fehlende signifikante Unterschied zwischen der CTD-Gruppe und der PVH-Gruppe kann durch das nachträgliche Ausscheiden von 14 Patienten des PVH-Kollektivs bedingt sein. Diese wiesen eine latente PVH auf und entsprachen somit nicht dem Einschlusskriterium eines mPAP < 25 mmHg. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich bei Activin A zwar um keinen diagnostischen Biomarker für die pulmonale Hypertonie handelt, es jedoch als ein potentieller diagnostischer Biomarker für Patienten mit pulmonaler Hypertonie aufgrund einer Kollagenose eine große Rolle spielen könnte. Die Blockade von Activin A durch Follistatin oder die Blockade des Signalweges weist zudem ein therapeutisches Potential auf.

5.8 Bedeutung von Activin A als prognostischer Biomarker für pulmonale Hypertonie

Yndestad et al. 2009 zeigten einen signifikanten Zusammenhang der Mortalität bezüglich einer Activin A Konzentration größer als 738 pg/ml in der Pulmonalarterie [90]. Jedoch betonen die Autoren, dass die o.g. Studie nicht zum Nachweis der prognostischen Bedeutung von Activin A ausgelegt war.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals die Rolle von Activin A als prognostischer Biomarker für die pulmonale Hypertonie beschrieben werden. Es zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Quartilen der Plasmakonzentration von Activin A bezogen auf das Überleben. Dabei zeigt sich besonders für das vierte Quartil im Vergleich zu allen anderen Quartilen ein signifikanter Unterschied. Dies bekräftigt nochmals die Rolle einer hohen Activin A Plasmakonzentration als Prädiktor für das Überleben. Die durchgeführte Cox Regression ist ebenfalls hoch signifikant mit einem *Hazard Ratio* von 1,001. Dies bedeutet, dass eine Konzentrationserhöhung um eine Einheit, im Fall von Activin A pg/ml, eine Erhöhung des relativen Risikos um 0,1% zur Folge hat. Dabei ergibt sich bei einer Spannweite der Activin A Plasmakonzentration von 238,37 pg/ml bis 6800,00 pg/ml eine Erhöhung des relativen Risikos zwischen diesen beiden Messwerten von 656,2%. In Bezug auf die klinische

Arbeit, ergibt sich daraus beispielsweise bei einem Anstieg der Activin A Konzentration um 100 pg/ml, eine Erhöhung des relativen Risikos um 10%. In der Subgruppenanalyse ist Activin A im IPAH-Kollektiv und im CTD-Kollektiv ein unabhängiger Prädiktor für das Überleben. Zusätzlich ist die Plasmakonzentration im CTD-Kollektiv in der multivariaten Cox Regression ein stärkerer Prädiktor für das Überleben als das Geschlecht und die *Pulmonary vascular resistance* (PVR).

Die univariate Cox Regression der dichotomisierten Activin A Konzentration zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, bezogen auf das Überleben für eine Activin A Konzentration größer bzw. kleiner des Medians (2671,80 pg/ml) mit einem *Hazard Ratio* von 4,216. Dies entspricht einer vierfachen Erhöhung des relativen Risikos zu Versterben für Patienten mit einer Activin A Plasmakonzentration größer als 2671,80 pg/ml und verdeutlicht nochmals die prognostische Bedeutung von Activin A. In der multivariaten Cox Regression der dichotomisierten Activin A Konzentration zeigt sich, dass die dichotomisierte Activin A Konzentration signifikant nach der SMWD den zweitstärksten Prädiktor für das Überleben mit einem *Hazard Ratio* von 5,467 darstellt. Diese Analysen verdeutlichen die wegweisende Bedeutung einer hohen Activin A Konzentration für das *Outcome* der Patienten.

In Bezug auf weitere kardiovaskuläre Erkrankungen konnten erhöhte Activin A Plasmakonzentrationen bei Patienten mit stabiler bzw. instabiler Angina Pectoris nachgewiesen werden, dabei wird Activin A eine anti-inflammatorische Rolle zugesprochen [102]. Jedoch konnten weitere Studien sowohl eine inflammatorische als auch eine anti-inflammatorische Wirkung von Activin A nachweisen [103-106]. Ofstad et al. 2013 haben gezeigt, dass die Plasmakonzentration von Activin A bei Patienten mit Typ 2 Diabetes prognostische Informationen über das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen liefert. Dabei war die logarithmierte Activin A Konzentration ein unabhängiger signifikanter Prädiktor für das Überleben bzw. das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen [107]. Harada et al. 1996 haben erhöhte, von den Bindungsproteinen gelöste, Activin A Konzentrationen bei Patienten mit chronischem Nierenversagen nachgewiesen [108]. Phillips et al. 2000 haben eine signifikant erhöhte Activin A Ausschüttung im Vergleich zu einem Placebo nach Heparin-gabe, bei Patienten, die sich einer Koronarangiographie unterzogen haben, belegt [109]. Da in unserer Studie allen Patienten prophylaktisch 5000 IE Heparin vor der Rechtsherzkatheteruntersuchung und folglich vor der Blutentnahme appliziert wurden,

ist eine Beeinflussung der Activin A Plasmakonzentrationen durch das Heparin nicht auszuschließen. Der Mechanismus der Freisetzung beruht dabei zum einen auf dem Austausch der oberflächlichen Proteoglykane, an denen Activin A gebunden ist und zum anderen auf der Auflösung der Activin A-Follistatin-Komplexe durch Heparin [110, 111]. Jedoch konnten Borawski et al. 2003 zeigen, dass die Activin A Konzentration vor der Dialyse unter unfractioniertem Heparin in umgekehrten Zusammenhang mit der Activin A Konzentration nach der Dialyse steht [112]. Diese Erkenntnisse verdeutlichen zwar den Einfluss des Heparins auf die Plasmakonzentration von Activin A, jedoch ist in Bezug auf unsere Studie, aufgrund der von Borawski et al. 2003 nachgewiesenen antiproportionalen Korrelation, nicht von einer pauschalen Verzerrung der Ergebnisse durch die prophylaktische Heparin-gabe auszugehen.

Zusammenfassend konnte in unserer Studie erstmalig die herausragende prognostische Bedeutung der Activin A Konzentration für das Überleben von Patienten mit pulmonaler Hypertonie beschrieben werden. Dabei ist die Activin A Konzentration in der multivariaten Cox Regression signifikant der stärkste Prädiktor für das Überleben. Im klinischen Alltag könnte die Activin A Plasmakonzentration genutzt werden, um Patienten mit einem stark erhöhten relativen Risiko zu identifizieren, um anschließenden die Therapie zu verändern bzw. zu erweitern. Um Aussagen über den Einfluss der Therapie auf die Konzentration des Biomarkers treffen zu können, sind weitere Studien mit einer Langzeitbeobachtung der Patienten notwendig.

5.9 Limitation der Studie

Durch das zuvor eingehend charakterisierte Ausschluss-Kollektiv wird die Vergleichbarkeit dieser Studie mit Studien die eine gesunde Ausschluss-Gruppe benutzen limitiert. Da es sich bei diesen Patienten nicht um gesunde Patienten handelt, kann der Unterschied zwischen den Gruppen abgeschwächt und somit die Aussagekraft des diagnostischen Nutzens eines Biomarkers verfälscht werden. Jedoch wird dadurch nur der diagnostische Nutzen zur Unterscheidung von gesunden Patienten und Patienten mit pulmonaler Hypertonie eingeschränkt. Die diagnostische Wertigkeit zur Unterscheidung von Patienten mit und ohne pulmonaler Hypertonie, die dieselben unspezifischen Symptome präsentieren, wird durch das in unserer Studie verwendete Ausschluss-Kollektiv nicht beeinträchtigt. Und vor allem diese Unterscheidung ist von starker klinischer Relevanz. Darüber hinaus wurden alle Blutproben während einer Rechtsherzkatheter- Untersuchung aus der Pulmonalarterie gewonnen, was den

Einschluss eines gesunden Kollektivs nahezu unmöglich macht. Für zukünftige Studien sollten zusätzlich zu den zentralen Blutproben, periphere Blutproben gewonnen werden, um eine Vergleichbarkeit mit einem Kollektiv von gesunden Patienten zu ermöglichen. Außerdem sollte eine Blutentnahme vor der Heparin-gabe erwogen werden, um mögliche Einflüsse zu vermindern. Eine zusätzliche Limitation dieser Studie besteht in dem nachträglichen Ausschluss von 14 PVH Patienten, da diese eine latente PVH aufwiesen und somit den Einschlusskriterien eines $mPAP < 25$ mmHg nicht entsprachen. Diese Verminderung der Stichprobengröße könnte die Aussagekraft des diagnostischen Nutzens zusätzlich beeinflusst haben.

Selimovic et al. 2009 konnten in einer Studie mit 44 PAH Patienten und 20 Kontrollpatienten zeigen, dass die Konzentration von *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF)- β 1 und Interleukin-6 in der Pulmonalarterie signifikant höher waren, als in der A. radialis [113]. Jedoch gab es keinen Unterschied der Konzentrationen in der gesunden Kontrollgruppe. Dies stellt die Möglichkeit eines Vergleichs von Konzentrationsmessungen von TGF- β in der Pulmonalarterie bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie und Konzentrationen gemessen in der A. radialis bei gesunden Patienten in Ausblick.

In zukünftigen Studien sollten GDF-15 und Activin A zusätzlich zu späteren Zeitpunkten der Erkrankung gemessen werden, um bessere Aussagen zum Verlauf, Überleben und Einfluss der Therapie auf den Biomarker treffen zu können. Parallel sollten etablierte Biomarker wie NT-proBNP und weitere experimentelle Biomarker bestimmt werden, um eine Analyse der Kombination der unterschiedlichen Marker zu ermöglichen. Zusätzlich wäre eine Bestimmung von Bindungsproteinen wie Follistatin zu erwägen, um weitere Zusammenhänge aufzudecken und mögliche therapeutische Ansätze zu untersuchen. Außerdem könnte Activin A als diagnostischer Biomarker für Patienten mit pulmonaler Hypertonie aufgrund einer Kollagenose zukünftig eine Rolle spielen. Dazu ist ein Vergleich der Plasmakonzentration von Activin A bei Patienten mit einer Kollagenose ohne pulmonale Hypertonie mit der Konzentration der zusätzlich an pulmonaler Hypertonie erkrankten Patienten nötig. Die erstmalig beschriebenen erhöhten Plasmakonzentrationen von GDF-15 und Activin A bei Patienten mit CTEPH und PVH bzw. CTD und PVH sollten in weiteren Studien untersucht und bestätigt

werden. Die von uns aufgezeigte prognostische Relevanz der beiden Biomarker, könnte in Zukunft in Kombination mit der Hämodynamik, weiteren klinischen Parametern und Biomarkern genutzt werden, um präzisere Aussagen über die Prognose von Patienten mit pulmonaler Hypertonie treffen zu können. Zusätzlich würde sich der therapeutische Ansatz, zum einen durch Blockade des Activin A Signalweges und zum anderen durch die direkte Activin A Blockade mittels Follistatin, im Zusammenhang mit der pulmonalen Hypertonie anbieten. Diese Ansätze müssten jedoch zukünftig genauer untersucht und bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Growth-differentiation-factor 15 und Activin A als Biomarker für die pulmonale Hypertonie

Hintergrund: Es konnten bisher keine verlässlichen diagnostischen und nur wenige prognostische primäre Laborparameter im Zusammenhang mit der pulmonalen Hypertonie identifiziert werden. Growth-differentiation-factor 15 und Activin A sind vielversprechende Proteine der Transforming Growth Factor β Familie und konnten bereits als Biomarker für andere Erkrankungen des kardiovaskulären Systems nachgewiesen werden.

Hypothese: Wir überprüften die Hypothese, ob es sich bei Growth-differentiation-factor 15 oder bei Activin A um einen diagnostischen, besser prognostischen oder einen Biomarker für die Beurteilung des Schweregrades der pulmonalen Hypertonie handelt.

Methoden: Es wurden 143 bzw. 128 Patienten mit pulmonaler Hypertonie verschiedener Ätiologien (IPAH, CTEPH, CTD und PVH) untersucht. 42 Patienten dienten als Ausschluss-Kollektiv. Allen Patienten wurde während einer Rechtsherzkatheter-Untersuchung Blut aus der Pulmonalarterie entnommen und anschließend die Konzentration im Serum mittels *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay* (ELISA) im Labor bestimmt. Danach erfolgte die Korrelation mit den Hämodynamischen Parametern, der Funktionellen Klasse, dem Geschlecht und dem Überleben.

Ergebnisse: Die Plasmakonzentration von GDF-15 und Activin A war nicht signifikant höher bei Patienten mit IPAH, CTEPH und PVH im Vergleich zum Ausschluss-Kollektiv. Activin A war signifikant höher bei Patienten mit CTD im Vergleich zum Ausschluss-Kollektiv. Es konnten signifikante Korrelationen zwischen GDF-15 und der SMWD und dem PAWP nachgewiesen werden. Activin A korrelierte signifikant mit der SMWD. Es zeigten sich für GDF-15 und Activin signifikante Unterschiede zwischen den Quartilen der Konzentration bezogen auf das Überleben. Die Konzentration von GDF-15 ist in der multivariaten Analyse nach der SMWD der zweitstärkste Prädiktor für das Überleben. Die Konzentration von Activin A ist in der multivariaten Analyse der stärkste Prädiktor für das Überleben. Die dichotomisierten Konzentrationen von GDF-15 und Activin A zeigten signifikante Unterschiede bezogen auf das Überleben.

Fazit: GDF-15 und Activin A sind keine diagnostischen Biomarker und auch keine Biomarker zur Beurteilung des Schweregrades. GDF-15 und Activin A sind prognostische Biomarker, wobei Activin A die vielversprechenderen Ergebnisse zeigte.

7 Abstract

The Role of Growth-differentiation-factor 15 and Activin A as a Biomarker in pulmonary hypertension

Background: There are no reliable diagnostic and sparse prognostic laboratory parameters linked to pulmonary hypertension. Growth-differentiation-factor 15 and Activin A are promising proteins of the transforming growth factor β family and have been identified as biomarkers in other cardiovascular diseases.

Hypothesis: We tested the hypothesis that Growth-differentiation-factor 15 or Activin A are a diagnostic, a prognostic or a severity biomarker in pulmonary hypertension.

Methods: 143 or 128 patients with pulmonary hypertension referring to different etiologies (IPAH, CTEPH, CTD and PVH) were tested. 42 patients served as a control group. Blood samples were collected during right heart catheterization in the pulmonary artery and the serum concentration was determined through an enzyme-linked-immunosorbent Assay. The concentration was correlated with hemodynamics, functional class, sex and survival.

Results: GDF-15 or Activin A plasma levels were not significantly higher in patients with IPAH, CTEPH and PVH versus controls. Activin A was significantly higher in patients with CTD versus controls. There were significant associations between GDF-15 and SMWD or PAWP. Activin A correlated significantly with SMWD. There was a significantly association between GDF-15 or Activin A quartile and survival. GDF-15 plasma levels were the second best predictor of survival in multivariate analysis. Activin A plasma levels were the best predictor of survival in multivariate analysis. Dichotomous plasma levels of GDF-15 or Activin A were significantly associated with survival.

Conclusion: Neither GDF-15 nor Activin A plasma levels are a diagnostic or severity biomarker. GDF-15 or Activin A plasma levels are prognostic biomarkers, whereat Activin A plasma levels are the more promising.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
AAD	<i>Adaptive Aerosol Delivery</i>
ACVRIB/ALK4	<i>activin receptor type IB</i>
ALK1	<i>Activin receptor-like kinase type 1</i>
ALK5	<i>activin receptor-like kinase 5</i>
ANP	Ateriales natriuretisches Peptid
Base1	Erste Basismessung
Base2	Zweite Basismessung
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BMPR2	<i>Bone morphogenetic protein receptor type 2</i>
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
CAV1	Caveolin-1
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	<i>Cardiac Index</i>
cm	Zentimeter
Co-SMAD	Co-mediator SMAD
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CREST	Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Esophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie, Teleangiektasien
CRP	C-reaktives Protein
CTD	<i>Connective tissue Desease</i> , Erkrankung des Bindegewebes, in diesem Fall PH assoziiert mit einer Kollagenose
CTEPH	Chronisch-thrombembolische pulmonale Hypertonie
CVP	<i>central venous pressure</i> (zentraler Venendruck)
DPD	Diastolische Druckdifferenz
dyn	Dyn
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

g	Gramm
GDF-15	<i>Growth-differentiation-factor 15</i>
h	Stunde
HF	Herzfrequenz Schläge/min
HIV	<i>Humane Immunodeficiency Virus</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HZV	Herzzeitvolumen
I-SMAD	Inhibitorische SMAD
i.v.	Intravenös
IE	Internationale Einheiten
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
IQR	<i>interquartile range</i> , Interquartilsabstand
KCNK3	KCNK3 Gen
kDa	Kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
m	Meter
M.	Morbus
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
mg	Milligramm
MIC-1	<i>Macrophage inhibitory cytokine-1</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix metalloproteinase
mPAP	pulmonalerterieller Mitteldruck
MUC5AC	Mucin 5AC
n	Anzahl
NAG-1	<i>nonsteroidal antiinflammatory drug-activated gene-1</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	<i>N-terminal B-type natriuretic peptide</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
O ₂	Sauerstoff
PAA	Pulmonalis Angiographie
PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxid Partialdruck
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAP	pulmoalarterieller Druck
PAWP	Pulmonal kapillärer Verschlussdruck
PCH	Pulmonal kapilläre Hämangiomatose
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pg	Pikogramm
PH	pulmonale Hypertonie
PLAB	<i>Placental bone morphogenetic protein</i>
ppm	<i>parts per million</i> , Teilchen pro million
pro BNP	<i>Pro Brain natriuretic peptide</i>
PTGFB	<i>Placental Transforming Growth Factor Beta</i>
PVH	Pulmonal venöse Hypertonie
PVOD	Pulmonale veno-okklusive Erkrankung
PVR	<i>Pulmonary vascular resistance</i> , Pulmonalvaskulärer Widerstand
QTc	Frequenzkorrigierte QT-Zeit
R-SMAD	Regulierende SMAD
RAP	rechtsatrialer Druck
RHK	Rechtsherzkatheter
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
SMAD	<i>MAD mothers against decapentaplegic</i> , SMA <i>small body size</i>

SMAD9	Smad-9 Protein
SMWD	6-Minuten Gehstrecke (<i>Six Minute Walk Distance</i>)
SSC	Systemische Sklerose
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i> ; Herzinfarkt mit signifikanter ST-Streckenhebung
TAPSE	<i>Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TI	Trikuspidalklappeninsuffizienz
TIMP	<i>Tissue inhibitory</i> MMP
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TPG	Transpulmonaler Gradient
TTCW	<i>Time to clinical worsening</i>
TTE	Transthorakale Echokardiographie
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VO ₂ max	Maximale Sauerstoffaufnahme
WU	<i>Wood Units</i> mmHg*min/L
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Schritte eines ELISA.....	14
Abbildung 4.1 GDF-15Konzentrationen des Gesamtkollektivs	22
Abbildung 4.2 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des Gesamtkollektivs	22
Abbildung 4.3 Boxplot GDF-15 Konzentrationen für die unterschiedlichen Diagnosen	23
Abbildung 4.4 Boxplot der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen der unterschiedlichen Diagnosen	23
Abbildung 4.5 Boxplot Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen für die NYHA-Klassen.....	24
Abbildung 4.6 Boxplot Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen für die Geschlechter.....	25
Abbildung 4.7 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit PAWP für das Gesamtkollektiv.....	26
Abbildung 4.8 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit SMWD für das Gesamtkollektiv	26
Abbildung 4.9 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtkollektiv.....	28
Abbildung 4.10 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das Gesamtkollektiv	29
Abbildung 4.11 Kaplan-Meier Kurve für die TTCW für das Gesamtkollektiv.....	30
Abbildung 4.12 Kaplan-Meier Kurven für die TTCW nach Quartilen für das Gesamtkollektiv	31
Abbildung 4.13 Kaplan-Meier Kurven für die dichotomisierten logarithmierten GDF15 Konzentrationen.....	34
Abbildung 4.14 GDF-15 Konzentrationen des IPAH-Kollektivs.....	35
Abbildung 4.15 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des IPAH-Kollektivs.....	35
Abbildung 4.16 Kaplan-Meier Kurve für das IPAH-Kollektiv	36
Abbildung 4.17 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das IPAH-Kollektiv.....	37
Abbildung 4.18 GDF-15 Konzentrationen des CTD-Kollektivs	37
Abbildung 4.19 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des CTD-Kollektivs	38
Abbildung 4.20 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit dem PAWP	38
Abbildung 4.21 Kaplan-Meier Kurve für das CTD-Kollektiv.....	39
Abbildung 4.22 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTD-Kollektiv	39
Abbildung 4.23 GDF-15 Konzentrationen des CTEPH-Kollektivs	40
Abbildung 4.24 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des CTEPH-Kollektivs	40
Abbildung 4.25 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentrationen mit der SMWD für das CTEPH-Kollektiv	41
Abbildung 4.26 Kaplan-Meier Kurve für das CTEPH-Kollektiv	41
Abbildung 4.27 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTEPH-Kollektiv	42
Abbildung 4.28 GDF-15 Konzentrationen des PVH-Kollektivs	42
Abbildung 4.29 Logarithmierte GDF-15 Konzentrationen des PVH-Kollektivs	43
Abbildung 4.30 Korrelation der logarithmierten GDF-15 Konzentration mit dem mPAP	43
Abbildung 4.31 Activin A Konzentrationen für das Gesamtkollektiv	47
Abbildung 4.32 Boxplot Activin A Konzentrationen der einzelnen Ätiologien	48
Abbildung 4.33 Boxplot Activin A Konzentrationen bezogen auf die NYHA-Klassen im Gesamtkollektiv	49
Abbildung 4.34 Boxplot Activin A Konzentrationen bezogen auf das Geschlecht	49
Abbildung 4.35 Korrelation der Activin A Konzentrationen mit der SMWD im Gesamtkollektiv	50

Abbildung 4.36 Kaplan-Meier Kurve für das Activin A Gesamtkollektiv	50
Abbildung 4.37 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das Activin A Gesamtkollektiv	51
Abbildung 4.38 Kaplan-Meier Kurve für TTCW im Activin A Gesamtkollektiv	52
Abbildung 4.39 Kaplan-Meier Kurven für die TTCW nach Quartilen für das Activin A Gesamtkollektiv	53
Abbildung 4.40 Kaplan-Meier Kurven für die dichotomisierten Activin A Konzentrationen	56
Abbildung 4.41 Activin A Konzentrationen des IPA-H-Kollektivs	57
Abbildung 4.42 Kaplan-Meier Kurve für das IPA-H-Kollektiv	58
Abbildung 4.43 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das IPA-H-Kollektiv	58
Abbildung 4.44 Activin A Konzentrationen des CTD-Kollektivs	59
Abbildung 4.45 Korrelation der Activin A Konzentrationen mit der SMWD für das CTD-Kollektiv	60
Abbildung 4.46 Korrelation der Activin A Konzentrationen mit dem PAWP für das CTD-Kollektiv	60
Abbildung 4.47 Kaplan-Meier Kurve für das CTD-Kollektiv	61
Abbildung 4.48 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTD-Kollektiv	61
Abbildung 4.49 Kaplan-Meier Kurven für die TTCW nach Quartilen für das CTD-Kollektiv	62
Abbildung 4.50 Activin A Konzentrationen des CTEPH-Kollektivs	63
Abbildung 4.51 Kaplan-Meier Kurve für das CTEPH-Kollektiv	64
Abbildung 4.52 Kaplan-Meier Kurven nach Quartilen für das CTEPH-Kollektiv	64
Abbildung 4.53 Activin A Konzentrationen des PVH-Kollektivs	65

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Überarbeitete Klassifikation der pulmonalen Hypertonie von 2013 modifiziert nach Simonneau et al. 2013 [21].....	3
Tabelle 3.1 Geräte und Materialien.....	12
Tabelle 4.1 Charakteristika des gesamten GDF-15-Kollektivs	20
Tabelle 4.2 Charakteristika der einzelnen Ätiologien des GDF-15-Kollektivs	20
Tabelle 4.3 Korrelation der hämodynamischen Parameter	27
Tabelle 4.4 Uni- und multivariate Cox Regression mit Geschlecht und PVR.....	32
Tabelle 4.5 Multivariate Cox Regression zusätzlich mit SMWD.....	32
Tabelle 4.6 Multivariate Cox Regression zusätzlich mit NYHA	33
Tabelle 4.7 Vergleich der univariaten Cox Regression in den einzelnen Ätiologien.....	33
Tabelle 4.8 Uni- und Multivariate Cox Regression der logarithmierten und dichotomisierten GDF-15 Konzentration mit dem Geschlecht und der SMWD	34
Tabelle 4.9 Charakteristika des gesamten Activin A Kollektivs	46
Tabelle 4.10 Charakteristika der einzelnen Ätiologien für das Activin A Kollektiv.....	46
Tabelle 4.11 Uni- und Multivariate Cox Regression für das Activin A Gesamtkollektiv	54
Tabelle 4.12 Vergleich der univariaten Cox Regression in den einzelnen Ätiologien...	54
Tabelle 4.13 Uni- und Multivariate Cox Regression der dichotomisierten Activin A Konzentration mit dem Geschlecht und der SMWD	55
Tabelle 4.14 Uni- und Multivariate Cox Regression für das CTD-Kollektiv.....	62
Tabelle 4.15 Multivariate Cox Regression für das CTD-Kollektiv zusätzlich mit SMWD	62

11 Literaturverzeichnis

1. Chesler NC, Roldan A, Vanderpool RR, Naeije R. How to measure pulmonary vascular and right ventricular function. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009;2009:177-80.
2. Champion HC, Michelakis ED, Hassoun PM. Comprehensive invasive and noninvasive approach to the right ventricle-pulmonary circulation unit: state of the art and clinical and research implications. *Circulation.* 2009;120(11):992-1007.
3. Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, et al. Diagnosis and Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology.* 2009;54(1):S55–S66.
4. Voelkel NF, Quaipe RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, et al. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation.* 2006;114(17):1883-91.
5. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(25 Suppl):D42-50.
6. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *The European respiratory journal.* 2009;34(4):888-94.
7. Kovacs G, Maier R, Aberer E, Brodmann M, Scheidl S, Troster N, et al. Borderline pulmonary arterial pressure is associated with decreased exercise capacity in scleroderma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(9):881-6.
8. Hamada K, Nagai S, Tanaka S, Handa T, Shigematsu M, Nagao T, et al. Significance of pulmonary arterial pressure and diffusion capacity of the lung as prognosticator in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2007;131(3):650-6.
9. McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(25 Suppl):D51-9.
10. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2005;52(12):3792-800.
11. Phung S, Strange G, Chung LP, Leong J, Dalton B, Roddy J, et al. Prevalence of pulmonary arterial hypertension in an Australian scleroderma population: screening allows for earlier diagnosis. *Intern Med J.* 2009;39(10):682-91.

12. Chung L, Farber HW, Benza R, Miller DP, Parsons L, Hassoun PM, et al. Unique Predictors of Mortality in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Systemic Sclerosis in the Reveal Registry. *Chest*. 2014.
13. Coghlan JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, et al. Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1340-9.
14. Legendre P, Mouthon L. [Pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases.]. *Presse Med*. 2014.
15. Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, Channick R, Darteville P, Jansa P, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D92-9.
16. Jamieson SW, Kapelanski DP. Pulmonary endarterectomy. *Current Problems in Surgery*. 2000;37(3):165-252.
17. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, 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). *Eur Heart J*. 2016;37(1):67-119.
18. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, 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(20):2493-537.
19. Fang JC, DeMarco T, Givertz MM, Borlaug BA, Lewis GD, Rame JE, et al. World Health Organization Pulmonary Hypertension group 2: pulmonary hypertension due to left heart disease in the adult--a summary statement from the Pulmonary Hypertension Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(9):913-33.
20. Vachiery JL, Adir Y, Barbera JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, et al. Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D100-8.
21. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25):D34–D41.

22. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008;117(13):1717-31.
23. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D22-33.
24. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition: Mcgraw-hill; 2008.
25. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.
26. Herold G. *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2013 ed. Köln: Herold; 2013. 988 S p.
27. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4306-13.
28. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2004;109(2):159-65.
29. Laboratories ATSCoPSfCPF. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(1):111-7.
30. Guyatt GH, Sullivan MJ, Thompson PJ, Fallen EL, Pugsley SO, Taylor DW, et al. The 6-minute walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Can Med Assoc J*. 1985;132(8):919-23.
31. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, et al. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(2 Pt 1):487-92.
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. *The European respiratory journal*. 2001;17(4):647-52.
33. Hoeper MM, Maier R, Tongers J, Niedermeyer J, Hohlfeld JM, Hamm M, et al. Determination of cardiac output by the Fick method, thermodilution, and acetylene rebreathing in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):535-41.

34. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111(23):3105-11.
35. Gruenig E, Michelakis E, Vachiery JL, Vizza CD, Meyer FJ, Doelberg M, et al. Acute hemodynamic effects of single-dose sildenafil when added to established bosentan therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: results of the COMPASS-1 study. *J Clin Pharmacol*. 2009;49(11):1343-52.
36. Jing ZC, Jiang X, Han ZY, Xu XQ, Wang Y, Wu Y, et al. Iloprost for pulmonary vasodilator testing in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2009;33(6):1354-60.
37. Opitz CF, Blindt R, Blumberg F, Borst MM, Bruch L, Leuchte HH, et al. Pulmonary hypertension: Hemodynamic evaluation. Updated Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2011. *International Journal of Cardiology*. 2011;154:S13-S9.
38. Hoeper MM, Lee SH, Voswinckel R, Palazzini M, Jais X, Marinelli A, et al. Complications of right heart catheterization procedures in patients with pulmonary hypertension in experienced centers. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(12):2546-52.
39. Sitbon O, Channick R, Chin KM, Frey A, Gaine S, Galie N, et al. Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2015;373(26):2522-33.
40. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-6.
41. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95.
42. Gombert-Maitland M, Bull TM, Saggar R, Barst RJ, Elgazayerly A, Fleming TR, et al. New trial designs and potential therapies for pulmonary artery hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D82-91.
43. McLaughlin VV, Gaine SP, Howard LS, Leuchte HH, Mathier MA, Mehta S, et al. Treatment goals of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D73-81.
44. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, et al. Plasma Brain Natriuretic Peptide as a Prognostic Indicator in Patients With Primary Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2000;102(8):865-70.
45. Fijalkowska A. Serum N-Terminal Brain Natriuretic Peptide as a Prognostic Parameter in Patients With Pulmonary Hypertension. *Chest*. 2006;129(5):1313-21.

46. Mauritz GJ, Rizopoulos D, Groepenhoff H, Tiede H, Felix J, Eilers P, 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(11):1645-50.
47. Nickel N, Golpon H, Greer M, Knudsen L, Olsson K, Westerkamp V, et al. The prognostic impact of follow-up assessments in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2012;39(3):589-96.
48. Hoeper MM, Pletz MW, Golpon H, Welte T. Prognostic value of blood gas analyses in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal*. 2007;29(5):944-50.
49. Hoeper MM, Hohlfeld JM, Fabel H. Hyperuricaemia in patients with right or left heart failure. *The European respiratory journal*. 1999;13(3):682-5.
50. Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N, 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(2):487-92.
51. Quarck R, Nawrot T, Meyns B, Delcroix M. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(14):1211-8.
52. Ago T. GDF15, a Cardioprotective TGF- Superfamily Protein. *Circulation Research*. 2006;98(3):294–7.
53. Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw*. 1996;7(3):363-74.
54. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390(6659):465-71.
55. Massagué J. How cells read TGF-β signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000(1):169–78.
56. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*. 2001;187(3):265-76.
57. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685–700.
58. Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(21):11514–9.

59. Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Sebald SM, Huynh TV, Lee SJ. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol.* 2000;20(10):3742-51.
60. Kempf T, Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, et al. The Transforming Growth Factor- Superfamily Member Growth-Differentiation Factor-15 Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury // The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation Research.* 2006;98(3):351-60.
61. Yoshioka H, Kamitani H, Watanabe T, Eling TE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1/GDF15) expression is increased by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *J Biol Chem.* 2008;283(48):33129-37.
62. Teresa A. Zimmers XJECHSAM. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock, Vol 23, No 6, pp 543-548, 2005.* 2005;23(6):543-8.
63. Kehl DW, Iqbal N, Fard A, Kipper BA, La Parra Landa Ad, Maisel AS. Biomarkers in acute myocardial injury. *Translational Research.* 2012;159(4):252-64.
64. Schlittenhardt D, Schober A, Strelau J, Bonaterra GA, Schmiedt W, Unsicker K, et al. Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. *Cell Tissue Res.* 2004;318(2):325-33.
65. Nickel N, Jonigk D, Kempf T, Bockmeyer CL, Maegel L, Rische J, et al. GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells. *Respiratory Research.* 2011;12(1):62.
66. Eggers KM, Kempf T, Lind L, Sundstrom J, Wallentin L, Wollert KC, et al. Relations of growth-differentiation factor-15 to biomarkers reflecting vascular pathologies in a population-based sample of elderly subjects. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012;72(1):45-51.
67. Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, et al. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circulation research.* 2006;98(3):342-50.
68. Judith CM, Jimmy LC, Sze CY, Moira MC-Y, Mary SI. Elevated Plasma Levels Of Growth Differentiation Factor (GDF)-15 In Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). A44 BIOMARKERS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE. American Thoracic Society International Conference Abstracts: American Thoracic Society; 2013. p. A1526-A.

69. Wu Q, Jiang D, Chu HW. Cigarette smoke induces growth differentiation factor 15 production in human lung epithelial cells: implication in mucin over-expression. *Innate Immun.* 2012;18(4):617-26.
70. Kempf T, Sinning JM, Quint A, Bickel C, Sinning C, Wild PS, et al. Growth-differentiation factor-15 for risk stratification in patients with stable and unstable coronary heart disease: results from the AtheroGene study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(3):286-92.
71. Kempf T, Bjorklund E, Olofsson S, Lindahl B, Allhoff T, Peter T, et al. Growth-differentiation factor-15 improves risk stratification in ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2007;28(23):2858-65.
72. Nickel N, Kempf T, Tapken H, Tongers J, Laenger F, Lehmann U, et al. Growth Differentiation Factor-15 in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2008;178(5):534–41.
73. Rhodes CJ, Wharton J, Howard LS, Gibbs JSR, Wilkins MR. Red cell distribution width outperforms other potential circulating biomarkers in predicting survival in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Heart.* 2011;97(13):1054–60.
74. Klok FA, Surie S, Kempf T, Eikenboom J, van Straalen JP, van Kralingen KW, et al. A simple non-invasive diagnostic algorithm for ruling out chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients after acute pulmonary embolism. *Thrombosis Research.* 2011;128(1):21–6.
75. Meadows CA. Increased Expression of Growth Differentiation Factor-15 in Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *CHEST Journal.* 2011;139(5):994.
76. Kretser DMd, O’Hehir RE, Hardy CL, Hedger MP. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2012;359(1-2):101–6.
77. Rausch ME, Barnhart KT. Serum biomarkers for detecting ectopic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2012;55(2):418-23.
78. Matsuse T, Ikegami A, Ohga E, Hosoi T, Oka T, Kida K, et al. Expression of immunoreactive activin A protein in remodeling lesions associated with interstitial pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1996;148(3):707-13.
79. Cho SH, Yao Z, Wang SW, Alban RF, Barbers RG, French SW, et al. Regulation of activin A expression in mast cells and asthma: its effect on the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Immunol.* 2003;170(8):4045-52.
80. Pangas SA, Woodruff TK. Activin Signal Transduction Pathways. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2000;11(8):309-14.

81. Chen YG, Lui HM, Lin SL, Lee JM, Ying SY. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002;227(2):75-87.
82. Phillips DJ, Jones KL, Scheerlinck J-PY, Hedger MP, de Kretser DM. Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2001;180(1-2):155-62.
83. Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood*. 2011;117(19):5092–101.
84. Loria P, Petraglia F, Concarì M, Bertolotti M, Martella P, Luisi S, et al. Influence of age and sex on serum concentrations of total dimeric activin A. *Eur J Endocrinol*. 1998;139(5):487-92.
85. Yndestad A, Ueland T, Oie E, Florholmen G, Halvorsen B, Attramadal H, et al. Elevated levels of activin A in heart failure: potential role in myocardial remodeling. *Circulation*. 2004;109(11):1379-85.
86. Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, Damås JK, Yndestad A. Inflammatory and anti - inflammatory cytokines in chronic heart failure: Potential therapeutic implications. *Annals of Medicine*. 2005;37(2):74-85.
87. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2003;108(17):2134-40.
88. Oikonomou E, Tousoulis D, Siasos G, Zaromitidou M, Papavassiliou AG, Stefanadis C. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. *Hellenic J Cardiol*. 2011;52(1):30-40.
89. de Kretser DM, Bensley JG, Pettila V, Linko R, Hedger MP, Hayward S, et al. Serum activin A and B levels predict outcome in patients with acute respiratory failure: a prospective cohort study. *Crit Care*. 2013;17(5):R263.
90. Yndestad A, Larsen K-O, Oie E, Ueland T, Smith C, Halvorsen B, et al. Elevated levels of activin A in clinical and experimental pulmonary hypertension. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(4):1356–64.
91. Pfarr N, Fischer C, Ehlken N, Becker-Grünig T, López-González V, Gorenflo M, et al. Hemodynamic and genetic analysis in children with idiopathic, heritable, and congenital heart disease associated pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Research*. 2013;14(1):3.

92. Goldsby RA. Immunology: W. H. Freeman; 2003.
93. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Clin Chem. 2005;51(12):2415-8.
94. Lind L, Wallentin L, Kempf T, Tapken H, Quint A, Lindahl B, et al. Growth-differentiation factor-15 is an independent marker of cardiovascular dysfunction and disease in the elderly: results from the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) Study. Eur Heart J. 2009;30(19):2346-53.
95. Auer BR, Rottmann H. Statistik und Ökonometrie für Wirtschaftswissenschaftler. eine anwendungsorientierte Einführung. 2. Aufl. ed. Wiesbaden: Gabler; 2011. XXIII, 722 S. p.
96. Wollert KC, Kempf T, Peter T, Olofsson S, James S, Johnston N, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. Circulation. 2007;115(8):962-71.
97. Kempf T, Horn-Wichmann R, Brabant G, Peter T, Allhoff T, Klein G, et al. Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay. Clin Chem. 2007;53(2):284-91.
98. Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. J Am Coll Cardiol. 2007;50(11):1054-60.
99. Wallentin L, Hijazi Z, Andersson U, Alexander JH, De Caterina R, Hanna M, et al. Growth differentiation factor 15, a marker of oxidative stress and inflammation, for risk assessment in patients with atrial fibrillation: insights from the Apixaban for Reduction in Stroke and Other Thromboembolic Events in Atrial Fibrillation (ARISTOTLE) trial. Circulation. 2014;130(21):1847-58.
100. Lankeit M, Kempf T, Dellas C, Cuny M, Tapken H, Peter T, et al. Growth differentiation factor-15 for prognostic assessment of patients with acute pulmonary embolism. Am J Respir Crit Care Med. 2008;177(9):1018-25.
101. Hampole CV, Mehrotra AK, Thenappan T, Gomberg-Maitland M, Shah SJ. Usefulness of red cell distribution width as a prognostic marker in pulmonary hypertension. Am J Cardiol. 2009;104(6):868-72.
102. Smith C, Yndestad A, Halvorsen B, Ueland T, Waehre T, Otterdal K, et al. Potential anti-inflammatory role of activin A in acute coronary syndromes. J Am Coll Cardiol. 2004;44(2):369-75.

103. Nusing RM, Barsig J. Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. *Br J Pharmacol*. 1999;127(4):919-26.
104. Wang M, Liu A, Garcia FU, Rhim JS, Stearns ME. Growth of HPV-18 immortalized human prostatic intraepithelial neoplasia cell lines. Influence of IL-10, follistatin, activin-A, and DHT. *Int J Oncol*. 1999;14(6):1185-95.
105. Ohguchi M, Yamato K, Ishihara Y, Koide M, Ueda N, Okahashi N, et al. Activin A regulates the production of mature interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist in human monocytic cells. *J Interferon Cytokine Res*. 1998;18(7):491-8.
106. Yu EW, Dolter KE, Shao LE, Yu J. Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. *Clin Exp Immunol*. 1998;112(1):126-32.
107. Ofstad AP, Gullestad L, Orvik E, Aakhus S, Endresen K, Ueland T, et al. Interleukin-6 and activin A are independently associated with cardiovascular events and mortality in type 2 diabetes: the prospective Asker and Baerum Cardiovascular Diabetes (ABCD) cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:126.
108. Harada K, Shintani Y, Sakamoto Y, Wakatsuki M, Shitsukawa K, Saito S. Serum immunoreactive activin A levels in normal subjects and patients with various diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(6):2125-30.
109. Phillips DJ, Jones KL, McGaw DJ, Groome NP, Smolich JJ, Parsson H, et al. Release of activin and follistatin during cardiovascular procedures is largely due to heparin administration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2411-5.
110. Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, Shimasaki S, Hayashi Y, Sugino H. A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem*. 1997;272(21):13835-42.
111. Sumitomo S, Inouye S, Liu XJ, Ling N, Shimasaki S. The heparin binding site of follistatin is involved in its interaction with activin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;208(1):1-9.
112. Borawski J, Naumnik B, Mysliwiec M. Activation of hepatocyte growth factor/activin A/follistatin system during hemodialysis: role of heparin. *Kidney Int*. 2003;64(6):2229-37.
113. Selimovic N, Bergh CH, Andersson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B. Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 2009;34(3):662-8.

12 Erklärung zur Dissertation

„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

13 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Ghofrani für die Überlassung des Dissertationsthemas und die exzellente fachliche Betreuung dieser Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. Dr. Henning Gall für die geduldige Hilfe und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ich danke Svenja Tiede für die wertvolle Hilfe zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Dem Team der Ambulanz für pulmonale Hypertonie danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Untersuchungen. Dem Team des Labors danke ich für die Hilfe bei den Versuchen und die stetige Motivation.

Den weiteren Doktoranden der Abteilung danke ich für das gute Teamwork.

Besonderer Dank gilt:

Meinen Eltern, dafür, dass Sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mir immer ein Vorbild sein werden.

Cosima und Klaus für die unermüdliche Aufmunterung und Ermutigung zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Meinen Großeltern für die liebevolle Unterstützung und das Interesse an dieser Arbeit.

Meiner Frau Anna für Ihre Liebe, Geduld und Zuversicht.