

Die Rolle CD34-positiver und KDR-positiver endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Nina-Kristin Mücke

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Die Rolle CD34-positiver und KDR-positiver endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Nina-Kristin Mücke

aus Gießen

Gießen, 2014

Aus der Abteilung für Pneumologie der
Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. W. Seeger

Gutachter: Prof. Dr. R. Voswinckel

Gutachter: Prof. Dr. T. Borggrefe

Tag der Disputation: 16.04.2015

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Überblick über das Krankheitsbild pulmonale Hypertonie | 1 |
| 1.2 | Definition | 1 |
| 1.3 | Entstehung der aktuellen Klassifikation | 1 |
| 1.4 | Genetische Prädisposition | 4 |
| 1.5 | Pathogenese | 4 |
| 1.5.1 | Histopathologische Veränderungen | 4 |
| 1.5.2 | Pathophysiologische Mechanismen | 5 |
| 1.6 | Klinische Präsentation der PH | 6 |
| 1.7 | Diagnostik der PH | 7 |
| 1.7.1 | Basisdiagnostik | 8 |
| 1.7.2 | Spezifische Diagnostik | 9 |
| 1.8 | Therapie der PH | 11 |
| 1.8.1 | Basistherapie | 11 |
| 1.8.2 | Spezifische Therapie | 12 |
| 1.9 | Prognostische Indizes | 13 |
| 1.10 | Endotheliale Progenitorzellen (EPC) bei PH | 15 |
| 1.10.1 | Kurzüberblick über EPC | 15 |
| 1.10.2 | Die Rolle der EPC bei PH | 17 |
| 1.10.3 | Therapeutischer Einsatz der EPC | 18 |
| 1.11 | Ziele dieser Arbeit | 19 |
| 2 | Material und Methoden | 21 |
| 2.1 | Material | 21 |
| 2.1.1 | Patientenproben | 21 |
| 2.1.2 | Antikörper | 22 |
| 2.1.3 | Chemikalien | 22 |
| 2.1.4 | Geräte | 23 |
| 2.1.5 | Gebrauchsmaterialien | 24 |
| 2.1.6 | Material für das Durchflusszytometer | 24 |
| 2.1.7 | Lösungen und Puffer | 25 |
| 2.1.8 | Software | 25 |
| 2.2 | Methoden | 25 |
| 2.2.1 | Isolation peripherer mononukleärer Zellen | 25 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.2 | Charakterisierung der EPC mittels durchflusszytometrischer Analyse | 27 |
| 2.2.3 | Erhebung der klinischen Daten | 32 |
| 2.2.4 | Statistische Analyse | 33 |
| 3 | Ergebnisse | 35 |
| 3.1 | Untersuchung des Gesamtkollektivs | 35 |
| 3.1.1 | Anzahl, Alter und Geschlechterverteilung | 35 |
| 3.1.2 | Medikation | 35 |
| 3.2 | Relative Anzahl der Progenitorzellen | 36 |
| 3.2.1 | Gruppenvergleich der relativen Anzahl der EPC | 36 |
| 3.2.2 | Gruppenvergleich der relativen Anzahl der CD34 ⁺ -Zellen | 39 |
| 3.3 | Korrelation relative Anzahl der EPC und zurückgelegte Gehstrecke im 6MWT | 41 |
| 3.4 | Korrelation relative Anzahl der EPC und BNP-Spiegel | 43 |
| 3.5 | Korrelation relative Anzahl der EPC und hämodynamische Parameter | 45 |
| 3.5.1 | Korrelation relative Anzahl der EPC und mPAP | 46 |
| 3.5.2 | Korrelation relative Anzahl der EPC und CI | 48 |
| 3.5.3 | Korrelation relative Anzahl der EPC und PVRI | 50 |
| 3.6 | Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung klinischer Parameter | 52 |
| 3.6.1 | Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT | 53 |
| 3.6.2 | Korrelation relative Anzahl der EPC und absolute Veränderung des BNP-Spiegels | 55 |
| 3.6.3 | Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung des mPAP | 58 |
| 3.6.4 | Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung des CI | 61 |
| 3.6.5 | Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung des PVRI | 64 |
| 3.7 | <i>Time to Clinical Worsening</i> | 66 |
| 3.8 | Einfluss der Therapie auf die Anzahl an EPC | 68 |
| 4 | Diskussion | 70 |
| 4.1 | Zirkulierende EPC und ihre Zellmarker | 70 |
| 4.2 | Anzahl der EPC bei Patienten mit PH | 71 |
| 4.3 | EPC als Marker für die Schweregradeinteilung der PH | 74 |
| 4.4 | Prognostische Aussagefähigkeit der EPC bei PH | 76 |
| 4.5 | Einfluss von Medikamenten auf die Anzahl der EPC bei PH | 78 |
| 4.6 | Methodenkritik | 79 |
| 4.6.1 | Auswahl der Patienten | 79 |

| | | |
|----------|-------------------------------------|-----------|
| 4.6.2 | Einschränkungen dieser Arbeit | 80 |
| 4.7 | Ausblick | 81 |
| 5 | Zusammenfassung | 83 |
| 6 | Summary | 85 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 87 |
| 8 | Anhang | i |
| 8.1 | Abbildungsverzeichnis | i |
| 8.2 | Tabellenverzeichnis | iii |
| 8.3 | Abkürzungen..... | v |
| 8.4 | Erklärung zur Dissertation..... | ix |
| 8.5 | Danksagung..... | x |

1 Einleitung

1.1 Überblick über das Krankheitsbild pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine Lungengefäßerkrankung, die mit einem erhöhten Druck und Widerstand in den Gefäßen des kleinen Kreislaufs einhergeht und im Verlauf zu einer chronischen Rechtsherzbelastung (Cor pulmonale) mit konsekutivem Rechtsherzversagen führen kann (Rosenkranz 2006). Die Rechtsherzinsuffizienz stellt die häufigste Todesursache der PH dar (Humbert und McLaughlin 2009).

Bei der PH handelt es sich um eine seltene Erkrankung für die limitierte vergleichende epidemiologische Daten über die Prävalenz und Inzidenz der verschiedenen Formen der PH vorliegen (Galiè et al. 2009). So finden sich beispielsweise für die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), die Gruppe 1 der PH, Prävalenzen, die von 15 Fällen/eine Millionen Menschen in Frankreich (2003) bis 52 Fälle/eine Millionen Menschen in Schottland (2002) reichen (Humbert et al. 2006), (Peacock et al. 2007).

1.2 Definition

Die PH ist als Erhöhung des invasiv durch eine Rechtsherzkatheter (RHK)-Untersuchung gemessenen pulmonalarteriellen Mitteldrucks (mPAP) $\geq 25\text{mmHg}$ in Ruhe definiert. Da körperliche Belastung auch bei Gesunden, vor allem bei älteren Menschen, zu Druckanstiegen des mPAP über 30mmHg führen kann, wird der früher in die Definition der PH einfließende Wert eines mPAP $\geq 30\text{mmHg}$ bei körperlicher Belastung aktuell nicht mehr berücksichtigt (Galiè et al. 2009). Ein normaler mPAP beträgt in Ruhe $14 \pm 3\text{mmHg}$, der obere Grenzwert liegt bei 20mmHg (Kovacs et al. 2009).

1.3 Entstehung der aktuellen Klassifikation

1951 wurde erstmalig von *Dresdale et al.* ein erhöhter pulmonalarterieller Druck ohne nachweisliche Ursache als „primäre pulmonale Hypertonie“ (PPH) beschrieben (Dresdale et al. 1951). 1973 wurde im Rahmen einer von der *World Health Organisation* (WHO) unterstützten internationalen Experten-Konferenz zur PH eine erste Klassifikation festgelegt, die zwischen PPH und sekundärer PH, basierend auf

dem (Nicht-)Vorhandensein einer Ursache für die Erkrankung, unterschied. Auf der folgenden Weltkonferenz zur PH in Evian, Frankreich (1998), wurde diese Einteilung modifiziert und in Venedig, Italien (2003), aufgrund neuer Erkenntnisse über die Ursachen der PH und neuer Therapieansätze durch eine Klassifikation nach ätiologischen Gesichtspunkten ersetzt (Simonneau et al. 2009), (Rosenkranz 2006). 2008 wurden auf dem vierten Weltsymposium zur PH in Dana Point, Kalifornien (USA), nur kleine Veränderungen, vor allem die Gruppe 1 betreffend, vorgenommen (Simonneau et al. 2009). Das fünfte Weltsymposium für PH fand 2013 in Nizza statt, die daraus hervorgehenden Änderungen sind noch nicht publiziert.

Die aktuell gültige Klassifikation der PH beinhaltet fünf Gruppen: (1) Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), (2) PH infolge Linksherzerkrankung, (3) PH infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie, (4) Chronisch thromboembolische PH (CTEPH), (5) PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus. Die genannten Gruppen werden wiederum in Untergruppen unterteilt. Zur Gruppe 1 wird, als eine der Modifikationen von Dana Point, die Untergruppe 1' – Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH) – gezählt.

Die Tabelle 1.1 zeigt die aktuell gültige Klassifikation der PH.

Tabelle 1.1: Aktualisierte klinische Klassifikation der PH (nach Dana Point, 2008)

| |
|--|
| <p>1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)</p> <ul style="list-style-type: none">1.1. Idiopathische PAH1.2. Hereditäre PAH<ul style="list-style-type: none">1.2.1. BMPR2-Mutationen1.2.2. ALK-1, Endoglin-Mutationen (mit und ohne hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie)1.3. Durch Medikamente oder Toxine verursacht1.4. Assoziiert mit:<ul style="list-style-type: none">1.4.1. Bindegewebserkrankungen1.4.2. HIV-Infektion1.4.3. Portaler Hypertension1.4.4. Angeborenen Herzfehlern1.4.5. Schistosomiasis1.4.6. Chronisch hämolytischer Anämie1.5. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen |
| <p>1' Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose (PCH)</p> |
| <p>2. Pulmonale Hypertonie infolge Linksherzerkrankung</p> <ul style="list-style-type: none">2.1. Systolische Dysfunktion2.2. Diastolische Dysfunktion2.3. Valvuläre Erkrankungen |
| <p>3. Pulmonale Hypertonie infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie</p> <ul style="list-style-type: none">3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen3.2. Interstitielle Lungenkrankheiten3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktiv/obstruktivem Muster3.4. Schlafbezogene Atemstörungen3.5. Alveoläre Hypoventilationssyndrome3.6. Chronischer Aufenthalt in großer Höhe3.7. Fehlentwicklungen |
| <p>4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)</p> |
| <p>5. Pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus</p> <ul style="list-style-type: none">5.1. Hämatologische Erkrankungen: myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie5.2. Systemische Erkrankungen, Sarkoidose, pulmonale Langerhans-Zell-Histiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitiden5.3. Metabolische Störungen: Glykogenspeicherkrankheiten, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen5.4. Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen mit Hämodialyse |

BMPR2: Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2, ALK-1: Activin Receptor-Like Kinase 1 Gene (aus Hoyer et al. 2010)

Sowohl für das diagnostische Procedere als auch für die Therapieabstimmung ist die Kenntnis der Klassifikation hilfreich und von großer Relevanz.

1.4 Genetische Prädisposition

Im Jahr 2000 konnten verschiedene Mutationen im *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2* (BMPR2)-Gen nachgewiesen werden, die für die Entstehung einer hereditären PH (HPAH) verantwortlich sein können (Lane et al. 2000), (Deng et al. 2000). Aktuell geht man davon aus, dass 70% der Fälle einer HPAH und schätzungsweise 20% der Fälle einer idiopathischen PAH (IPAH) durch Mutationen im BMPR2-Gen ausgelöst werden. *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), die Liganden für diesen Rezeptor, gehören zur *Transforming Growth Factor* (TGF)- β -Familie, die eine große Rolle bei der Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose verschiedener Zelltypen spielen. Auch Mutationen der TGF- β -Rezeptoren ALK-1 und Endoglin, Verursacher einer hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (M. Rendu-Osler-Weber), können möglicherweise die Entwicklung einer PAH triggern (Machado et al. 2009).

1.5 Pathogenese

1.5.1 Histopathologische Veränderungen

Die PAH ist gekennzeichnet durch funktionelle und strukturelle Veränderungen der pulmonalen Blutgefäße (Morrell et al. 2009). In den Untergruppen der PAH treten ähnliche histopathologische Gefäßveränderungen auf, sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Lokalisation in verschiedenen Abschnitten des pulmonalen Gefäßbettes. Die pulmonalen Venen bleiben bei der PAH typischerweise unbeeinflusst (Pietra et al. 2004), (Galiè et al. 2009).

Man geht davon aus, dass aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen der Proliferations- und Apoptoserate der verschiedenen gefäßwandbildenden Zellen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten), die typischen Merkmale der PAH entstehen: Proliferation und Fibrosierung der Tunica intima, Hypertrophie und Hyperplasie der Tunica media und Verdickung der Adventitia mit entzündlichen perivaskulären Infiltraten (Pietra et al. 2004), (Galiè et al. 2009). Weiterhin zeigt die Tunica media eine Muskularisierung in nicht-muskularisierten intra-azinösen Arterien und eine Vermehrung der extrazellulären Matrix und der elastischen Fasern in

muskularisierten Arterien (Pietra et al. 2004). Diese pathologischen Prozesse in den verschiedenen Gefäßwandabschnitten werden in ihrer Gesamtheit als *Gefäßremodeling* bezeichnet und führen zu einer Obstruktion der Gefäße mit konsekutiv erhöhtem Gefäßwiderstand (Jeffery und Morrell 2002).

Ein weiteres Kennzeichen der PAH sind aus einer unregulierten Angiogenese resultierende plexiforme Läsionen, die auf besondere Schwere und schnelle Progression der PH hinweisen können. Es handelt sich dabei um komplexe vaskuläre Strukturen, hauptsächlich bestehend aus Endothelzellen und in geringeren Anteilen glatter Muskelzellen und Fibrozyten. Die Endothelzellen weisen mehrere phänotypische Veränderungen auf, die sie von normalen pulmonalen Endothelzellen unterscheiden. Die Herkunft dieser veränderten Endothelzellen konnte bisher nicht geklärt werden, möglicherweise sind allerdings Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an der Entstehung der plexiformen Läsionen beteiligt (Cool et al. 1999), (Tuder et al. 2009), (Pietra et al. 2004).

Für die CTEPH sind stenosierende, an der Tunica media haftende, organisierte Thromben, die zu einer Verdrängung der Intimaschicht führen, kennzeichnend. In nicht thrombosierten Gefäßarealen können zusätzlich die für eine PAH-typischen histopathologischen Veränderungen inklusive plexiformer Läsionen auftreten (Galiè et al. 2009).

1.5.2 Pathophysiologische Mechanismen

Vasokonstriktion, *Remodeling* der Gefäße, entzündliche Prozesse und Thrombosen tragen maßgeblich zur Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes bei (Galiè et al. 2009).

Die pulmonale Vasokonstriktion, die wahrscheinlich schon zu Beginn des Entstehungsprozesses der PH eine entscheidende Rolle spielt, beruht auf einer Fehlregulation von spannungsabhängigen Kalium-Kanälen der glatten Muskelzellen und einer hypoxie-bedingten endothelialen Dysfunktion. Diese ist auch für ein vermindertes antithrombotisches Potential, eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und eine erhöhte Permeabilität der Endothelzellen verantwortlich (Stenmark und Mecham 1997), (Humbert et al. 2004), (Hassoun et al. 2009).

Die auf der endothelialen Dysfunktion basierende pulmonale Vasokonstriktion wird durch eine verminderte Synthese von Vasodilatoren und antiproliferativen Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) und eine Überexpression von wachstumsfördernden Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 (ET-1) und Thromboxan A₂ der Endothelzellen verursacht (Morrell et al. 2009). Bei NO handelt es sich um einen der potentesten endogenen Vasodilatoren (Voswinckel et al. 2009). Es wird mithilfe der endothelialen NO-Synthase (eNOS) exprimiert und erhöht durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase die Spiegel des vasodilatatorisch wirkenden Botenstoffs zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) (Löffler und Petrides 2003). Giaid et al. konnten nachweisen, dass bei Patienten mit PH die Expression des Enzyms eNOS im Endothel der Pulmonalarterien vermindert ist (Giaid und Saleh 1995). PGI₂, ein weiterer wichtiger endogener Vasodilatator, der über einen zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-vermittelten Signalweg zu einer Vasodilatation führt, besitzt zusätzlich thrombozytenaggregationshemmende und antiproliferative Eigenschaften. Die Synthese von PGI₂ ist bei Patienten mit PAH vermindert (Humbert et al. 2004). ET-1 erhöht den pulmonalen Gefäßtonus über zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: Endothelin-Rezeptor Typ A und Typ B (ET_A, ET_B). Beide Rezeptortypen konnten auf den glatten Muskelzellen der pulmonalen Gefäße nachgewiesen werden, ET_B vor allem in kleineren pulmonalen Arterien (Jeffery und Morrell 2002), (Galiè et al. 2009). ET_B wird zusätzlich von Endothelzellen präsentiert und vermittelt darüber eine Verminderung des Gefäßtonus durch Freisetzung von Substanzen wie NO oder PGI₂ (Ghofrani et al. 2009). Erhöhte Serumkonzentrationen von ET-1 und Hinweise auf eine vermehrte lokale Synthese von ET-1 der pulmonalen Endothelzellen von Patienten mit PH konnten aufgezeigt werden (Stewart et al. 1991) in (Giaid et al. 1993).

Diese Substanzen stellen wichtige Angriffspunkte für die Therapie der PAH dar (siehe Kapitel 1.8.2).

1.6 Klinische Präsentation der PH

Die klinischen Symptome beruhen auf einem gestörten Sauerstofftransport und einer verminderten kardialen Leistung (McGoon et al. 2004). Neben dem Leitsymptom Belastungsdyspnoe weisen Patienten mit PH Beschwerden wie Müdigkeit und Leistungsminderung auf. Da diese Symptome sehr unspezifisch sind, werden sie häufig falsch interpretiert und können die Diagnosestellung erschweren und hinauszögern (Runo und Loyd 2003), (Leschke et al. 2009). Weiterhin können

pectanginöse Beschwerden, Schwächeanfälle, (Prä-)Synkopen und Zunahme des Bauchumfangs bestehen. Ein fortgeschrittenes Stadium ist häufig durch Ruhedyspnoe charakterisiert. Durch eine manifeste Rechtsherzinsuffizienz kann es u.a. zu peripheren Ödemen, Aszites, Hepatomegalie oder einer Jugularvenenstauung kommen (Galiè et al. 2009).

Basierend auf den oben beschriebenen Symptomen existiert eine funktionelle WHO-Klassifikation (WHO-FC), deren Schweregrad-Einteilung weitestgehend der *New York Heart Association* (NYHA)-Klassifikation der Herzinsuffizienz entspricht (siehe Tabelle 1.2) (Leschke et al. 2009). Sie dient als ein prognostisch signifikanter Parameter. So korrelieren die funktionellen NYHA-Stadien III und IV, sowohl bei den therapierten als auch bei den unbehandelten Patienten mit einer IPAH, mit einer erhöhten Mortalität (McLaughlin et al. 2004).

Tabelle 1.2: Funktionelle NYHA-Stadien der PH

| Stadium | Beschreibung |
|---------|--|
| I | Patienten mit PH ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen. |
| II | Patienten mit PH mit einer geringen Einschränkung der üblichen körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit. |
| III | Patienten mit PH und deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Bereits leichtere als normale Belastungen führen zu Dyspnoe oder Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen. |
| IV | Patienten mit PH und Ruhebeschwerden, damit Unfähigkeit, irgendwelche körperlichen Belastungen ohne Beschwerden auszuführen. Zeichen der manifesten Rechtsherzinsuffizienz. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt. |

(modifiziert nach Leschke et al. 2009, Galiè et al. 2009)

1.7 Diagnostik der PH

Um die PH in einem frühen Stadium diagnostizieren zu können und dadurch das *Outcome* durch einen rechtzeitigen spezifischen Therapiebeginn zu verbessern, sind gezielte diagnostische Maßnahmen notwendig.

1.7.1 Basisdiagnostik

Zur Basisdiagnostik der PH werden ein Elektrokardiogramm (EKG), eine Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen, eine Lungenfunktionsanalyse und eine Laboruntersuchung gerechnet (Leschke et al. 2009).

Das **EKG** weist bei einer manifesten Form der PH in 83% pathologische Charakteristika auf, die vor allem durch eine Rechtsherzhypertrophie bedingt sind (Olschewski et al. 2006).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lassen sich durch eine **Röntgenthoraxuntersuchung** bei Patienten mit einer IPAH in 90% der Fälle pathologische Befunde feststellen, die jedoch keine Aussage über den Schweregrad der PH zulassen. Durch Beurteilung des Lungenparenchyms kann die Röntgenaufnahme Hinweise auf eine Lungenerkrankung als Ursache für die PH geben (Galiè et al. 2009).

Um eine zugrunde liegende parenchymatöse Lungen- oder Atemwegserkrankung besser beurteilen oder ausschließen zu können, gehört eine **Lungenfunktionsanalyse** mit Untersuchung der arteriellen Blutgase zu jeder erstmaligen Diagnostik (McGoon et al. 2004).

Zur differentialdiagnostischen Beurteilung einer PAH ist auch eine **Laboruntersuchung** mit Analyse des Blutbildes, der Leberfunktionswerte, der Schilddrüsenparameter, des Titers der antinukleären- und der Antiphospholipid-Antikörper (Ak) indiziert. Die Durchführung eines HIV-Tests ist obligatorisch (Galiè et al. 2009), (Barst et al. 2004). Besonderes Augenmerk sollte bei der Blutanalyse auf das *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) oder sein Abspaltungsprodukt *N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide* (NT-proBNP), welches eine längere Halbwertszeit und höhere Stabilität im zirkulierenden Blut besitzt, gelegt werden. Dabei handelt es sich um ein kardiales Hormon, das, abhängig vom Ischämiegrad in den Herzkammern und vom Dehnungszustand des Myokards, überwiegend von den Myokardzellen der Kammern sezerniert wird. BNP besitzt ähnlich wie das atriale natriuretische Peptid vasodilatatorische, natriuretische und diuretische Eigenschaften. Nagaya et al. konnten nachweisen, dass die Plasmaspiegel von BNP positiv mit dem Schweregrad der rechtsventrikulären Dysfunktion und der Mortalität von Patienten mit PAH korrelieren. Somit kommt BNP auch als prognostischer Parameter große Bedeutung zu (Nagaya et al. 1998), (Nagaya et al. 2000), (Galiè et al. 2009).

1.7.2 Spezifische Diagnostik

Die **Echokardiographie** stellt die wichtigste nicht-invasive diagnostische Maßnahme mit der höchsten Sensitivität und Spezifität dar. Hiermit ist es möglich, gleichzeitig Aussagen über die Ätiologie der PH, morphologische Veränderungen des Herzens, sowie eine Abschätzung des systolischen pulmonalarteriellen Druckes (PAP) vorzunehmen. Als Ursache einer PH lassen sich Klappenvitien und Linksherzerkrankungen nachweisen. Zu den typischen morphologischen Veränderungen werden ein dilatierter rechter Vorhof und Ventrikel, sowie paradoxe Septumbewegungen und eine erweiterte untere Hohlvene mit fehlendem inspiratorischen Kollaps gezählt. Eine Abschätzung des systolischen rechtsventrikulären Druckes, der annähernd dem systolischen pulmonalarteriellen Druck entspricht, ist bei bestehender Trikuspidalklappeninsuffizienz möglich. Somit kommt der Echokardiographie große Bedeutung in der Verlaufsbeurteilung und als wichtigste Screeningmethode zu. Als prognostisch relevante Parameter der Echokardiographie werden u.a. der Nachweis eines Perikardergusses, die Bestimmung der baso-apikalen Bewegung des Trikuspidalklappenrings, die sogenannte TAPSE (*Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion*), und die Messung der Fläche oder des Volumens des rechten Vorhofes gewertet. Ein Perikarderguss, eine verminderte TAPSE und ein dilatierter rechter Vorhof sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Leschke et al. 2009), (McLaughlin et al. 2009), (Olschewski et al. 2006), (Hoepfer et al. 2010).

Der **6-Minuten-Gehtest (6MWT)**, ursprünglich von *Guyatt et al.* zur Beurteilung der Belastbarkeit von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz konzipiert, stellt ein standardisiertes und einfach durchführbares diagnostisches Mittel dar, das sich zur Bewertung des Schweregrades der PH und der Krankheitsentwicklung eignet (Guyatt et al. 1985), (Leschke et al. 2009). Dabei wird die von Patienten innerhalb von sechs Minuten zurückgelegte Gehstrecke auf ebener Fläche beurteilt, wobei eine Distanz < 332m mit einer schlechteren Prognose im Vergleich zu weiteren Wegstrecken einhergeht. Die Ergebnisse des Tests können sowohl mit der Überlebensrate, als auch mit der WHO-FC in Zusammenhang gebracht werden (Miyamoto et al. 2000).

Die **Spiroergometrie** gehört zur apparativen Diagnostik der PH, mit derer Hilfe Aussagen über die Ätiologie, Objektivierung des Schweregrades und Hinweise auf Verlauf und Prognose der Erkrankung möglich sind (Olschewski et al. 2006). *Wensel et al.* konnten nachweisen, dass die maximale Sauerstoffaufnahme ein prognostisch

bedeutsamer Parameter für das Überleben von Patienten mit PAH ist (Wensel et al. 2002).

Bei der **Magnetresonanztomographie** handelt es sich um ein weiteres nützliches nicht-invasives diagnostisches Instrument, das eine Untersuchung der kardialen Volumina, der rechtsventrikulären Funktion, Morphologie und Hämodynamik ermöglicht (Badesch et al. 2009).

Weitere **bildgebende Verfahren**, vor allem für die Diagnose einer CTEPH hilfreich, sind die Perfusionsszintigraphie, die Computertomographie des Thorax in Spiraltechnik und die Pulmonalisangiographie. Die Perfusionsszintigraphie gilt als Screeningmethode der Wahl, um eine CTEPH auszuschließen (McLaughlin et al. 2009). Trotz neuerer bildgebender Verfahren ist zur Beurteilung einer möglichen Operabilität und Planung der Operation bei Patienten mit CTEPH die Pulmonalisangiographie eine weiterhin unverzichtbare Maßnahme (Olschewski et al. 2006).

Um eine PAH zweifelsfrei diagnostizieren zu können, muss eine **RHK-Untersuchung** durchgeführt werden. Mittels dieser Untersuchung sind nicht nur Aussagen über den Schweregrad und die Prognose der PAH, sondern auch der Ausschluss anderer Ursachen für eine PH wie extra- und intrakardiale Shunts oder Linksherzerkrankungen möglich. Wichtige Parameter, die während der Untersuchung erfasst werden sollten, sind: PAP (systolisch, diastolisch, mittlerer), rechtsatrialer und rechtsventrikulärer Druck und pulmonalarterieller Verschlussdruck (PAWP). Mit Hilfe des Herzzeitvolumens (HZV), das anhand der Thermodilutionsmethode oder nach dem Fickschen-Prinzip berechnet wird, ist eine Bestimmung des Herzzeitvolumen-Indexes (CI) und des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR) möglich. Der PVR ist nur bei einer Gefäßobstruktion innerhalb des präkapillären Schenkels des pulmonalen Kreislaufs erhöht und kann deshalb bei der Ursachenfindung der PH hilfreich sein (McLaughlin et al. 2009), (Galiè et al. 2009), (McGoon et al. 2004), (Schenk et al. 2005).

Anhand eines Registers der *National Institutes of Health* konnte eine Assoziation zwischen einer erhöhten Mortalität bei Patienten mit IPAH und einem verminderten CI beziehungsweise einem erhöhten rechtsatrialen Mitteldruck und mPAP nachgewiesen werden (D'Alonzo et al. 1991) in (McLaughlin et al. 2004). Jedoch ist zu beachten, dass bei fortgeschrittener rechtsventrikulärer Insuffizienz der mPAP absinken kann. Weitere, in den im Jahre 2009 erschienenen *Guidelines* der *European Society of*

Cardiology (ESC) beschriebene, hämodynamische Prognoseparameter sind die pulmonalarterielle O₂-Sättigung, das HZV und der PVR (Galiè et al. 2009).

Im Rahmen der RHK-Untersuchung sollte zur Auswahl einer adäquaten Therapie bei PAH eine pharmakologische Vasoreagibilitätstestung durchgeführt werden. An geeigneten Substanzen stehen für diese Untersuchung kurzwirksame Vasodilantien zur Verfügung. 10-15% der Patienten mit einer IPAH haben gemäß den geforderten Kriterien eine positive Testantwort. Etwa die Hälfte dieser Patienten, die sogenannten *Responder*, profitiert von einer Langzeittherapie mit Kalziumantagonisten und hat möglicherweise eine weniger aggressive Form der PAH mit einer besseren Prognose (Tonelli et al. 2010), (Galiè et al. 2009).

1.8 Therapie der PH

Noch vor 25-30 Jahren, vor der Entwicklung der heutigen modernen Therapie, lag die mittlere Überlebensrate für Patienten mit IPAH bei < 3 Jahren ab Diagnosestellung (D'Alonzo et al. 1991). Durch große Therapiefortschritte der PAH, wurde eine Optimierung der Lebenserwartung und der Lebensqualität der Patienten mit verbesserter körperlicher Belastbarkeit erreicht (Olschewski et al. 2006). Jedoch gibt es bis heute keine Heilungsaussicht für diese chronisch progredient verlaufende Erkrankung (Barst et al. 2009).

1.8.1 Basistherapie

Eine typische Komplikation der Rechtsherzinsuffizienz sind venöse Thrombosen mit Gefahr der Lungenembolie. Diese sind durch eine Strömungsverlangsamung des Blutes und Immobilisation bedingt. Eine nachgewiesene Dysregulation der Gerinnungs- und Fibrinolysekaskade bei Patienten mit PAH erhöht zusätzlich das Risiko eines thromboembolischen Ereignisses. Daher wird Patienten mit PAH, trotz mangelhafter Studienlage, die Therapie mit einem **oralen Antikoagulant** empfohlen (Hoeper et al. 2010), (Galiè et al. 2009).

Die Gabe von **Diuretika** erfolgt bei dekompensierter Rechtsherzinsuffizienz nach klinischen Gesichtspunkten. Daten zur Dosierung und Präparatewahl stehen aktuell nicht zur Verfügung (Hoeper et al. 2010).

Die Datenlage zur adjuvanten **Sauerstofftherapie** ist ebenfalls nicht hinreichend belegt, so dass sich die Empfehlungen an den Leitlinien für Patienten mit chronisch

obstruktiver Lungenkrankheit orientieren. Danach sollte eine Langzeitsauerstofftherapie bei konsistent arteriellem Partial-Sauerstoffdruck (paO_2) < 60mmHg erfolgen (Galiè et al. 2009).

1.8.2 Spezifische Therapie

Eine der Modifikationen, die auf dem vierten Weltsymposium zur PH in Dana Point vorgenommen wurde, ist die Empfehlung zum Beginn einer spezifischen Therapie bereits für Patienten im funktionellen NYHA-Stadium II (Voswinckel et al. 2009).

Kalziumantagonisten sind nicht für die Therapie der PAH zugelassen, werden jedoch bei Patienten, die die mit Hilfe der Vasoreagibilitätstestung genannten *Responder*-Kriterien erfüllen, eingesetzt (Voswinckel et al. 2009).

Angesichts der verminderten endogenen Prostazyklinsynthese stellt die Gabe von synthetisch hergestellten **Prostazyklinen** einen Grundpfeiler in der Therapie der PAH dar. Neben Epoprostenol i.v., das, bedingt durch seine kurze Halbwertszeit, als Dauerinfusion anzuwenden ist, kommen die länger wirksamen intravenösen Prostanoiden Iloprost und Treprostinil zum Einsatz. Vorteil des inhalativen Iloprosts gegenüber einer invasiven Prostanoidtherapie ist eine organspezifische Deposition und reduzierte systemische Nebenwirkungen bei fehlenden Katheter-assoziierten Komplikationen (Voswinckel et al. 2009).

Eine weitere Säule der spezifischen Therapie der PAH stellen die **Endothelinrezeptorantagonisten (ERA)** dar. Die durch das ET-1 vermittelte pulmonale Vasokonstriktion wird durch die ERA blockiert. Entsprechend der Wirkung von ET-1 auf seine unterschiedlichen Rezeptortypen ET_A und ET_B , unterscheidet man selektive und duale ERAs. Aktuell sind aus dieser Substanzklasse drei Präparate in Deutschland zugelassen: Bosentan, ein dualer ERA, und die beiden selektiven ET_A -Antagonisten Ambrisentan und Sitaxentan (Voswinckel et al. 2009).

NO , das bei Patienten mit PH vermindert sezerniert wird, erhöht die Spiegel des vasodilatatorisch wirkenden Botenstoffs cGMP. Durch den Einsatz von **Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (PDE_{5i})** wird selektiv der Abbau des cGMP in den Lungengefäßen blockiert und verstärkt somit die pulmonale Vasodilatation (Voswinckel et al. 2009). In einer randomisierten, placebokontrollierten Studie mit Patienten mit symptomatischer PAH, konnte eine signifikante Verbesserung der körperlichen

Belastbarkeit, der NYHA-Klassifikation und hämodynamischer Parameter durch die Behandlung mit dem PDE₅i Sildenafil nachgewiesen werden (Galiè et al. 2005).

Das Ziel der Therapie ist eine Degradierung des funktionellen NYHA-Stadiums. So sollten Patienten mit einem funktionellen NYHA-Stadium III oder IV durch eine spezifische Monotherapie eine Abstufung in ein funktionelles NYHA-Stadium I oder II erreichen. Falls dies nicht möglich ist, sollte eine Kombinationstherapie der oben aufgeführten Substanzen begonnen werden (Barst et al. 2009).

Die **Lungen- bzw. Herz-Lungentransplantation** ist eine Therapiemaßnahme für Patienten, die trotz einer adäquaten konservativen Kombinationstherapie ein funktionelles NYHA-Stadium III oder IV aufweisen (Keogh et al. 2009).

Für die CTEPH ist die **pulmonale Endarterektomie (PEA)** die Therapie der Wahl. Dadurch kann eine Verbesserung, im besten Fall sogar Normalisierung, der Hämodynamik erreicht werden. Trotz fehlender Zulassung der PAH-spezifischen Medikamente für die CTEPH geht man von einem Nutzen dieser Medikamenten für Patienten mit inoperabler CTEPH aus (Hoeper et al. 2010).

1.9 Prognostische Indizes

Die Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung und eine verlässliche Prognose sind von entscheidender Bedeutung für die Planung der Therapie und des Intervalls der Verlaufskontrollen (McLaughlin et al. 2009).

Die zugrunde liegende Ätiologie der PAH beeinflusst die Prognose signifikant. So haben Patienten mit einer PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen eine schlechtere Prognose als Patienten mit einer IPAH. Wohingegen Patienten mit einer PAH assoziiert mit angeborenen Herzfehlern eine bessere Überlebensrate als Patienten mit IPAH aufweisen. Die schlechteste Prognose besitzen Patienten mit einer PVOD oder PCH, da effektive Therapiemaßnahmen für diese Untergruppe der PAH fehlen (Galiè et al. 2009). Abbildung 1.1 gibt einen graphischen Überblick über die Überlebensraten verschiedener Untergruppen der PAH.

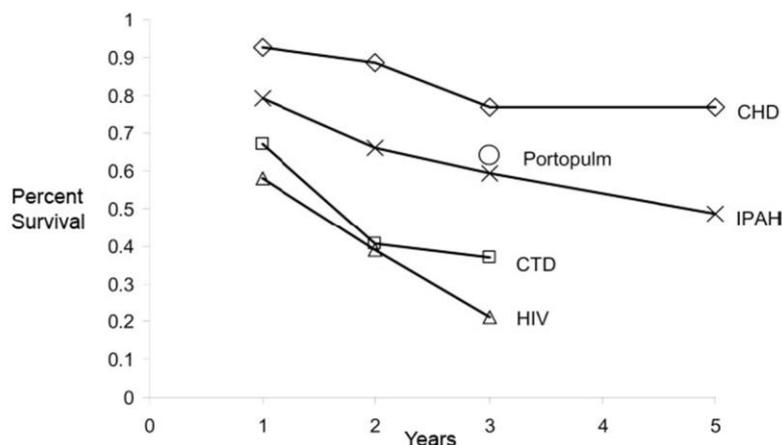


Abbildung 1.1: Mittleres Überleben der Patienten mit PAH in Abhängigkeit von der Ätiologie

(aus McLaughlin et al. 2009)

Ebenso tragen ein niedriges oder hohes Alter (≤ 14 oder ≥ 65 Jahre) sowie auftretende Synkopen, Hämoptysen und Rechtsherzinsuffizienz zu einer schlechten Prognose bei Patienten mit einer IPAH bei (Galiè et al. 2009).

Zu den relevanten diagnostischen Methoden, mit deren Hilfe eine Prognoseeinschätzung möglich ist, gehören vor allem der 6MWT, die Spiroergometrie, der laborchemisch bestimmte BNP/NT-proBNP-Plasmaspiegel, die Echokardiographie und die RHK-Untersuchung mit pharmakologischer Vasoreagibilitätstestung. Weiterhin kann mittels der WHO-FC eine prognostische Beurteilung vorgenommen werden (McLaughlin et al. 2004). Die hier genannten prognostischen Hilfsmittel wurden im Kapitel 1.6 und Kapitel 1.7 genauer erläutert und die daraus ermittelbaren prognostisch wichtigen Parameter beschrieben. Tabelle 1.3 gibt einen Überblick über prognostische Determinanten mit ihren Grenzwerten.

Tabelle 1.3: Prognostische Parameter

| Stabil | Prognostische Determinanten | Instabil |
|---|--|---|
| Nein | Klinische Zeichen für Rechtsherzversagen | Ja |
| Keine oder langsam | Progredienz der Erkrankung | Rasch |
| Nein | Synkopen | Ja |
| I, II | WHO-FC | IV |
| > 400-500m | 6-Minuten-Gehstrecke | < 300m |
| Peak $VO_2 > 15\text{ml/min/kg}$ | Spiroergometrie | Peak $VO_2 < 12\text{ml/min/kg}$ |
| Normal oder nahezu normal | BNP/NT-proBNP-Plasmaspiegel | Stark erhöht und/oder steigend |
| Kein Perikarderguss | Echokardiographische Befunde | Perikarderguss |
| TAPSE > 2,0cm | | TAPSE < 1,5cm |
| RAP < 8mmHg und CI $\geq 2,5\text{l/min/m}^2$ | Hämodynamik | RAP > 15mmHg oder CI $\leq 2,0\text{l/min/m}^2$ |

RAP: rechtsatrialer Druck

(aus Hoeper et al. 2010)

Bei der Prognoseeinschätzung ist es wichtig, nicht auf einen alleinigen Wert zu vertrauen und stets eine ‚integrative Beurteilung verschiedener prognostischer Parameter‘ vorzunehmen (Hoeper et al. 2010).

1.10 Endotheliale Progenitorzellen (EPC) bei PH

1.10.1 Kurzüberblick über EPC

Die früher allgemein anerkannte Auffassung, dass Vaskulogenese, das heißt die Entwicklung neuer Blutgefäße durch endotheliale Vorläuferzellen, nur während der Embryogenese stattfindet, wurde 1997 durch *Asahara et al.* widerlegt. *Asahara et al.* gelang die Isolation von Zellen aus dem menschlichen peripheren Blut, die sie als EPC beschrieben. Diese Zellen exprimierten das für hämatopoetische Stammzellen charakteristische Antigen CD34 (*Cluster of Differentiation*). Die Arbeitsgruppe nahm anhand der vorliegenden *in vitro* Ergebnisse eine Differenzierung der CD34-positiven Zellen in Endothelzellen an. Die durchgeführten *in vivo* Versuche ließen eine Beteiligung dieser Zellen an der Neovaskulogenese und somit Neovaskulogenese vermuten (Asahara et al. 1997).

Darauf folgende Untersuchungen dieser Zellpopulation widerlegten die von *Asahara et al.* gewonnen Erkenntnisse zum Teil. Es wurde aufgezeigt, dass diese Zellen kein Proliferationspotential besitzen und aufgrund weiterer Oberflächenmarker am ehesten den Monozyten entstammen (Rehman et al. 2003). Nur kurze Zeit später konnte eine weitere Zellpopulation, die sogenannten *Endothelial Outgrowth Cells* (EOC), identifiziert werden. Diese stammen aus dem Knochenmark und weisen im Vergleich zu den von *Asahara et al.* nachgewiesenen Zellen ein beträchtliches Proliferationspotential und ein verzögertes Wachstum in der Zellkultur auf (Lin et al. 2000), (Ingram et al. 2004).

Bis heute gibt es keine einheitliche Definition der EPC. Aktuell werden die EPC in zwei Typen aufgegliedert, eine frühe und eine späte Fraktion, die sich in ihrer Morphologie, ihrer Proliferationsfähigkeit und Überlebensmerkmalen unterscheiden. Die gegenwärtig als frühe Fraktion bezeichneten Zellen entsprechen den von *Asahara et al.* ursprünglich als EPC beschriebenen Zellen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um kultivierte Monozyten, die durch Sekretion von Wachstumsfaktoren den Prozess der Neovaskulogenese unterstützen, jedoch selbst nicht proliferieren können. Diese Zellen haben eine spindelartige Form und erreichen in der Zellkultur ihr maximales Wachstum nach zwei bis drei Wochen. Die weiter oben beschriebenen EOC sind der späten Fraktion der EPC gleichzusetzen. Diese Zellen sind hochproliferativ und haben, wie Endothelzellen, die Fähigkeit Gefäßnetzwerke auszubilden. Diese späte Fraktion der EPC hat in der Zellkultur ihr Wachstumsmaximum nach vier bis acht Wochen erreicht und weist eine pflastersteinartige Form auf (Hur et al. 2004), (Toshner und Morrell 2010). Die Differenzierung in frühe und späte Fraktion ist möglicherweise von dem bereits in Kapitel 1.4 beschriebenen BMP abhängig, welches *Smadja et al.* ausschließlich in der späten Fraktion nachweisen konnten (Smadja et al. 2008).

Aktuell gibt es keine allgemein anerkannte Methode zur Charakterisierung dieser heterogenen Zellpopulation. Die Zellmarker CD34, CD133 und *Kinase Insert Domain Receptor* (KDR)/*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGF R2) werden für gewöhnlich für die Bestimmung der EPC verwendet. Sie stellen eine Kombination von hämatopoetischen und endothelialen Zellmarkern dar (Toshner und Morrell 2010), (Liew et al. 2006). Tabelle 1.4 gibt einen Überblick über die gebräuchlichsten Ak.

Tabelle 1.4: Die gebräuchlichsten Ak zur Bestimmung der zirkulierenden EPC

| Antibody | Cell expression | Function |
|---------------|---|--|
| CD34 | 'Endothelial progenitor cells', bone marrow, haematopoietic cells, endothelial cells, mast cells, dendritic cells | Adhesion molecule |
| CD133 | 'Endothelial progenitor cells', haematopoietic stem cells, neuronal and glial stem cells, epithelial cells | Not known |
| KDR (VEGF R2) | 'Endothelial progenitor cells', endothelial cells, bone marrow and haemangioblasts | Main receptor for vascular endothelial growth factors which exert mitogenic, chemotactic, and vascular permeabilising effects, involved in embryonic differentiation and development |
| CD45 | Haematopoietic cells (including haematopoietic stem cells) except erythrocytes | Essential regulator of T- and B-lymphocyte antigen receptor signaling, signal transduction, inhibition or upregulation of various immunological functions |
| CD14 | Monocytes, macrophages | Mediates the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide |

Die Zellmarker CD45 und CD14 werden zum Ausschluss hämatopoetischer Zellen und Monozyten verwendet.

(aus Toshner und Morrell 2010)

Es wird davon ausgegangen, dass die EPC eine entscheidende Rolle bei der postnatalen Neovaskularisierung und Reendothelialisierung beschädigter Gefäße spielen (Urbich und Dimmeler 2004), (Tuder et al. 2009).

1.10.2 Die Rolle der EPC bei PH

Endotheliale Dysfunktion und *Gefäßremodeling* spielen, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der PH. Endogene Progenitorzellen scheinen am *Gefäßremodeling* der PH beteiligt zu sein. So konnten *Davie et al.* bei Kälbern mit hypoxie-induzierter PH aus dem Knochenmark stammende Zellen, die den Stammzellfaktor-Rezeptor c-kit exprimieren, in den umgebauten Gefäßwänden der Pulmonalarterien nachweisen (*Davie et al. 2004*). Auch bei Mäusen mit hypoxie-induzierter PH wurde die Mitwirkung aus dem Knochenmark stammender Zellen am pulmonalen *Gefäßremodeling* beobachtet (*Hayashida et al. 2005*). 2009 wiesen

Toshner et al. bei Patienten mit PAH in den charakteristischen plexiformen Läsionen Zellen nach, die Stammzellantigene für EPC exprimieren. Da das Vorkommen plexiformer Läsionen bei PAH mit einer schlechten Prognose der Erkrankung einherzugehen scheint, könnten EPC bei PH negative Auswirkungen haben (*Toshner et al. 2009b*). Die gleiche Arbeitsgruppe fand heraus, dass bei PAH-Patienten mit Mutationen des BMPR2-Gens die Funktion der späten Zellfraktion der EPC beeinträchtigt sein kann. Hierdurch ist die Entstehung von EPC mit einem hyperproliferativen Phänotyp möglich, der unfähig ist Gefäßnetzwerke auszubilden. Daher könnten dysfunktionale EPC bei Patienten mit PAH einen schädigenden Einfluss auf die Vaskulogenese nehmen (*Toshner et al. 2009a*).

Yao et al. fanden kürzlich EPC in endarterektomisiertem Gewebe von Patienten mit CTEPH. Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, dass in Thrombemboli eingewanderte EPC bei der Bildung einer Neointima und somit auch bei der Pathogenese der CTEPH beteiligt sind (*Yao et al. 2009*).

Diese Studien weisen darauf hin, dass EPC eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PH spielen. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass erhöhte Zahlen der EPC einen erfolglosen Reparaturversuch des geschädigten Endothels darstellen. Ferner zeigen erste klinische Studien mit EPC als zellbasierte Therapie positive Ergebnisse, so dass auch ein protektiver Einfluss durchaus wahrscheinlich erscheint. Die genaue Funktion der EPC konnte somit bis heute nicht hinreichend geklärt werden (*Fadini et al. 2010*).

Weitere Unklarheit besteht über die Anzahl der EPC im peripheren Blut der Patienten mit PAH. So wurden in den letzten Jahren Studien veröffentlicht, in denen eine erhöhte Anzahl an EPC bei Patienten mit PAH im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt wurde. Andere Studien hingegen belegten, dass Patienten mit dieser Erkrankung eine erniedrigte EPC-Zahl im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aufwiesen. In den genannten Studien wurde jedoch übereinstimmend festgestellt, dass die Fähigkeit zur Ausbildung wirksamer Gefäßnetzwerke bei den untersuchten EPC beeinträchtigt war (*Asosingh et al. 2008*), (*Toshner et al. 2009b*), (*Junhui et al. 2008*), (*Diller et al. 2008*).

1.10.3 Therapeutischer Einsatz der EPC

Aufgrund der Beteiligung von EPC in Neovaskulisierungs- und Reendothelialisierungsprozessen wird aktuell auch die Möglichkeit, EPC als

zellbasierte Therapie bei PH zu nutzen, erforscht. Bei Patienten mit Myokardinfarkt konnte bereits eine positive Beeinflussung der nach Myokardinfarkt stattfindenden kardialen Umbauprozesse und so eine Verbesserung der globalen linksventrikulären Pumpfunktion durch intrakoronare Infusion von Progenitorzellen erzielt werden (Schächinger et al. 2004).

Zhao et al. gelang es bei Ratten mit Monocrotalin (MCT)-induzierter PAH mithilfe eNOS-transfizierten EPC den rechtsventrikulären systolischen Druck annähernd zu normalisieren (Zhao et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse konnten *Raoul et al.* bei Mäusen mit MCT-induzierter PH mit EPC, jedoch ohne zusätzlichen Transfer von eNOS, erzielen (Raoul et al. 2007). Auch erste Transplantationen autologer EPC bei Patienten mit IPAH lieferten vielversprechende Ergebnisse. So konnte zwölf Wochen nach Infusion der Zellen eine Verbesserung der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT und eine signifikante Verbesserung des mPAP, CI und PVR beobachtet werden (Wang et al. 2007). Jedoch erfolgte diese Studie nur an einem kleinen Patientenkollektiv ($n = 15$) ohne doppelte Verblindung und nicht placebo-kontrolliert. Ähnliche Ergebnisse konnte die gleiche Arbeitsgruppe durch Transplantation von EPC bei 13 Kindern mit IPAH erzielen (Zhu et al. 2008). Zwei weitere Studien zur zellbasierten Therapie bei PAH werden derzeit in China und Kanada durchgeführt (Fadini et al. 2010).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zusätzlich bemerkenswert, dass in einem Großteil der bisher durchgeführten therapeutischen Studien die frühe Fraktion der EPC verwendet wurde, die nach neuesten Beobachtungen den Monozyten entstammt und keine proliferativen Eigenschaften besitzt (Toshner und Morrell 2010).

1.11 Ziele dieser Arbeit

Die genaue Rolle der EPC in pathophysiologischen Prozessen der PH konnte bisher nicht geklärt werden. Es ist unklar, ob diese Zellpopulation einen protektiven Einfluss hat oder ein Voranschreiten der Erkrankung begünstigt. Bisherige Ergebnisse über die Anzahl der EPC bei Patienten mit PH im Vergleich zu Gesunden sind kontrovers. In dieser Arbeit soll daher anhand einer geeigneten Methode die Zahl der EPC bei Patienten mit PH bestimmt und diese mit einem Kontrollkollektiv verglichen werden. Dabei wurden in der vorliegenden Studie die EPC als CD34-positive und KDR-positive Zellen definiert. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Anzahl an EPC in einen Zusammenhang mit dem Schweregrad der Erkrankung gebracht werden kann und ob

1 Einleitung

so Aussagen über den Verlauf der Erkrankung möglich sind. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die spezifische Therapie der Patienten einen Einfluss auf die EPC-Zahl hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Die Vollblutproben wurden den an der Studie teilnehmenden Patienten (n = 80) während ihres stationären Aufenthaltes auf den pneumologischen Schwerpunktstationen der Medizinischen Klinik II, Station 10 (Haus Seltersberg) und Privatstation A (Thannhauser) oder in der Ambulanz für pulmonale Hypertonie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg am Standort Gießen in dem Zeitraum von April 2008 bis Dezember 2008 entnommen. Bevor die Patienten in die Studie aufgenommen wurden, erhielten sie eine mündliche und schriftliche Aufklärung und mussten schriftlich ihr Einverständnis geben. Die Diagnosen wurden anhand der Venedig-Klassifikation gestellt. Das Patientenkollektiv umfasst Patienten mit einer IPAH, assoziierten PAH, CTEPH und PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus. Nicht aufgenommen in die Studie wurden Patienten mit einer PH infolge einer Linksherzerkrankung, sowie einer PH infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie. Um eine Beeinflussung der Anzahl an EPC durch Tumorerkrankungen zu vermeiden, wurden weiterhin Patienten mit malignen Erkrankungen von dieser Arbeit ausgeschlossen.

Als Kontrollkollektiv wurden *Buffy-Coats* (n = 9) von freiwilligen Blutspendern aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg am Standort Gießen verwendet.

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper

| Antikörper | Hersteller / Katalog Nr. | Isotyp | Clone |
|---|---|-----------|---------|
| CD34-PE | BeckmanCoulter, Brea, USA/ IM1250U | Maus IgG1 | QBEnd10 |
| Monoklonaler Anti- human VEGF R2 (KDR)- Allophycocyanin | R&D Systems, Minneapolis, USA/ FAB357A | Maus IgG1 | 89106 |
| Mouse IgG1 Isotype Control- Allophycocyanin | R&D Systems, Minneapolis, USA/ IC002A | Maus IgG1 | 11711 |

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien

| Substanz | Handelsname/ Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|---|
| Aqua dest. | | |
| Biocoll-Trennlösung, Dichte 1,077g/ml, isoton | | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Bovines Serum Albumin | BSA | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| Ethylendiamintetraessig- säure- Dinatrium- Dihydrat | EDTA | Fluka, Buchs, Schweiz |
| Ethanol 70% | | SAV LP, Flintsbach a. Inn, Deutschland |
| Flüssigmedium | RPMI 1640 with L-Glutamine with 2,0 g/l NaHCO ₃ | PAN- Biotech, Aidenbach, Deutschland |
| Kaliumchlorid [KCl] | | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphos- phat [KH ₂ PO ₄] | | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphos- phat- Dihydrat [Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O] | | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid [NaCl] | | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumazid [NaN ₃] | | Sigma- Aldrich, Buchs, Schweiz |

2.1.4 Geräte

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

| Gerät | Handelsname/ Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------------------|-------------------------------------|---|
| Durchflusszytometer | FACSCalibur | BD Biosciences, Heidelberg , Deutschland |
| Laborwaage | PB 303 Delta Range | Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz |
| Mikroskop | Wilovert S 30 | Hund, Wetzlar, Deutschland |
| Zählkammer | Neubauer-improved | Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland |
| pH- Messgerät | Labor-pH-Meter 766 | Knick, Berlin, Deutschland |
| Reagenzglasschüttler | REAX 2000 | Heidolph, Schwabach, Deutschland |
| Rührwerkzeug | MR 3002 | Heidolph, Schwabach, Deutschland |
| Sicherheitswerkbank | HERAsafe | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Wasseraufbereitungs- system | Milli-Q Advantage A10 | Millipore, Billerica, USA |
| Zentrifuge | Rotina 46R | Hettich, Tuttlingen, Deutschland |
| Zentrifuge | Rotanta/ AP | Hettich, Tuttlingen, Deutschland |

2.1.5 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2.4: Verwendete Gebrauchsmaterialien

| Material | Handelsname/ Bezeichnung | Hersteller |
|---|------------------------------|---|
| Akkubetriebene Pipettierhilfe | pipetusforty | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland |
| Butterfly | Safety-Multifly-Set | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Desinfektionsspray | Softasept N | B. Braun, Melsungen, Deutschland |
| Einmalhandschuhe | Nitra-Tex | AnsellHealthcare, Brüssel, Belgien |
| Messbecher, -zylinder, diverse | | Schott- Rohrglas, Mitterteich, Deutschland |
| Pflaster | Micropore | 3M, Neuss, Deutschland |
| Pipetten, diverse | | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl | | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Probenröhrchen | S-Monovette, Kalium- EDTA | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Reagiergefäße 1,5ml | | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Serologische Pipetten 1ml, 5ml, 10ml | | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Schlinggazetupfer | | Fuhrmann, Much, Deutschland |
| Teströhrchen 5ml | Round-Bottom Tube | BD Falcon, Fort Worth, USA |
| Zentrifugiergefäße 50ml | Conical Tubes | BD Falcon, Fort Worth, USA |
| Zentrifugiergefäße 15ml | Conical Tubes | BD Falcon, Fort Worth, USA |

2.1.6 Material für das Durchflusszytometer

Tabelle 2.5: Verwendetes Material für das Durchflusszytometer

| Material | Handelsname/ Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Behälterflüssigkeit | FACSFlowSheath Fluid | BD Biosciences, San Jose, USA |
| Reinigungsflüssigkeit | FACSRinse Solution | BD Biosciences, San Jose, USA |
| Reinigungsflüssigkeit | FACSClean Solution | BD Biosciences, San Jose, USA |

2.1.7 Lösungen und Puffer

Für die unten aufgeführten Lösungen wurde deionisiertes und ultrafiltriertes Wasser verwendet.

Tabelle 2.6: Verwendete Lösungen und Puffer

| Lösung | Zusammensetzung |
|---|--|
| FACS Puffer | 500ml PBS 1% 0,5g BSA 1% 0,1g Natriumazid 0,29g EDTA |
| Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), 10% | 80g NaCl 2g KCl 2g KH ₂ PO ₄ 11,5g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen und pH- Wert auf 7,4 einstellen (mittels NaOH bzw. HCl) |

2.1.8 Software

Tabelle 2.7: Verwendete Software

| Software | Hersteller |
|--|-------------------------------|
| BD CellQuest Pro, Version 4.0.2 | BD Biosciences, San Jose, USA |
| WinMDI, Version 2.8 | |
| GraphPad Prism for Windows, Version 5.03 und 6.0 | GraphPad Software, Inc. |

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation peripherer mononukleärer Zellen

Die hier beschriebene Durchführung der Zellisolation durch eine Dichtegradientenzentrifugation wurde bei allen Proben standardmäßig unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion einer peripheren Vene der oberen Extremität mit einem Butterfly (Kanülengröße 21G). Mit Hilfe des Aspirationsprinzips floss das Blut in eine zur Verhinderung der Antikoagulation mit EDTA-Lösung gefüllte Spritze.

2.2.1.2 Durchführung

Zur Zellseparation wurden 4ml Vollblut mit 2ml Flüssigmedium (RPMI 1640, PAN-Biotech) verdünnt und dann mit Hilfe einer serologischen Pipette vorsichtig in ein mit 9ml Biocoll-Trennlösung (Biochrom AG) beschicktes Zentrifugiergefäß aufgeschichtet. Bei denen zur Kontrolle verwendeten *Buffy-Coats* wurden 4ml des *Buffy-Coats* mit 10ml Flüssigmedium verdünnt und auf 25ml Biocoll-Trennlösung aufgeschichtet. Anschließend erfolgte bei allen Proben ein Zentrifugationsschritt für 20min bei 1800rpm ohne Bremse, wodurch es zu einer Auftrennung des Blutgemisches in ein oberes thrombozytenreiches Plasma, eine mononukleäre Zellschicht, hauptsächlich bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, und eine untere Bande, bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten, kam. Der mononukleäre Zellring an der Interphase zwischen Plasma und Trennlösung wurde vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgenommen und dann in einem 15ml fassenden Zentrifugiergefäß mit Flüssigmedium auf 10ml aufgefüllt und resuspendiert.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der mononukleären Zellen wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer-improved, Tiefe 0,100mm, 0,0025mm²) bestimmt. Dafür wurden 100µl der resuspendierten mononukleären Zellen mit FACS-Puffer 1:10 verdünnt und mithilfe eines Reagenzglasschüttlers für 1s durchmischt. In einem nächsten Schritt wurden 10µl dieser Suspension mit einer Pipette entnommen, in den Kapillarspalt zwischen Deckglas und Zählkammer transferiert und die Zellen in den vier Eckquadraten ausgezählt.

Die Gesamtzellzahl pro ml wurde nach folgender Formel berechnet:

$$x = n / 4 \cdot v \cdot 10^4$$

x = Gesamtzellzahl pro ml

n = Zellzahl aus den vier Eckquadraten

v = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension.

2.2.2 Charakterisierung der EPC mittels durchflusszytometrischer Analyse

2.2.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS) ist ein Verfahren zur Bestimmung von morphologischen Eigenschaften von Zellen sowie zum quantitativen Nachweis von Oberflächenmolekülen.

In dieser Arbeit wurde zum einen die Expression des Oberflächenproteins CD34, ein Antigen, welches auf hämatopoetischen Zellen und auf endothelialen Vorläuferzellen exprimiert ist, untersucht. Zum anderen wurde die Ausprägung des Oberflächenmoleküls KDR (VEGF R2) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein ebenfalls auf endothelialen Vorläuferzellen exprimiertes Oberflächenantigen (Toshner und Morrell 2010).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wird die zu untersuchende Zellsuspension in einer Trägerflüssigkeit mittels Überdruck durch einen Lichtstrahl (Laser) geführt, welchen die Zellen einzeln passieren. Abhängig vom Gerätetyp wird die Messküvette von 1-2 bzw. 3-4 Lasern durchstrahlt. Hierbei wird, in Abhängigkeit der Zellmorphologie und der Probenvorbereitung, ein Streu- und Fluoreszenzlicht erzeugt, das mittels Detektoren jeweils separat aufgefangen wird. Dadurch entsteht bei diesem Vorgang durch Lichtbeugung ein Vorwärtsstreulicht (FSC), welches entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen wird und abhängig von der Zellgröße ist. Außerdem wird durch Lichtbrechung und Reflexion ein Seitwärtsstreulicht (SSC) erzeugt, das im rechten Winkel des einfallenden Lichtes detektiert wird und ein Maß für die Zellkomplexität und -granularität ist. Neben der Lichtstreuung kann das Durchflusszytometer spezifische Fluoreszenzen und deren entsprechende Fluoreszenzintensitäten messen (siehe Abbildung 2.1). Dabei wird, abhängig vom verwendeten Fluorochrom, Licht eines definierten Wellenlängenspektrums emittiert, das von den Sensoren des Durchflusszytometers aufgenommen und verstärkt wird. Die emittierte Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Ak, können verschiedenste Merkmale einer Zellpopulation untersucht werden.

Als Farbstoffe wurden in dieser Arbeit Allophycocyanin (APC) und R-phycoerythrin (PE) verwendet (siehe Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Verwendete Fluorchromkonjugate mit den entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren

| Fluorchromkonjugat | Absorption bei Wellenlänge [nm] | Emission bei Wellenlänge [nm] |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Allophycocyanin (APC) | 620 - 650 | 660 - 670 |
| R-phycoerythrin (PE) | 486 - 580 | 568 - 590 |

Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen dienen Isotypkontrollen. Es werden hierfür Ak des gleichen Immunglobulin (Ig)-Isotyps benutzt, die an kein spezifisches Epitop binden und mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

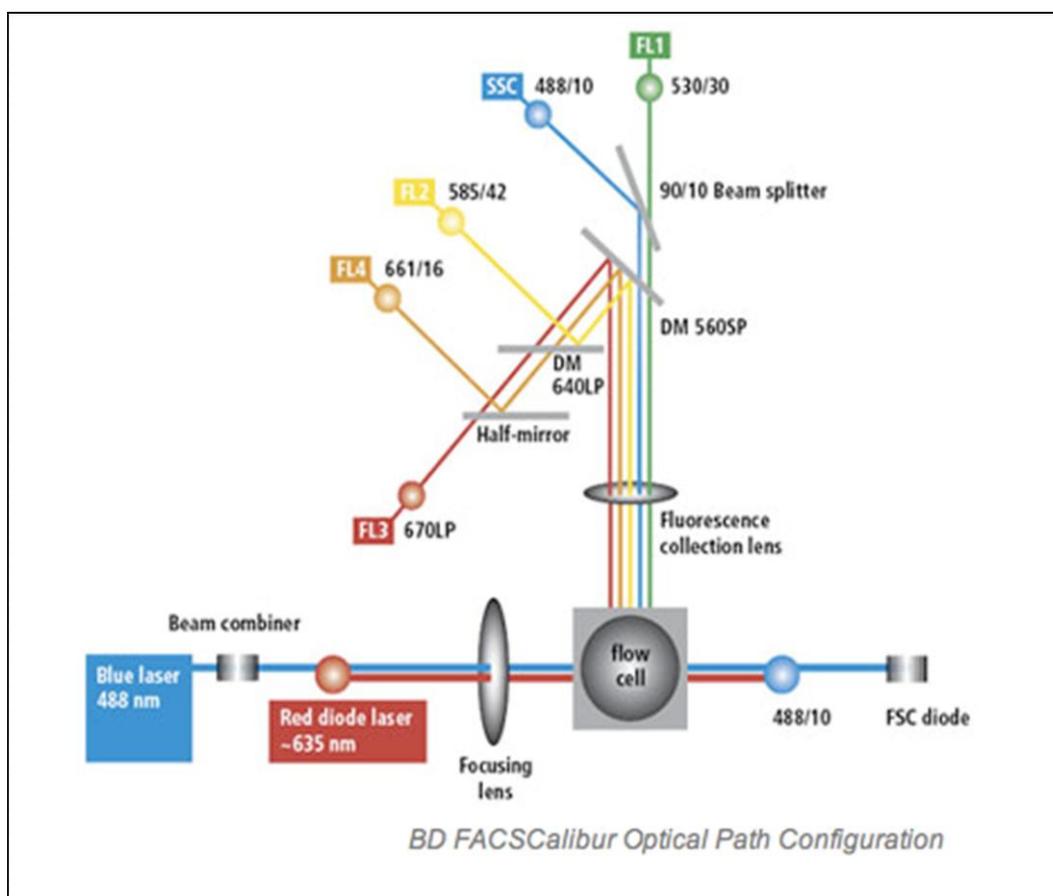


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des Durchflusszytometers BD FACSCalibur™

(Quelle: Online im Internet, <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/>, [Stand: 17.10.2010]).

In der Messküvette (*flowcell*) werden die Zellen einzeln von Laserlicht bestrahlt. Die Lichtquelle besteht aus einem luftgekühltem Argonionenlaser (*bluelaser*, 488nm) und Diodenlaser (*reddiodelaser*, 635nm). Nachdem das in einem 90° Winkel gestreute Licht mit einer Linse gesammelt wird, wird mit Hilfe von Teilerspiegeln und Bandpassfiltern eine Auftrennung der Fluoreszenzspektren erreicht. Das emittierte Licht wird durch Photomultiplier verstärkt und die optischen Signale (Photonen) werden in elektronische Signale (Spannungsimpulse) umgewandelt.

2.2.2.2 Durchführung

Nach der Zellzahlbestimmung wurde in zwei vorbeschriftete 5ml fassende Teströhrchen je eine Zellsuspension mit $1,5 \times 10^6$ Zellen transferiert und mit je 1ml Flüssigmedium vermischt. Nach Zentrifugation über 10min bei 1500rpm mit Bremse wurde der Überstand abgekippt. Es folgte die Anfärbung der Zellen. Hierzu wurden den Zellpellets beider Teströhrchen je 10µl CD34-PE-Ak beigefügt. Zusätzlich wurden in Teströhrchen Nr.1 20µl KDR-APC-Ak und in Teströhrchen Nr.2 (Negativkontrolle) 20µl *Isotype-Control-APC-Ak* pipettiert und gut durchmischt. Da für jeden Probanden zur Verifizierung zwei Proben hergestellt wurden, lagen die Positiv- und Negativröhrchen in zweifacher Ausführung vor. Nach einer Inkubationszeit von 20min auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (1,5ml FACS-Puffer pro Röhrchen; Zentrifugation: 3min, 1200rpm, mit Bremse). Die Überstände wurden abgekippt und das Zellpellet mit 1-1,5ml FACS-Puffer resuspendiert. Direkt vor der Messung wurden die Zellen auf einem Reagenzglasschüttler kurz bei niedriger Geschwindigkeit gründlich gemischt, um eine Zellaggregation zu reduzieren. Die Analyse der Proben erfolgte an einem Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma BD Biosciences innerhalb einer halben Stunde nach Beendigung der Färbung.

2.2.2.3 Auswertung und Dokumentation

Im Durchschnitt wurden pro Teströhrchen insgesamt 750.000 Zellen gezählt. Gemessen wurde mit der Software CellQuest™ Pro Version 4.0.2. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Software WinMDI, Version 2.8 eingesetzt. Die Beurteilung der Ergebnisse wurde anhand Punkt-Wolkendiagrammen (*Dotplots*) durchgeführt. Durch Setzen von Analysefenstern (*Regions*) konnten die Zellen in Populationen eingeteilt und dadurch genauer analysiert werden.

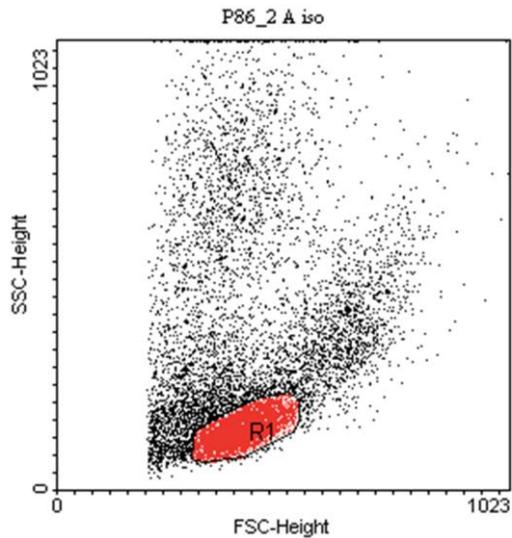


Abbildung 2.2: Identifizierung der lymphozytenartigen Zellen

Auftragung der Intensität des FSC (= Größe der Zellen) auf der x-Achse gegen die Intensität des SSC (= Granularität der Zellen) auf der y-Achse zur Aufschlüsselung der Zellpopulationen. Die Region „R1“ umschließt die lymphozytenartigen Zellen, die bei der weiteren Auswertung berücksichtigt wurden.

Über die lymphozytenartigen Zellen wurde eine Region „R1“ gelegt (siehe Abbildung 2.2). Diese Zellen flossen in die weitere Auswertung ein. Dazu wurden die Zellen der Region „R1“ gesondert in weiteren Punktwolkendiagrammen dargestellt. Mithilfe der KDR-Negativkontrolle (Isotyp-APC-Ak und CD34-PE-Ak) wurde ein Quadrantkreuz gesetzt (siehe Abbildung 2.3), dessen Einstellung für die Ermittlung der CD34-positiven als auch KDR-positiven Zellen verwendet wurde (siehe Abbildung 2.4).

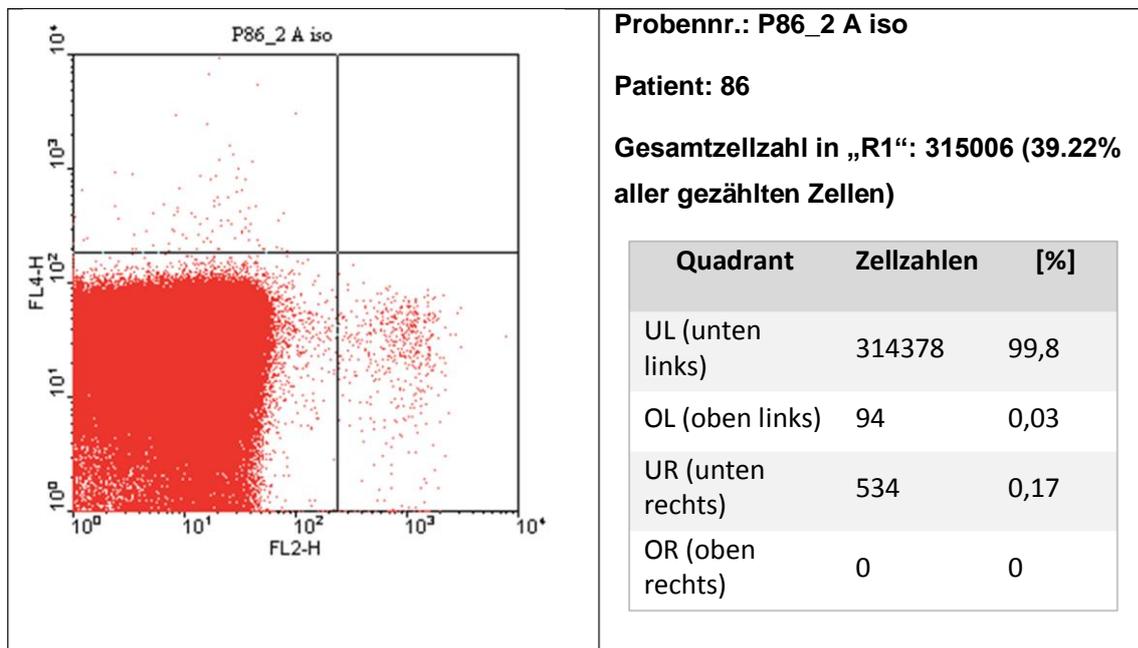


Abbildung 2.3: Negativkontrolle Isotyp-APC-Ak und CD34-PE-Ak

Darstellung der mit der Region „R1“ markierten lymphozytenartigen Zellen in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensität bei einer CD34-PE-positiven, APC-negativen Probe (KDR-Negativkontrolle). Die Fluoreszenzintensität 2 (= FL 2) ist proportional zur Intensität der Anfärbung mit R-phycoerythrin (PE). Wobei die Fluoreszenzintensität 4 (= FL 4) sich proportional zur Anfärbung einer Zelle mit dem Fluorchromkonjugat Allophycocyanin (APC) verhält.

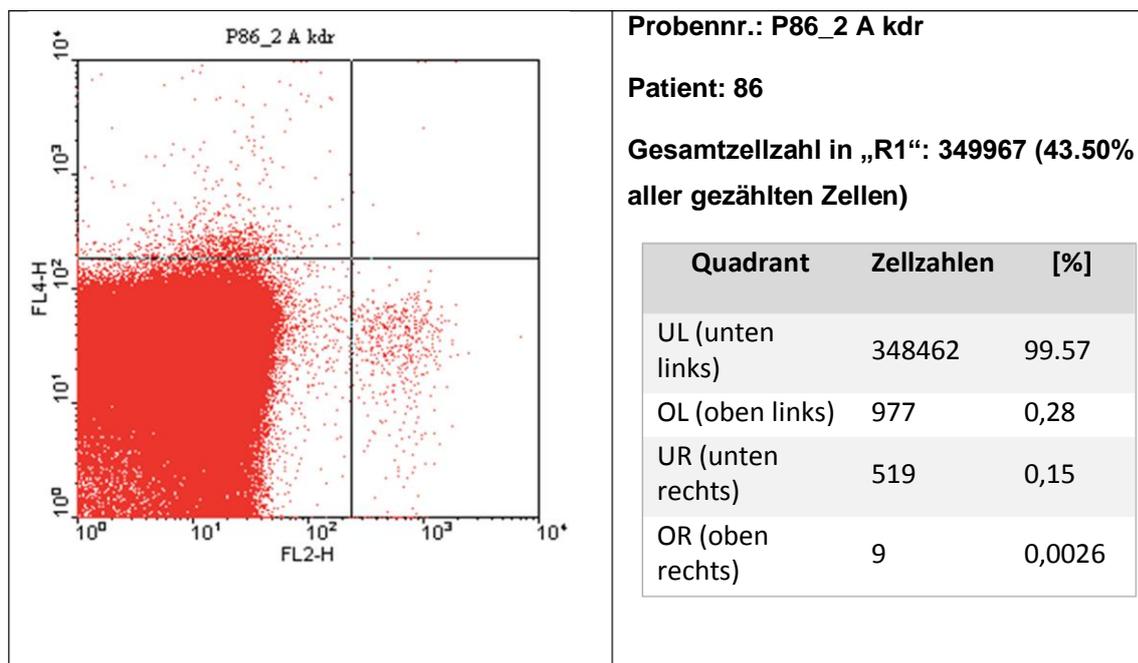


Abbildung 2.4: Darstellung einer CD34-PE-positiven und KDR-APC-positiven Probe

Das Analysefenster ist in Quadranten unterteilt. Von Bedeutung sind vor allem der untere rechte und der obere rechte Quadrant. Im linken unteren Quadranten befinden sich lymphozytenartige Zellen, die weder CD34-positiv noch KDR-positiv sind. Im rechten unteren Quadranten kommen die CD34-positiven Zellen zu liegen. Der linke obere Quadrant erfasst die KDR-positiven Zellen. Im rechten oberen Quadranten befinden sich, aufgrund ihrer höheren Fluoreszenzaktivität, die sowohl CD34-positiven als auch KDR-positiven Zellen.

Für die Ermittlung der EPC (CD34-positiven und KDR-positiven Zellen; rechter oberer Quadrant) wurden die in der KDR-Negativkontrolle detektierten Zellen des rechten oberen Quadranten abgezogen.

Die Anzahl an EPC wurde als Prozent aller lymphozytenartigen Zellen (relative Zahl) angegeben und ergab sich durch Bildung eines Mittelwertes der A- und B-Probe eines jeden Probanden.

2.2.3 Erhebung der klinischen Daten

Es wurde versucht, von allen Patienten klinische Parameter zu erfassen, mit deren Hilfe eine Schweregradeinteilung der PH möglich ist. Da die Parameter 6MWT und der Laborparameter BNP routinemäßig bei einem ambulanten oder stationären Aufenthalt der Patienten erhoben werden, konnte auf diese Daten, wenn sie in einem

vorgegebenen Zeitintervall untersucht wurden, zurückgegriffen werden. Der 6MWT wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt und von geschultem Personal betreut, das über einen Einschluss der Patienten in die vorliegende Arbeit nicht informiert war. Bei Patienten, bei denen die funktionelle NYHA Klasse nicht dokumentiert war, wurde das NYHA-Stadium anhand der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT eingeteilt (siehe Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Zuweisung der NYHA-Stadien anhand der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT

| NYHA-Stadium | 6MWT [m] |
|--------------|------------------|
| II | ≥ 400 |
| III | $< 400 \geq 150$ |
| IV | < 150 |

Folgende hämodynamische Parameter, die mit Hilfe der RHK-Untersuchung bestimmt werden, wurden erfasst: mPAP, PAWP, zentraler Venendruck (CVP), CI, pulmonaler Gefäßwiderstand-Index (PVRI), arterieller Sauerstoff-Partialdruck (paO_2) und die zentralvenöse Sauerstoffsättigung (SvO_2). Durch Division des gemessenen HZV durch die Körperoberfläche des Patienten, kann der CI bestimmt werden. Aus der Druckdifferenz des mPAP und des mittleren PAWP, dividiert durch das HZV, errechnet sich der pulmonale Gefäßwiderstand (PVR). Durch Multiplikation dieses Widerstandswertes mit dem Faktor 80 erhält man die Widerstandsgröße in $\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$. Unter PVRI wird der pulmonale Gefäßwiderstand-Index verstanden, der durch Division des PVR durch die Körperoberfläche berechnet wird.

2.2.4 Statistische Analyse

Alle erhobenen Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) (parametrische Daten) oder Median und Interquartilsabstand (IQR) (nichtparametrische Daten) angegeben.

Die Normalverteilung der Werte wurde mit Hilfe des D'Agostino and Pearson Omnibus Normality Test überprüft.

Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte für parametrische Daten mit Hilfe des ungepaarten t-Tests bzw. one-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Multiple

Comparison Test für den Vergleich von mehr als zwei Patientengruppen. Für nichtparametrische Daten wurde der Mann-Whitney-Test bzw. der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Multiple Comparison Test für den Vergleich von mehr als zwei Patientengruppen verwendet.

Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% entspricht.

Für die Korrelationsanalysen wurde für parametrische Daten der Pearson r Korrelationskoeffizient und für nichtparametrische Daten der Spearman r Korrelationskoeffizient benutzt.

Die Datenerfassung wurde mit Microsoft Excel, Version 2007 durchgeführt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit der Software GraphPad Prism, Version 5.03 und 6.0.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Gesamtkollektivs

3.1.1 Anzahl, Alter und Geschlechterverteilung

Insgesamt wurden 80 Patienten untersucht. Davon waren 39 Patienten an einer PAH erkrankt. 28 Patienten litten an einer CTEPH und 13 Patienten an einer PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus (im Folgenden vereinfacht als unklare PH bezeichnet). Die Kontrollgruppe bestand aus neun Personen. Das mittlere Alter aller Patienten lag bei $59,7 \pm 1,8$ Jahren und bei der Kontrollgruppe bei $45,6 \pm 3,7$ Jahren. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Alters der Patienten mit CTEPH bzw. unklarer PH und der Kontrollgruppe. Sowohl bei den Patienten als auch bei der Kontrollgruppe überwog das weibliche Geschlecht (Gesamt-PH: 62,5% vs. 37,5%; Kontrolle: 55,6% vs. 44,4%) (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Anzahl, Alter und Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe

| | Anzahl (n) | Alter | Geschlecht | |
|---------------|------------|---------------------|------------------|------------------|
| | | | weiblich (%) | männlich (%) |
| PAH | 39 | $55,0 \pm 2,9$ | 27 (69,2) | 12 (30,8) |
| CTEPH | 28 | $64,4 \pm 2,3^{**}$ | 17 (60,7) | 11 (39,3) |
| unklare PH | 13 | $63,5 \pm 4,4^*$ | 6 (46,2) | 7 (53,8) |
| Gesamt | 80 | $59,7 \pm 1,8$ | 50 (62,5) | 30 (37,5) |

Alter: Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, jeweilige Gruppe vs. Kontrollgruppe.

3.1.2 Medikation

Eine spezifische Monotherapie mit dem PDE₅ Sildenafil, einem ERA (Bosentan, Ambrisentan oder Sitaxsentan) oder einem Prostazyklinanalogon (Iloprostinal., Iloprost i.v. oder Treprostinil) erhielten zum Zeitpunkt der durchflusszytometrischen Bestimmung der EPC 32 der 80 Patienten (40,0%). Die verschiedenen Präparate einer Substanzgruppe wurden aufgrund der geringen Anzahl an Patienten, die das gleiche Präparat erhielten, zusammen betrachtet. Eine Kombinationstherapie dieser spezifischen Substanzgruppen wurde bei 41 der 80 Patienten (51,3%) angewandt. Nur

bei insgesamt sieben Patienten (8,8%) wurde keine PAH-spezifische Therapie durchgeführt. Statine, die nicht zu den spezifischen Medikamenten der PAH gezählt werden, erhielten 15 Patienten des Gesamtkollektivs (18,8%) (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Therapie der Patientengruppen

| | Keine spezifische Therapie | Monotherapie | | Kombinationstherapie | | Statine | |
|------------|----------------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|---------|-----------|
| | n (%) | n | Gesamt n (%) | n | Gesamt n (%) | n (%) | |
| PAH | 2 (5,1) | a | 9 | 14 (35,9) | a + b | 8 | 23 (60,0) |
| | | b | 4 | | a + c | 4 | |
| | | c | 1 | | b + c | 2 | |
| | | | | | a + b + c | 9 | |
| CTEPH | 2 (7,1) | a | 14 | 15 (53,6) | a + b | 6 | 11 (39,3) |
| | | b | 1 | | a + c | 3 | |
| | | c | | | b + c | | |
| | | | | | a + b + c | 2 | |
| unklare PH | 3 (23,1) | a | 2 | 3 (23,1) | a + b | 2 | 7 (53,8) |
| | | b | | | a + c | 3 | |
| | | c | 1 | | b + c | | |
| | | | | | a + b + c | 2 | |
| Gesamt-PH | 7 (8,8) | a | 25 | 32 (40,0) | a + b | 16 | 41 (51,3) |
| | | b | 5 | | a + c | 10 | |
| | | c | 2 | | b + c | 2 | |
| | | | | | a + b + c | 13 | |

a = PDE_{5i}

b = ERA

c = Prostazyklinanalogon

3.2 Relative Anzahl der Progenitorzellen

3.2.1 Gruppenvergleich der relativen Anzahl der EPC

Die CD34⁺-KDR⁺-Zellen (= EPC), angegeben als Prozentzahl aller selektierten lymphozytenartigen Zellen, wurden anhand des in Kapitel 2 beschriebenen Versuchsablaufs durchflusszytometrisch bestimmt. Tabelle 3.4 gibt die deskriptive Statistik der EPC-Prozentangaben der einzelnen Patientengruppen und des

Kontrollkollektivs wieder. Veranschaulicht werden diese Daten mit Hilfe von Box & Whiskers-Graphen in Abbildung 3.2.

Sowohl die Anzahl der EPC der Patientengruppe mit PAH als auch mit CTEPH waren signifikant höher als die EPC-Anzahl der Kontrollgruppe (PAH vs. Kontrolle: $p = 0,043$; CTEPH vs. Kontrolle: $p = 0,046$; jeweils Mann-Whitney-Test). Im Vergleich der relativen Anzahl der EPC zwischen der Patientengruppe mit unklarer PH und der Kontrollgruppe ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (unklare PH vs. Kontrolle: $p = 0,52$; Mann-Whitney-Test). In Bezug auf die relative Anzahl der EPC zwischen den einzelnen Patientengruppen konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied aufgezeigt werden (PAH vs. CTEPH: $p = 0,33$; PAH vs. unklare PH: $p = 0,14$; CTEPH vs. unklare PH: $p = 0,08$; jeweils Mann-Whitney-Test).

Tabelle 3.3: Deskriptive Statistik der relativen Anzahl der EPC der Kontroll- und Patientengruppen

| | Kontrolle | PAH | CTEPH | unklare PH |
|---------------------------|-----------|---------|---------|------------|
| n | 9 | 39 | 28 | 13 |
| Mittelwert [%] | 0,00051 | 0,00080 | 0,00115 | 0,00062 |
| SD [%] | 0,00072 | 0,00047 | 0,00092 | 0,00062 |
| SEM [%] | 0,00024 | 0,00008 | 0,00017 | 0,00017 |
| Median [%] | 0,0003 | 0,0009 | 0,00095 | 0,0005 |
| Minimum [%] | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Maximum [%] | 0,0023 | 0,0016 | 0,0028 | 0,0021 |
| 25% Perzentile [%] | 0,00005 | 0,0003 | 0,00033 | 0,00015 |
| 75% Perzentile [%] | 0,0006 | 0,0012 | 0,0021 | 0,0008 |

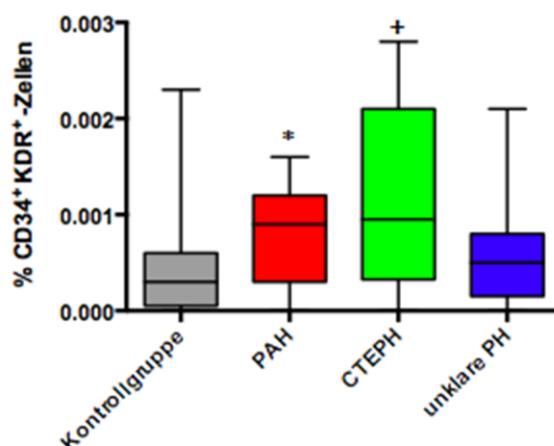


Abbildung 3.1: Relative Anzahl der EPC bei den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv

*p = 0,043 vs. Kontrollgruppe

+p = 0,046 vs. Kontrollgruppe

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Analog hierzu erfolgte der Vergleich der EPC-Anzahlen der Patientengruppen untereinander und im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Abzug der Zellen der KDR-Negativkontrolle. Tabelle 3.4 gibt die dazugehörige deskriptive Statistik der EPC-Prozentangaben wieder. In Abbildung 3.2 werden die Daten mittels Box & Whiskers-Graphen dargestellt.

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede der relativen Anzahl der EPC zwischen der Kontrollgruppe und den jeweiligen Patientengruppen feststellen (Kontrolle vs. PAH: p = 0,47; Kontrolle vs. CTEPH: p = 0,07; Kontrolle vs. unklare PH: p = 0,71; jeweils Mann-Whitney-Test). In Bezug auf die relative Anzahl der EPC zwischen den Patientengruppen hatten CTEPH-Patienten signifikant höhere EPC-Prozentangaben als Patienten mit unklarer PH (CTEPH vs. unklare PH: p = 0,034; ungepaarter t-Test). Ansonsten waren die Unterschiede in der relativen Anzahl der EPC zwischen den einzelnen Patientengruppen nicht signifikant ausgeprägt (PAH vs. CTEPH: p = 0,06; PAH vs. unklare PH: p = 0,25; jeweils Mann-Whitney-Test).

Tabelle 3.4: Deskriptive Statistik der relativen Anzahl der EPC der Kontroll- und Patientengruppen (ohne Abzug der Zellen der KDR-Negativkontrolle)

| | Kontrolle | PAH | CTEPH | unklare PH |
|---------------------------|-----------|---------|---------|------------|
| n | 9 | 39 | 28 | 13 |
| Mittelwert [%] | 0,0012 | 0,00123 | 0,00168 | 0,00102 |
| SD [%] | 0,00097 | 0,00070 | 0,00097 | 0,00070 |
| SEM [%] | 0,00032 | 0,00011 | 0,00018 | 0,00019 |
| Median [%] | 0,0008 | 0,0012 | 0,00135 | 0,0007 |
| Minimum [%] | 0,0003 | 0,0003 | 0,0002 | 0,0002 |
| Maximum [%] | 0,0033 | 0,0039 | 0,0040 | 0,0024 |
| 25% Perzentile [%] | 0,0006 | 0,0007 | 0,0011 | 0,00055 |
| 75% Perzentile [%] | 0,00175 | 0,0017 | 0,00235 | 0,00155 |

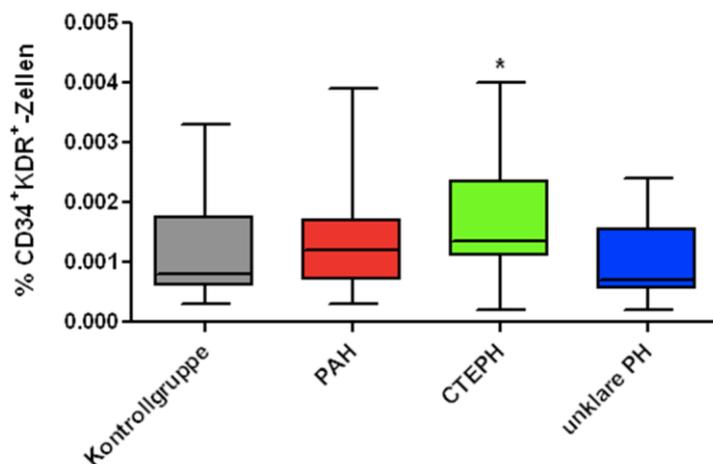


Abbildung 3.2: Relative Anzahl der EPC bei den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv (ohne Abzug der Zellen der KDR-Negativkontrolle)

*p = 0,034 vs. Patienten mit unklarer PH

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

3.2.2 Gruppenvergleich der relativen Anzahl der CD34⁺-Zellen

Tabelle 3.5 zeigt die Messergebnisse der CD34⁺-Zellen der Kontrollgruppe sowie der Patientenkollektive. Der Mittelwert der relativen Anzahl der CD34⁺-Zellen lag sowohl

3 Ergebnisse

bei der Kontrollgruppe als auch bei den PAH- und CTEPH-Patienten ungefähr bei 0,08%. Nur Patienten mit unklarer PH wiesen eine etwas höhere mittlere relative Anzahl an CD34⁺-Zellen auf (0,09385%). Die Messergebnisse werden in Abbildung 3.3 dargestellt. Es ließen sich daher auch keine signifikanten Unterschiede in der relativen Anzahl der CD34⁺-Zellen zwischen den einzelnen Gruppen und im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (Kontrolle vs. PAH: $p = 0,35$; Kontrolle vs. CTEPH: $p = 0,53$; Kontrolle vs. unklare PH: $p = 0,65$; PAH vs. CTEPH: $p = 0,72$; PAH vs. unklare PH: $p = 0,29$; CTEPH vs. unklare PH: $p = 0,35$; jeweils Mann-Whitney-Test, außer Kontrolle vs. unklare PH: ungepaarter t-Test).

Tabelle 3.5: Deskriptive Statistik der relativen Anzahl der CD34⁺ - Zellen der Kontroll- und Patientengruppen

| | Kontrolle | PAH | CTEPH | unklare PH |
|---------------------------|-----------|---------|---------|------------|
| n | 9 | 39 | 28 | 13 |
| Mittelwert [%] | 0,08333 | 0,07538 | 0,07786 | 0,09385 |
| SD [%] | 0,0400 | 0,05316 | 0,04693 | 0,05952 |
| SEM [%] | 0,01333 | 0,00851 | 0,00887 | 0,01651 |
| Median [%] | 0,0700 | 0,0600 | 0,0600 | 0,0800 |
| Minimum [%] | 0,0400 | 0,0100 | 0,0300 | 0,0200 |
| Maximum [%] | 0,1500 | 0,2700 | 0,2000 | 0,2200 |
| 25% Perzentile [%] | 0,0500 | 0,0400 | 0,0425 | 0,0550 |
| 75% Perzentile [%] | 0,1250 | 0,0900 | 0,09750 | 0,1400 |

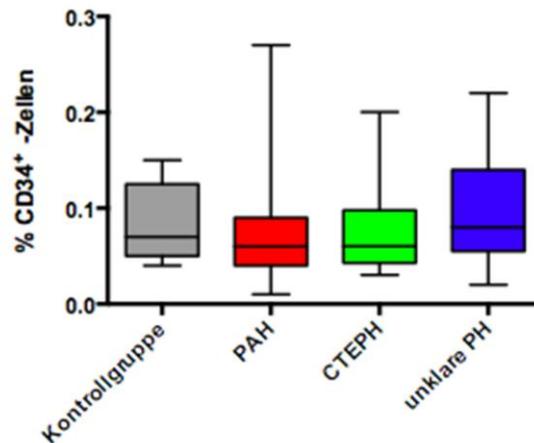


Abbildung 3.3: Relative Anzahl der CD34⁺ -Zellen bei den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

3.3 Korrelation relative Anzahl der EPC und zurückgelegte Gehstrecke im 6MWT

Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht über die zurückgelegten Gehstrecken im 6MWT und die NYHA-Stadien der einzelnen Patientengruppen. Im Gesamtkollektiv der Patienten wurde eine mittlere Gehstrecke im 6MWT von 365m erreicht. Die zurückgelegten Wegstrecken unterschieden sich in den Patientengruppen nicht statistisch signifikant (one-way ANOVA, siehe Abbildung 3.4).

Der Großteil der Patienten wies ein NYHA-Stadium I+II (40%) oder III (51,4%) auf. 8,6% der Patienten befanden sich zum Untersuchungszeitpunkt in einem NYHA-Stadium IV.

Um einen verlässlichen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des 6MWT und der EPC-Prozentzahlen darstellen zu können, wurden nur Daten, die in einem Zeitraum von drei Monaten vor oder nach der durchflusszytometrischen Untersuchung der EPC erhoben wurden, für die Auswertung berücksichtigt. Durchschnittlich wurde der 6MWT sechs Tage vor Analyse der EPC durchgeführt (-6 ± 2 Tage).

Tabelle 3.6: Zurückgelegte Gehstrecken im 6MWT und NYHA-Stadien der Patientengruppen

| | 6MWT [m] | Zeitabstand [Tage] | NYHA-Stadium | | |
|-------------------|----------------------|--------------------|--------------|-----------|----------|
| | | | I + II (%) | III (%) | IV (%) |
| PAH | 345 ± 22 (n = 35) | -7 ± 3 | 14 (40,0) | 17 (48,6) | 4 (11,4) |
| CTEPH | 416 ± 27 (n = 24) | -9 ± 4 | 12 (50,0) | 11 (45,8) | 1 (4,2) |
| unklare PH | 316 ± 42 (n = 11) | 3 ± 6 | 2 (18,2) | 8 (72,7) | 1 (9,1) |
| Gesamt | 365 ± 16 (n = 70) | -6 ± 2 | 28 (40,0) | 36 (51,4) | 6 (8,6) |

6MWT: Mittelwert ± SEM. Zeitabstand zw. Erhebung des 6MWT und Analyse der EPC: Mittelwert ± SEM.

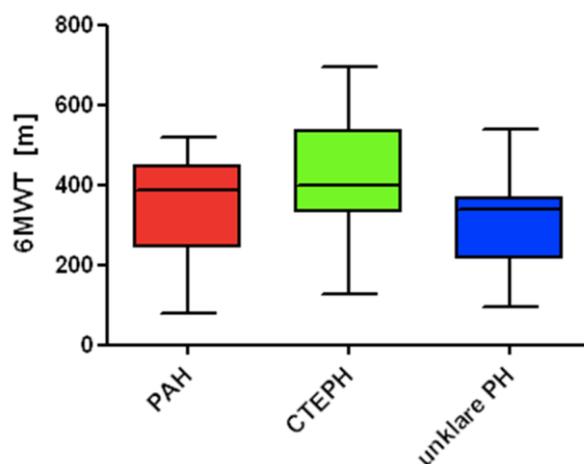


Abbildung 3.4: 6-Minuten-Gehstrecke der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Abbildung 3.5 zeigt die Korrelationsanalysen zwischen der relativen Anzahl der EPC bei Patienten mit PAH, CTEPH, unklarer PH und allen Patienten und der 6-Minuten-Gehstrecke. Weder bei den einzelnen Patientengruppen noch im Gesamtkollektiv konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen EPC-Prozentangabe und zurückgelegter Gehstrecke im 6MWT festgestellt werden (PAH: $p = 0,95$; CTEPH: $p = 0,33$; unklare PH: $p = 0,49$; Gesamtkollektiv: $p = 0,41$).

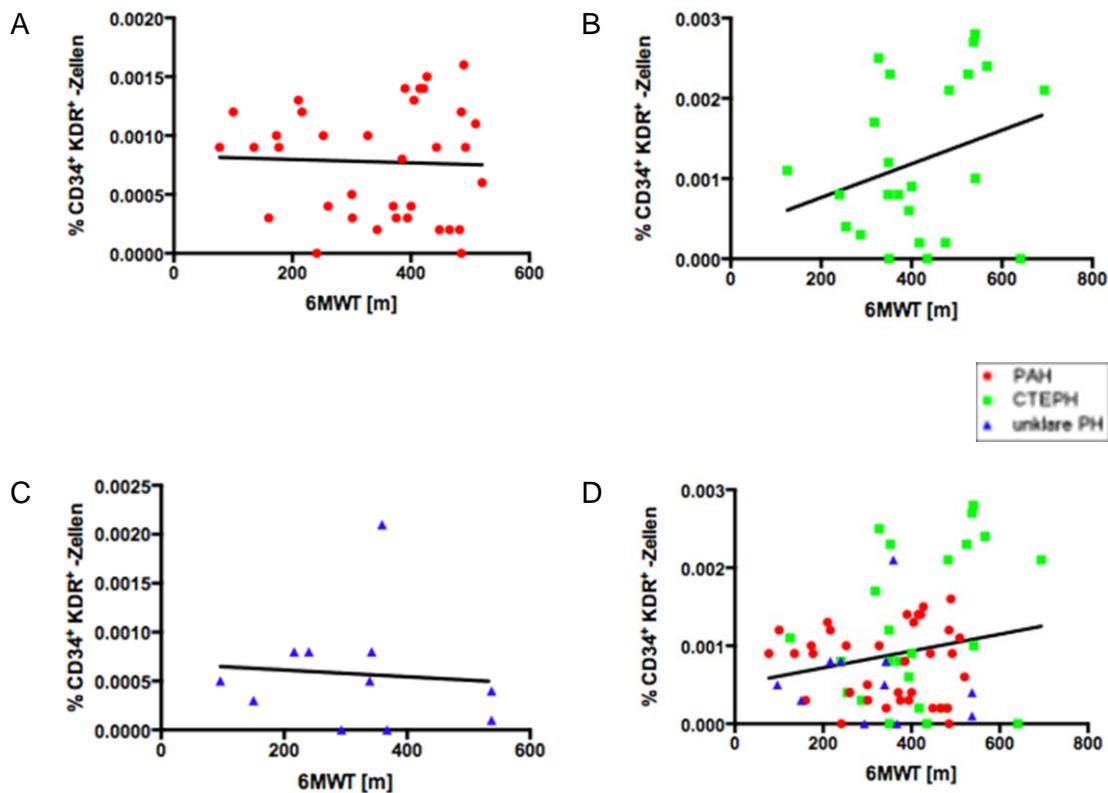


Abbildung 3.5: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. zurückgelegte Gehstrecke im 6MWT

A: n = 35; Spearman r = 0,01; p = 0,95; **B:** n = 24; Spearman r = 0,21; p = 0,33; **C:** n = 11; Spearman r = -0,22; p = 0,49; **D:** n = 70; Spearman r = 0,10; p = 0,41

3.4 Korrelation relative Anzahl der EPC und BNP-Spiegel

Tabelle 3.7 gibt eine Übersicht über die BNP-Spiegel der einzelnen Patientengruppen. Der Median des BNP-Wertes aller Patienten lag bei 104pg/ml. Die Spiegel dieses Laborparameters waren in den einzelnen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test, siehe Abbildung 3.6). Es wurden ebenfalls nur Werte, die in einem Zeitraum von drei Monaten vor oder nach Untersuchung der EPC erhoben wurden, für die Auswertung berücksichtigt. Im Mittel betrug der Zeitabstand zwischen Analyse der EPC und Bestimmung des BNP-Wertes einen Tag (-1 ± 3 Tage).

Tabelle 3.7: BNP-Spiegel der Patientengruppen

| | BNP [pg/ml] | | Zeitabstand [Tage] |
|-------------------|----------------------|----------|--------------------|
| PAH | 172 ± 27 (n = 35) | 127; 203 | -5 ± 4 |
| CTEPH | 204 ± 49 (n = 24) | 83; 268 | 0 ± 6 |
| unklare PH | 207 ± 53 (n = 11) | | 11 ± 8 |
| Gesamt | 188 ± 23 (n = 70) | 104; 225 | -1,0 ± 3 |

BNP: Mittelwert ± SEM, zusätzliche Angabe des Medians; IQR bei nichtparametrischen Daten. Zeitabstand zw. Erhebung des BNP-Spiegels und Analyse der EPC: Mittelwert ± SEM.

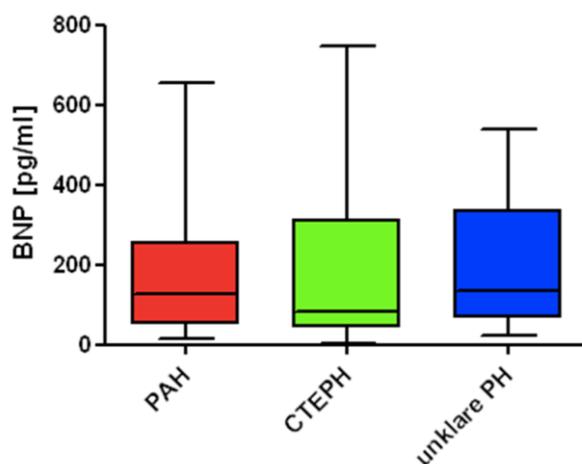


Abbildung 3.6: BNP-Spiegel der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

In Abbildung 3.7 ist die EPC-Prozentangabe gegen den BNP-Spiegel bei Patienten mit PAH, CTEPH, unklarer PH und allen Patienten aufgetragen. Bei den Patienten mit PAH und unklarer PH ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl an EPC und dem BNP-Wert (PAH: $p = 0,97$; unklare PH: $p = 0,97$). Bei den CTEPH-Patienten und im Gesamtkollektiv ließ sich hingegen ein statistisch signifikanter inverser Zusammenhang zwischen der EPC-Prozentangabe und dem

BNP-Wert nachweisen (CTEPH: Spearman $r = -0,46$; $p = 0,024$; Gesamtkollektiv: Spearman $r = -0,25$; $p = 0,037$).

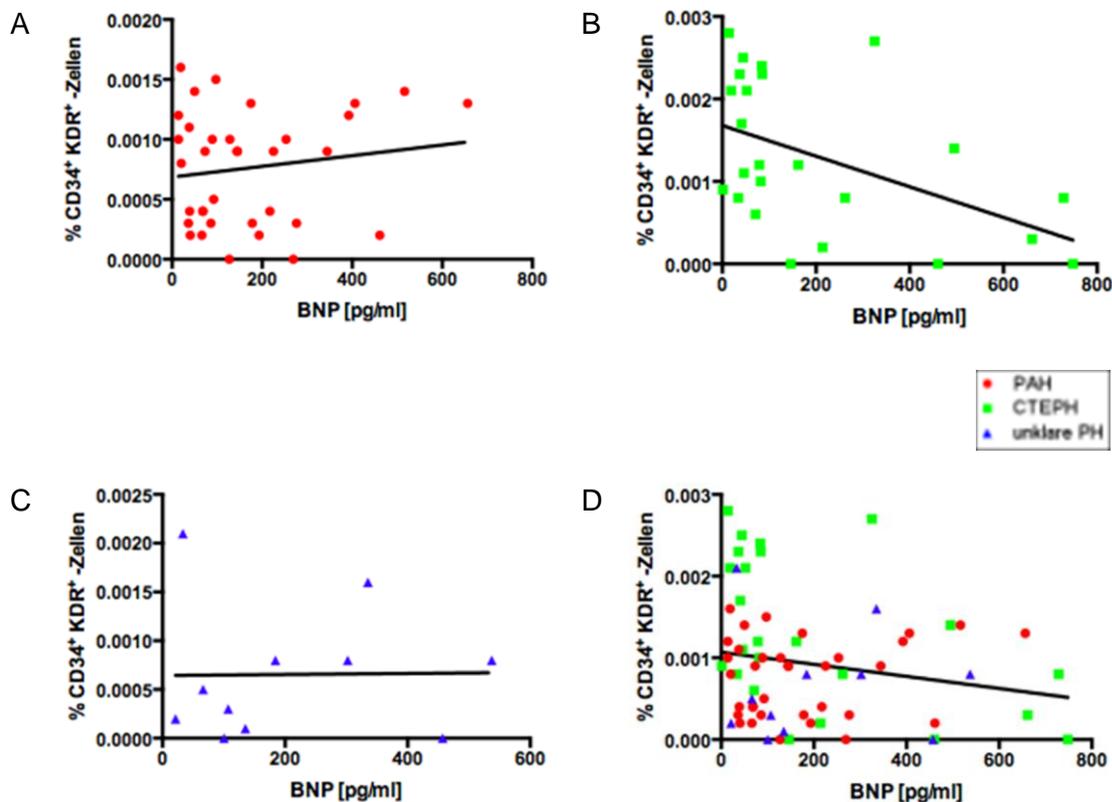


Abbildung 3.7: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. BNP-Spiegel

A: $n = 35$; Spearman $r = 0,01$; $p = 0,97$; **B:** $n = 25$; Spearman $r = -0,46$; $p = 0,024$; **C:** $n = 11$; Pearson $r = 0,01$; $p = 0,97$; **D:** $n = 70$; Spearman $r = -0,25$; $p = 0,037$

3.5 Korrelation relative Anzahl der EPC und hämodynamische Parameter

Tabelle 3.8 gibt eine Übersicht über die hämodynamischen Parameter, die mithilfe einer RHK-Untersuchung bei den Patienten erhoben wurden. Um einen verlässlichen Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl der EPC und den hämodynamischen Parametern festzustellen, wurden nur RHK-Untersuchungen berücksichtigt, die in einem Zeitraum von einem Jahr vor oder nach durchflusszytometrischer Bestimmung der EPC durchgeführt wurden. Im Mittel betrug der Zeitabstand von RHK-Untersuchung und Untersuchungszeitpunkt der EPC -22 ± 18 Tage.

Tabelle 3.8: Hämodynamische Parameter der Patientengruppen

| | mPAP [mmHg] | PAWP [mmHg] | CVP [mmHg] | | CI [l/min/m ²] |
|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------|----------------------------|
| PAH | 49 ± 2 (n = 33) | 7 ± 1 (n = 32) | 6 ± 1 (n = 33) | 6; 6 | 2,37 ± 0,09 (n = 33) |
| CTEPH | 46 ± 2 (n = 15) | 8 ± 1 (n = 15) | 6 ± 1 (n = 14) | | 2,40 ± 0,10 (n = 14) |
| unklare PH | 51 ± 5 (n = 10) | 8 ± 1 (n = 10) | 7 ± 2 (n = 10) | | 1,94 ± 0,19 (n = 10) |
| Gesamt-PH | 48 ± 2 (n = 58) | 8 ± 0 (n = 57) | 6 ± 1 (n = 57) | 6; 7 | 2,30 ± 0,07 (n = 57) |

| | PVRI [dyn·s·cm ⁻⁵ /m ²] | paO ₂ [mmHg] | SvO ₂ [%] | Zeitabstand [Tage] |
|-------------------|--|--|--|-----------------------|
| PAH | 1502 ± 98 (n = 33) | 72,7 ± 3,1 (n = 33) | 71,5; 22,8 65,8 ± 1,4 (n = 33) | -8 ± 24 |
| CTEPH | 1280 ± 109 (n = 15) | 71,3 ± 3,3 (n = 14) | 65,2 ± 1,9 67,0 ; 6,3 (n = 14) | -58 ± 40 |
| unklare PH | 1968 ± 299 (n = 10) | 79,0 ± 9,2 (n = 10) | 60,8 ± 2,7 (n = 10) | -12 ± 44 |
| Gesamt-PH | 1525 ± 85 (n = 58) | 1546; 840 73,5 ± 2,5 (n = 57) | 71,3; 21,9 64,7 ± 1,1 (n = 57) | -22 ± 18 |

Mittelwert ± SEM, zusätzliche Angabe des Medians; IQR bei nichtparametrischen Daten.
CVP: central venous pressure.

3.5.1 Korrelation relative Anzahl der EPC und mPAP

In Abbildung 3.8 sind die mPAP-Werte der einzelnen Patientengruppen wiedergegeben. Im Gesamtkollektiv wurde im Mittel ein mPAP von 48mmHg erreicht. Die Werte unterschieden sich in den Subkollektiven nicht signifikant ($p = 0,5$; one-way ANOVA).

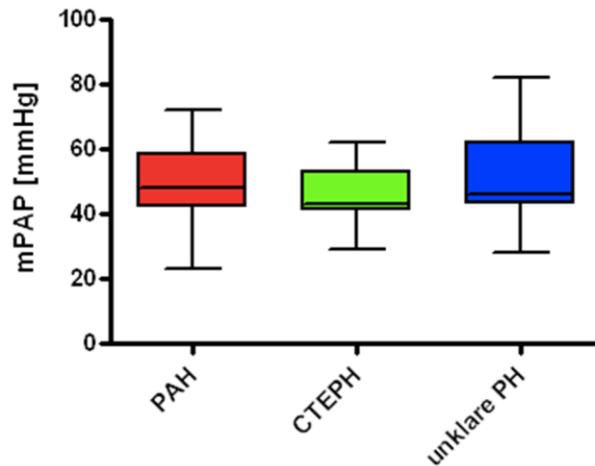


Abbildung 3.8: mPAP-Werte der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Abbildung 3.9 zeigt das Verhältnis zwischen der relativen Anzahl der EPC und dem mPAP bei Patienten mit PAH, CTEPH, unklarer PH und allen Patienten auf. Hier konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (PAH: $p = 0,70$; CTEPH: $p = 0,61$; unklare PH: $p = 0,46$; Gesamtkollektiv: $p = 0,50$).

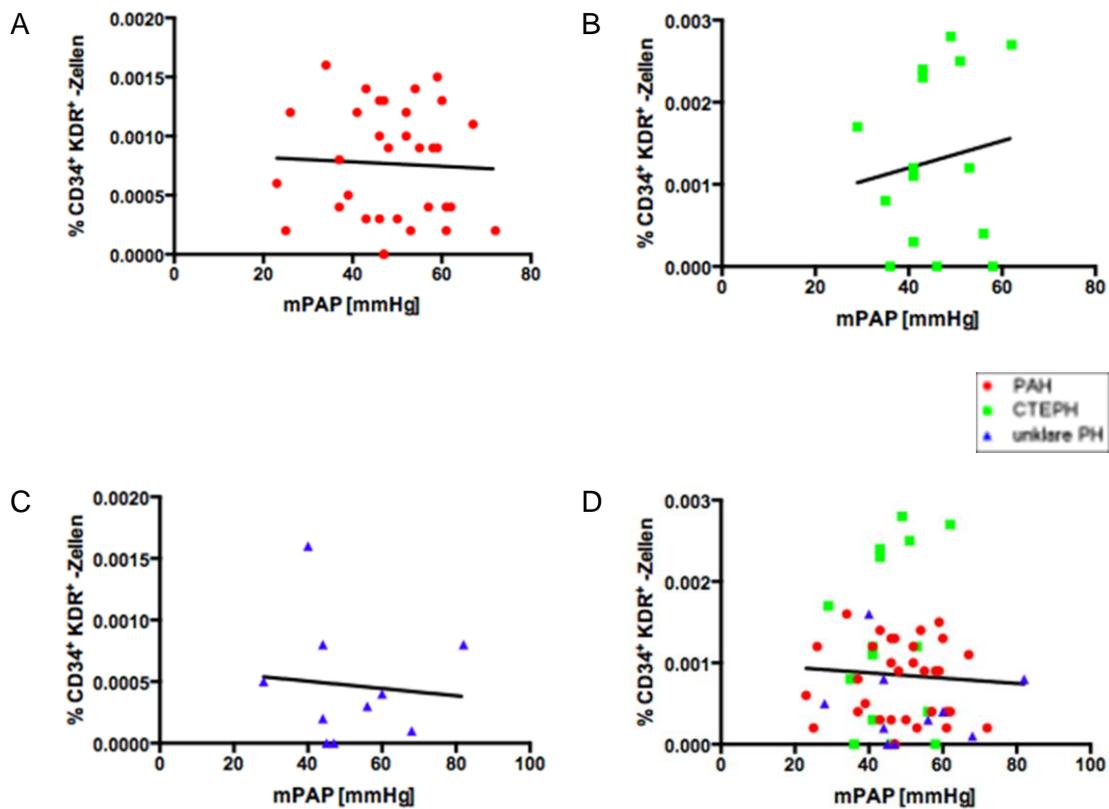


Abbildung 3.9: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. mPAP

A: n = 33; Spearman r = -0,07; p = 0,70; **B:** n = 15; Pearson r = 0,15; p = 0,61; **C:** n = 10; Spearman r = -0,25; p = 0,46; **D:** n = 58; Spearman r = -0,09; p = 0,50

3.5.2 Korrelation relative Anzahl der EPC und CI

Abbildung 3.10 gibt die Verteilung der Herzzeitvolumen-Indizes in den Subkollektiven wieder. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Subkollektiven (p = 0,09, Kruskal-Wallis-Test).

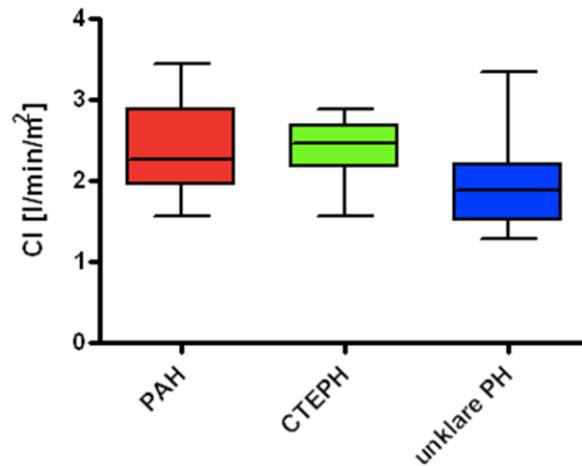


Abbildung 3.10: CI-Werte der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Abbildung 3.11 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen der EPC-Prozentangabe und dem Herzzeitvolumen-Index bei Patienten mit PAH, CTEPH, unklarer PH und allen Patienten. Es konnte keine signifikante Korrelation in den Patientengruppen aufgezeigt werden (PAH: $p = 0,20$; CTEPH: $p = 0,92$; unklare PH: $p = 0,24$). Lediglich im Gesamtkollektiv ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang nachweisen (Spearman $r = 0,27$; $p = 0,040$).

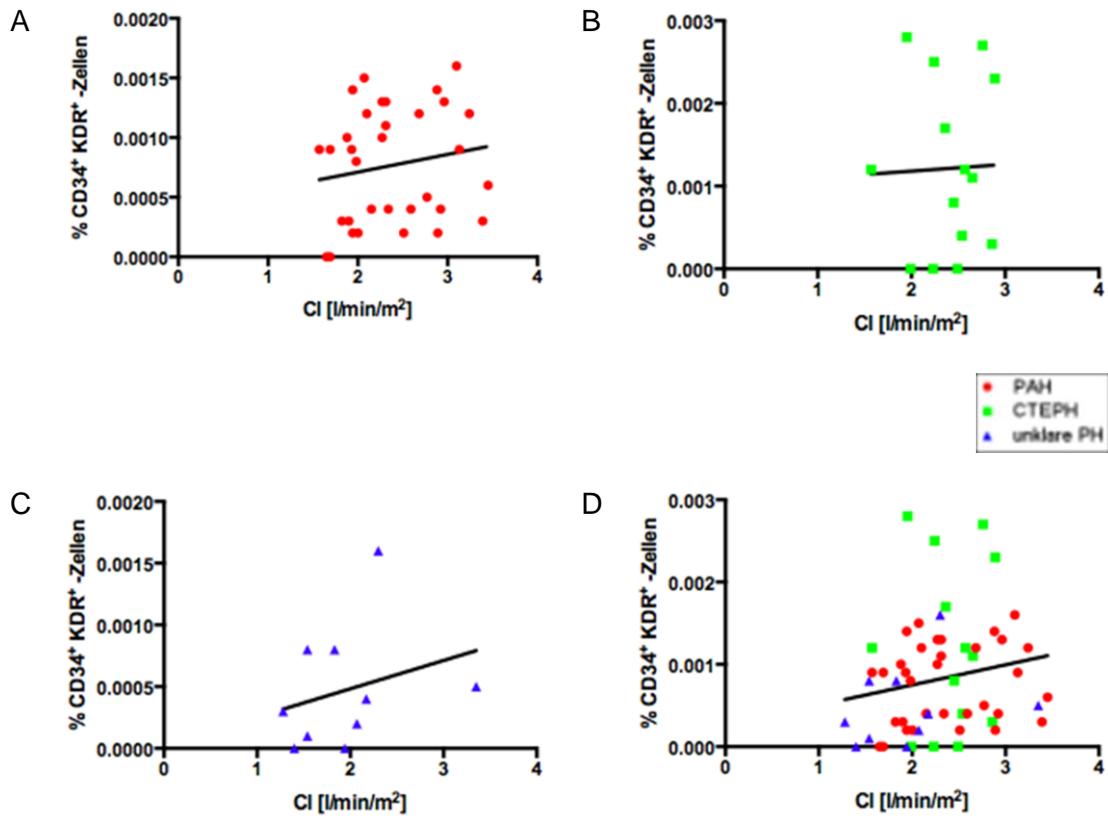


Abbildung 3.11: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. CI

A: n = 33; Spearman r = 0,23; p = 0,20; **B:** n = 14; Pearson r = 0,03; p = 0,92; **C:** n = 10; Spearman r = 0,41; p = 0,24; **D:** n = 57; Spearman r = 0,27; p = 0,040

3.5.3 Korrelation relative Anzahl der EPC und PVRI

In Abbildung 3.12 ist die Verteilung der PVRI-Werte der Subkollektive aufgeführt. Der pulmonale Gefäßwiderstand-Index unterschied sich signifikant zwischen den Patienten mit CTEPH und unklarer PH (p < 0,05, one-way-ANOVA).

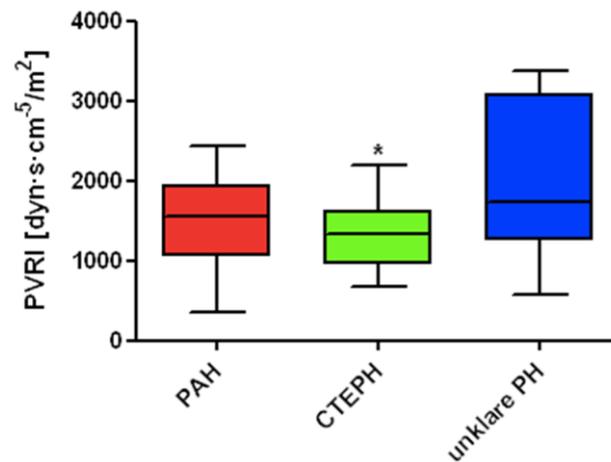


Abbildung 3.12: PVRI-Werte der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an. * $p < 0,05$ vs. Patienten mit unklarer PH.

Abbildung 3.13 gibt den Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl der EPC und dem PVRI bei Patienten mit PAH, CTEPH, unklarer PH und allen Patienten wieder. Es wurde weder bei Patienten mit PAH oder CTEPH noch bei Patienten mit unklarer PH ein Signifikanzniveau in der Korrelationsanalyse erreicht (PAH: $p = 0,15$; CTEPH: $p = 0,75$; unklare PH: $p = 0,98$). Lediglich im Gesamtkollektiv konnte eine statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen der EPC-Prozentangabe und dem PVRI festgestellt werden (Spearman $r = -0,28$; $p = 0,032$).

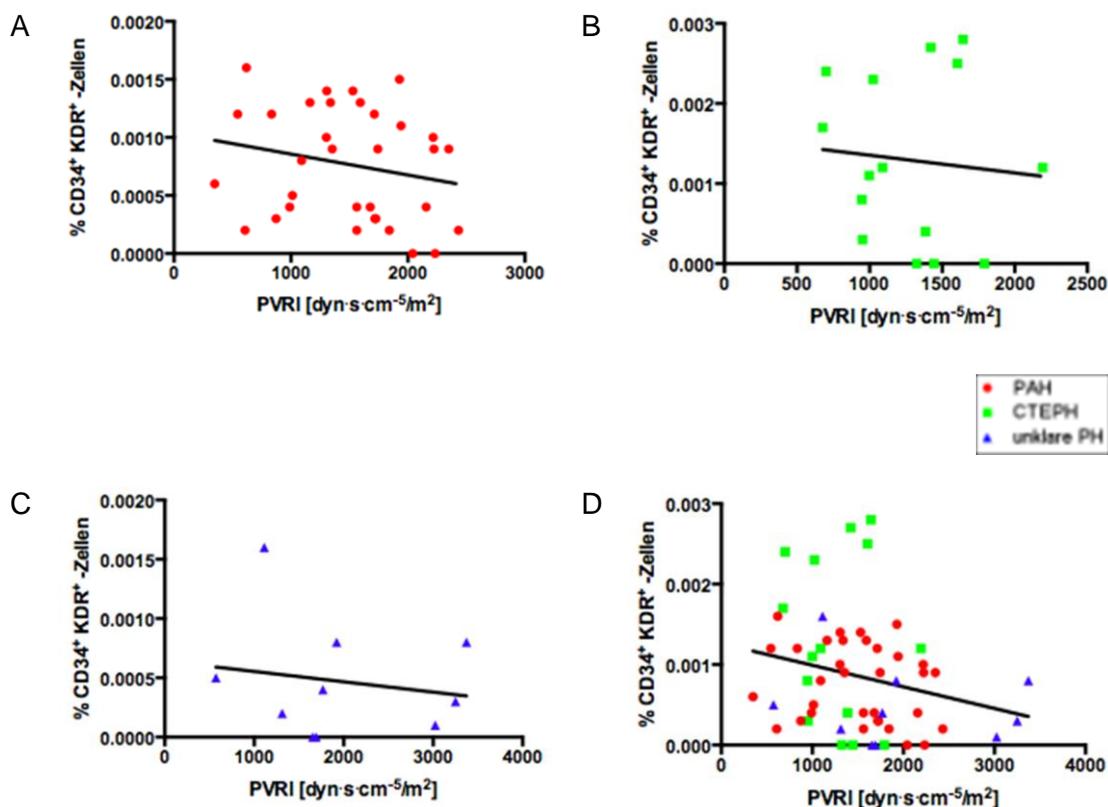


Abbildung 3.13: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. PVRI

A: n = 33; Spearman $r = -0,26$; $p = 0,15$; **B:** n = 15; Pearson $r = -0,09$; $p = 0,75$; **C:** n = 10; Spearman $r = -0,01$; $p = 0,98$; **D:** n = 58; Spearman $r = -0,28$; $p = 0,032$

3.6 Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung klinischer Parameter

Um Aussagen über einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an EPC und dem Verlauf der Erkrankung machen zu können, wurden die in den vorherigen Kapiteln untersuchten klinischen Parameter, anhand derer eine Schweregradbeurteilung der Erkrankung möglich ist, im Verlauf erneut erhoben. Dafür wurde ein Erfassungszeitraum von ein bis zweieinhalb Jahre nach durchflusszytometrischer Analyse der EPC festgelegt. Jedoch lagen nur bei einer begrenzten Anzahl an Patienten Verlaufsdaten vor. Um die Veränderung der klinischen Parameter unabhängig vom absoluten Ausgangswert betrachten zu können, wurde nicht die absolute Differenz zwischen Verlaufswert und Ausgangswert, sondern die prozentuale Veränderung (rel. Δ) verwendet.

3.6.1 Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT

Tabelle 3.9 gibt eine Übersicht über die Verlaufswerte und die prozentuale Veränderung der zurückgelegten Strecke im 6-Minuten-Gehtest aller Patientengruppen und des Gesamtkollektivs. Die mittlere im Verlauf zurückgelegte Gehstrecke in sechs Minuten betrug im nachuntersuchten Kollektiv ($n = 49$) 399m. Der Median der prozentualen Veränderung der Gehstrecken im 6MWT lag bei 1,30%. Der zeitliche Abstand des 6MWT-Verlaufswertes zum Untersuchungszeitpunkt der EPC konnte mit 743 Tagen angegeben werden.

Tabelle 3.9: Verlaufswert der Gehstrecke im 6MWT und prozentuale Veränderung der Gehstrecke im 6MWT der Patientengruppen

| | 6MWT [m] (Verlaufswert) | | rel. Δ 6MWT [%] | | Zeitabstand [Tage] |
|-------------------|----------------------------|----------|---------------------------|-------------|-----------------------|
| PAH | 358 \pm 23 (n = 25) | | - 0,82 \pm 3,41 | 0,00; 19,03 | 738 \pm 24 |
| CTEPH | 450 \pm 31 (n = 19) | | 4,96 \pm 5,71 | 1,30; 14,74 | 763 \pm 19 |
| unklare PH | 406 \pm 54 (n = 5) | 412; 198 | 12,80 \pm 13,00 | 5,96; 47,29 | 691 \pm 76 |
| Gesamt-PH | 399 \pm 19 (n = 49) | | 2,81 \pm 3,09 | 1,30; 18,30 | 743 \pm 16 |

Mittelwert \pm SEM, zusätzliche Angabe des Medians; IQR bei nichtparametrischen Daten.

Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 veranschaulichen die absoluten Verlaufswerte und die prozentuale Veränderung der zurückgelegten Wegstrecke im 6MWT der Subkollektive. Eine signifikante Veränderung ließ sich weder zwischen den Absolutwerten ($p = 0,23$), noch bei den prozentualen Veränderungen ($p = 0,45$; beides Kruskal-Wallis-Test) der einzelnen Gruppen aufzeigen.

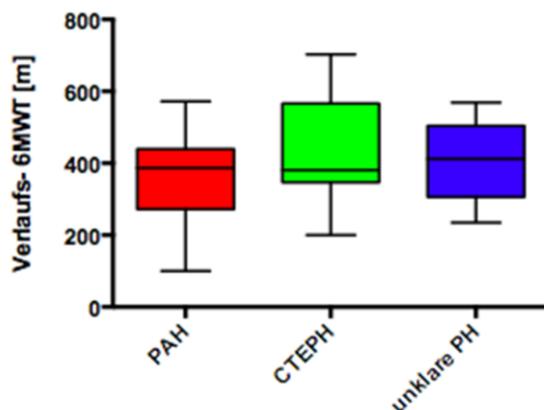


Abbildung 3.14: Verlaufswert der zurückgelegten Wegstrecke im 6MWT der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

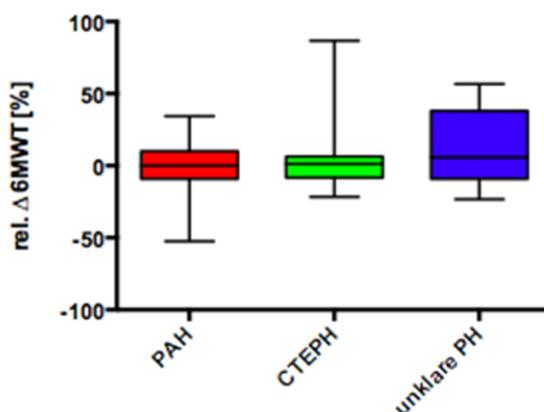


Abbildung 3.15: Prozentuale Veränderung der Gehstrecke im 6MWT der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Bei den Patienten mit PAH und CTEPH und im Gesamtkollektiv ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen der relativen Anzahl der EPC und der prozentualen Veränderung der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT feststellen (PAH: $p = 0,21$; CTEPH: $p = 0,054$; Gesamtkollektiv: $p = 0,83$) (siehe Abbildung 3.16). Aufgrund der geringen Fallzahl der Patienten mit unklarer PH ($n = 5$), bei denen Verlaufsdaten zum 6MWT vorlagen, wurde auf eine Korrelationsanalyse von EPC-Prozentangaben zur

zurückgelegten 6-Minuten-Gehstrecke verzichtet. Diese Werte flossen in die Analyse des Gesamtkollektivs mit ein.

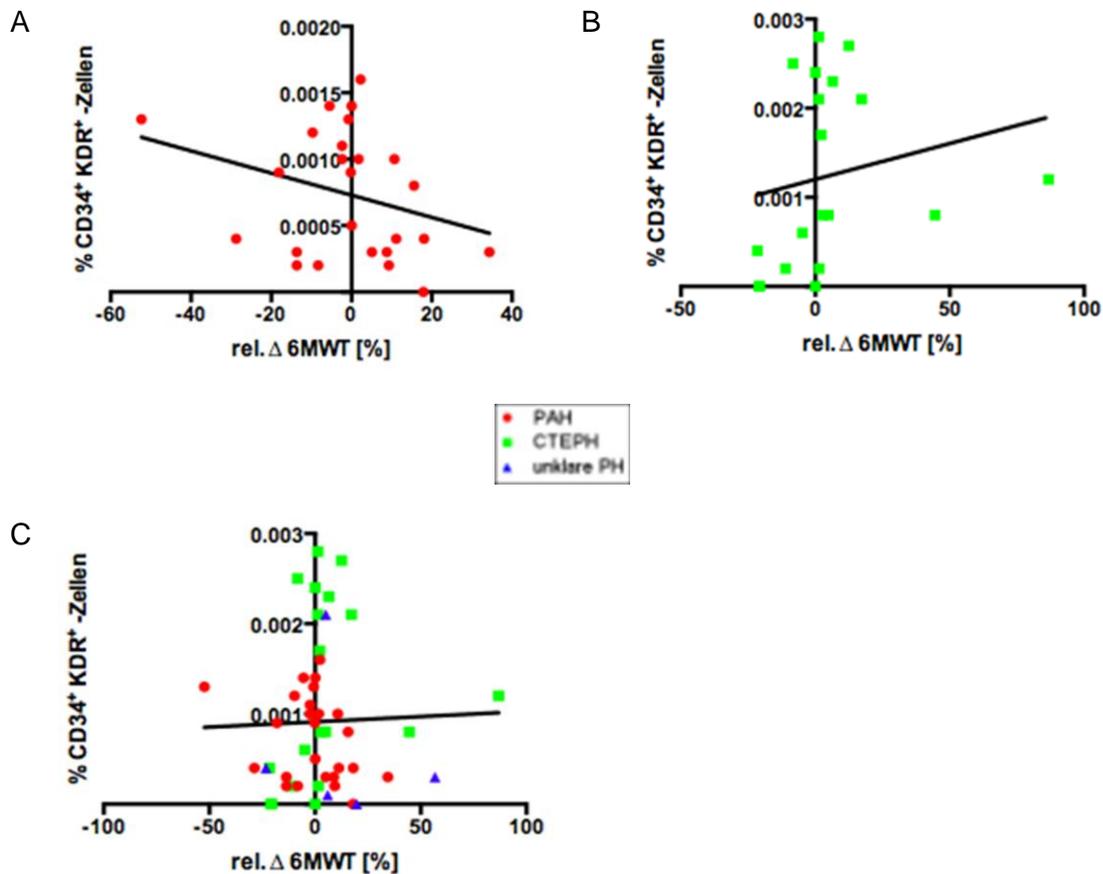


Abbildung 3.16: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung der Gehstrecke im 6MWT

A: n = 25; Spearman r = -0,26; p = 0,21; **B:** n = 19; Spearman r = 0,45; p = 0,054; **C:** n = 49; Pearson r = 0,03; p = 0,83

3.6.2 Korrelation relative Anzahl der EPC und absolute Veränderung des BNP-Spiegels

In Tabelle 3.10 sind die BNP-Werte im Verlauf und die absolute Veränderung dieses Parameters bei allen Patientengruppen wiedergegeben. Im Gegensatz zu dem 6MWT und den hämodynamischen Parametern wurde beim BNP-Wert aufgrund der Streubreite dieses Parameters die absolute Differenz errechnet. Der Median des Verlaufswertes lag im nachuntersuchten Kollektiv bei 197pg/ml. Der Median der absoluten Veränderung des BNP-Wertes betrug 48pg/ml im Gesamtkollektiv. Der

zeitliche Abstand des BNP-Verlaufswertes zum Untersuchungszeitpunkt der EPC konnte mit 711 Tagen im Mittel angegeben werden.

Tabelle 3.10: Verlaufswerte des BNP-Wertes und absolute Veränderung des BNP-Spiegels der einzelnen Patientengruppen

| | BNP [pg/ml] (Verlaufswert) | | absol. Δ BNP [pg/ml] | | Zeitabstand [Tage] |
|-------------------|---------------------------------------|----------|---------------------------------|---------|-------------------------------|
| PAH | 190 ± 48 (n = 24) | 122; 171 | 66 ± 27 | 39; 89 | 734 ± 17 |
| CTEPH | 120 ± 28 (n = 14) | 74; 125 | - 32 ± 43 | - 4; 93 | 724 ± 34 |
| unklare PH | 402 ± 199 (n = 6) | 153; 963 | 162 ± 118 | 23; 546 | 586 ± 78 |
| Gesamt-PH | 197 ± 39 (n = 44) | 110; 170 | 48 ± 27 | 15; 93 | 711 ± 19 |

Mittelwert ± SEM, zusätzliche Angabe des Medians; IQR bei nichtparametrischen Daten.

Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18 stellen die im Verlauf erhobenen BNP-Spiegel sowie die absolute Differenz dieses Parameters dar. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Patientengruppen (Verlaufs-BNP-Wert: $p = 0,73$; Δ BNP: $p = 0,18$; beides Kruskal-Wallis-Test).

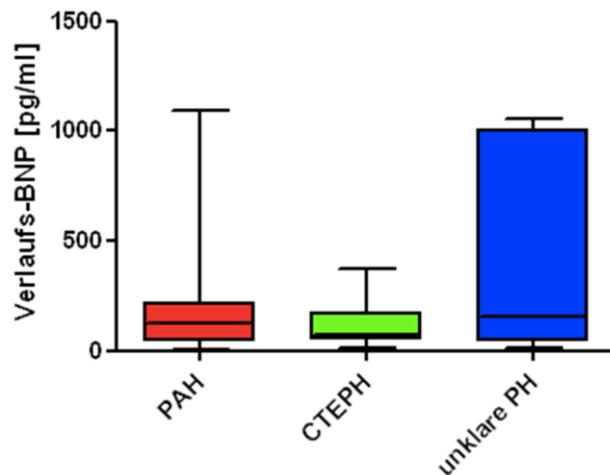


Abbildung 3.17: Verlaufswert des BNP-Spiegels der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

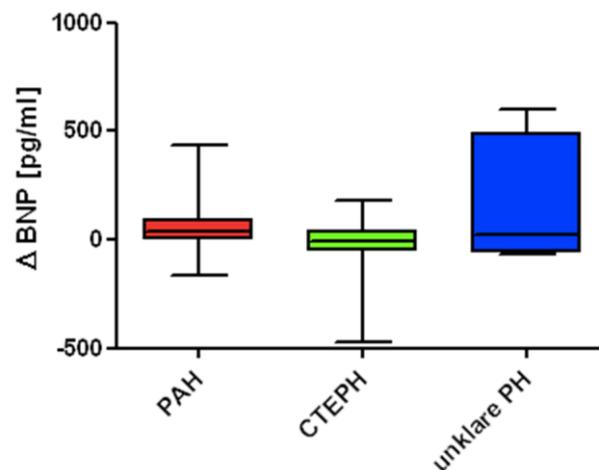


Abbildung 3.18: Absolute Differenz des BNP-Spiegels der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl der EPC und der absoluten Veränderung des BNP-Spiegels konnte in keinem der untersuchten Kollektive aufgezeigt werden (PAH: $p = 0,99$; CTEPH: $p = 0,69$; Gesamtkollektiv: $p = 0,42$) (siehe Abbildung 3.19). Analog zum vorherigen Kapitel wurde aufgrund der

niedrigen Fallzahl der Patienten mit unklarer PH (n = 6) auf eine Korrelationsanalyse dieser Gruppe verzichtet. Die Daten fließen in die Analyse des Gesamtkollektivs ein.

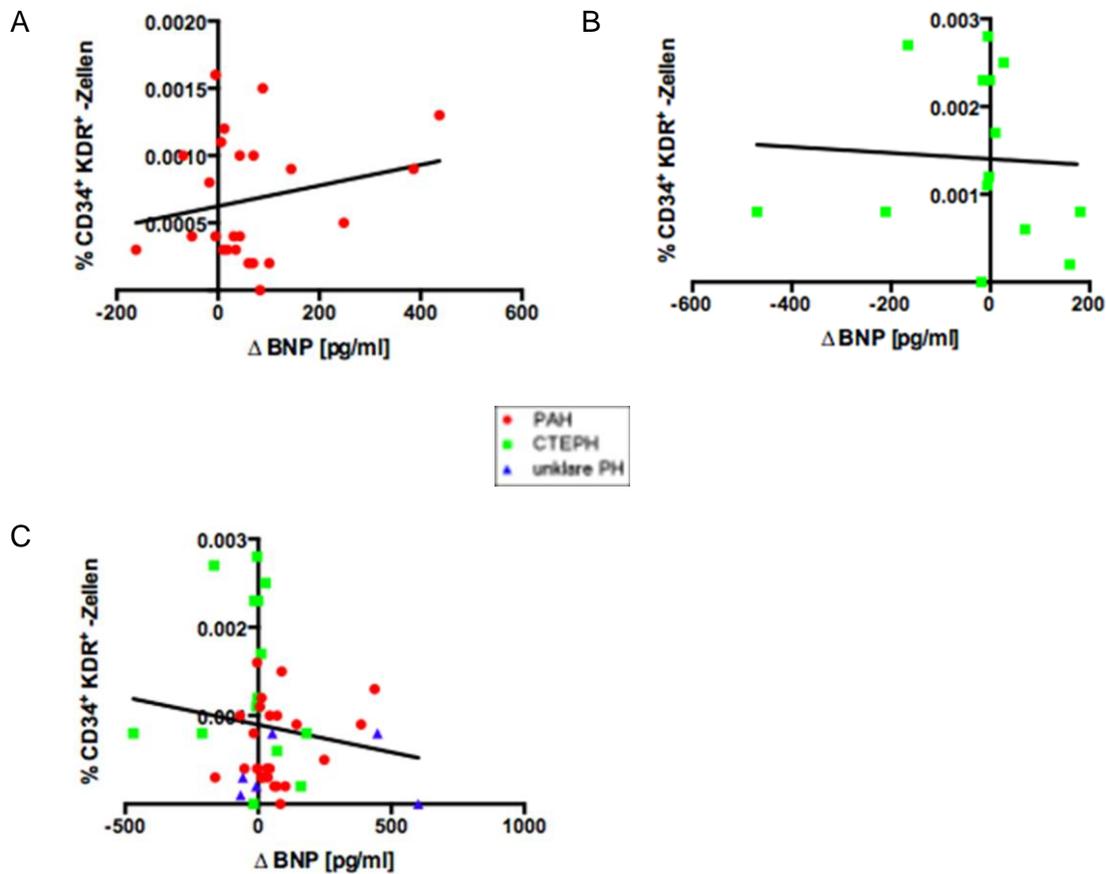


Abbildung 3.19: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. absolute Veränderung des BNP-Spiegels

A: n = 24; Spearman $r = 0,004$; $p = 0,99$; **B:** n = 14; Spearman $r = -0,11$; $p = 0,69$; **C:** n = 44; Spearman $r = -0,13$; $p = 0,42$

3.6.3 Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung des mPAP

Tabelle 3.11 gibt die mPAP-Werte im Verlauf und die prozentuale Veränderung dieses Parameters bei allen Patientengruppen wieder. Der mittlere Verlaufswert betrug in der nachuntersuchten Gesamtgruppe 50mmHg. Die prozentuale Veränderung des mPAP konnte mit 0,60% als Mittelwert im Gesamtkollektiv angegeben werden. Der zeitliche Abstand zwischen Erhebung der hämodynamischen Verlaufswerte mittels RHK-Untersuchung und Analyse der EPC betrug 641 Tage.

Tabelle 3.11: Verlaufswerte des mPAP und prozentuale Veränderung des mPAP der einzelnen Patientengruppen

| | mPAP [mmHg] (Verlaufswert) | rel. Δ mPAP [%] | | Zeitabstand [Tage] |
|-------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| PAH | 53 \pm 4 (n = 9) | 3,08 \pm 9,64 | | 642 \pm 63 |
| CTEPH | 49 \pm 11 (n = 5) | 48; 47 | 2,80 \pm 18,76 17,07; 70,07 | 667 \pm 93 |
| unklare PH | 41 \pm 7 (n = 2) | 41; 14 | -16,31 \pm 22,98 -16,31; 45,96 | 572 \pm 184 |
| Gesamt-PH | 50 \pm 4 (n =16) | 0,60 \pm 8,02 | | 641 \pm 47 |

Mittelwert \pm SEM, zusätzliche Angabe des Medians; IQR bei nichtparametrischen Daten.

Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21 veranschaulichen die Verteilung der erhobenen Verlaufs-mPAP-Werte sowie die prozentuale Veränderung dieses Parameters in den Subkollektiven. Es konnten keine signifikanten Unterschiede dieser Werte in den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Verlaufs-mPAP-Wert: $p = 0,54$; Δ mPAP: $p = 0,63$; beides Kruskal-Wallis-Test).

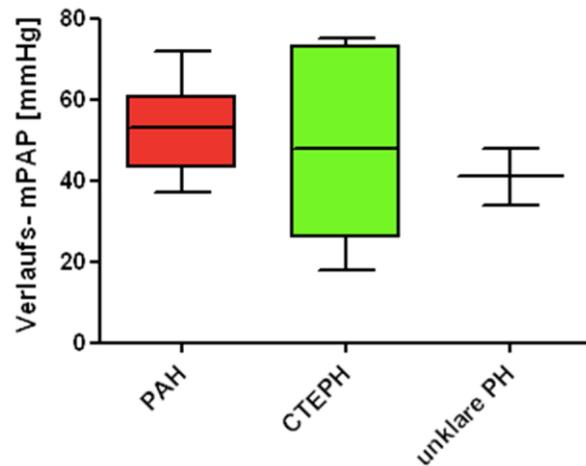


Abbildung 3.20: Verlaufswert des mPAP der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

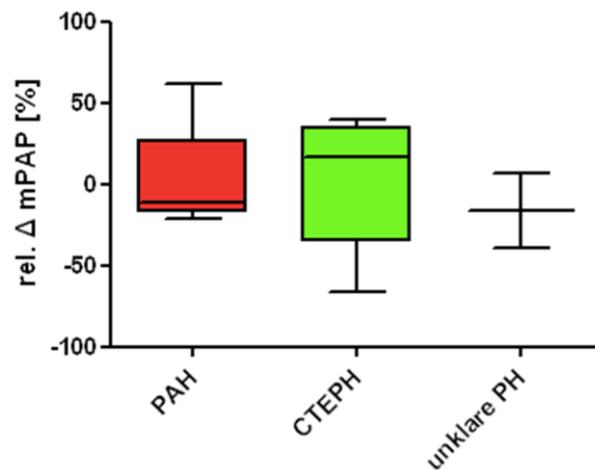


Abbildung 3.21: Prozentuale Veränderung des mPAP der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Es ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl der EPC und der prozentualen Veränderung des mPAP im Gesamtkollektiv nachweisen ($p = 0,79$) (siehe Abbildung 3.22). Aufgrund der geringen Patientenzahlen der einzelnen Gruppen wurden einzelne Korrelationsanalysen der relativen Anzahl der

EPC mit den hämodynamischen Parametern als nicht sinnvoll erachtet und daher nur eine Analyse des Gesamtkollektivs durchgeführt.

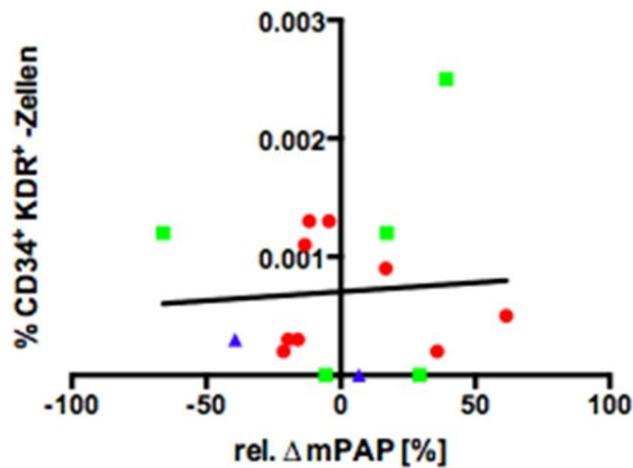


Abbildung 3.22: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung des mPAP bei allen Patienten

n = 16; Pearson r = 0,07; p = 0,79

3.6.4 Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung des CI

Tabelle 3.12 stellt die Verlaufswerte des Herzzeitvolumen-Indexes und die prozentuale Veränderung dieses Parameters bei allen Patientengruppen dar. Der CI-Wert konnte im Verlauf mit 2,25l/min/m² als Mittelwert bei allen Patienten, bei denen eine RHK-Untersuchung im Verlauf durchgeführt wurde, angegeben werden. Der Median der prozentualen Veränderung des Herzzeitvolumen-Indexes betrug - 4,69% im Gesamtkollektiv.

Tabelle 3.12: Verlaufswerte des CI und prozentuale Veränderung des CI der Patientengruppen

| | CI [l/min/m ²] (Verlaufswert) | | rel. Δ CI [%] | |
|-------------------|--|------------|---------------|---------------|
| PAH | 2,21 ± 0,16 (n = 8) | | -1,44 ± 5,82 | |
| CTEPH | 2,28 ± 0,10 (n = 5) | 2,26; 0,39 | 11,38 ± 14,08 | 4,46; 44,55 |
| unklare PH | 2,34 ± 0,71 (n = 2) | 2,34; 1,42 | 61,15 ± 77,13 | 61,15; 154,28 |
| Gesamt-PH | 2,25 ± 0,11 (n = 15) | | 11,18 ± 10,70 | -4,69; 33,27 |

Mittelwert ± SEM, zusätzliche Angabe des Medians; IQR bei nichtparametrischen Daten.

Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24 stellen den Verlaufswert und die prozentuale Veränderung des CI in den einzelnen Patientengruppen dar. Eine signifikante Veränderung ließ sich weder zwischen den Verlaufswerten ($p = 0,97$) noch bei den prozentualen Veränderungen dieses Parameters ($p = 0,78$; beides Kruskal-Wallis-Test) der einzelnen Gruppen aufzeigen.

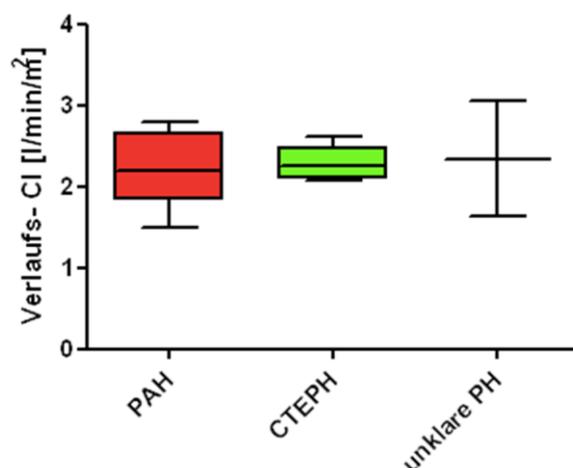


Abbildung 3.23: Verlaufswert des CI der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

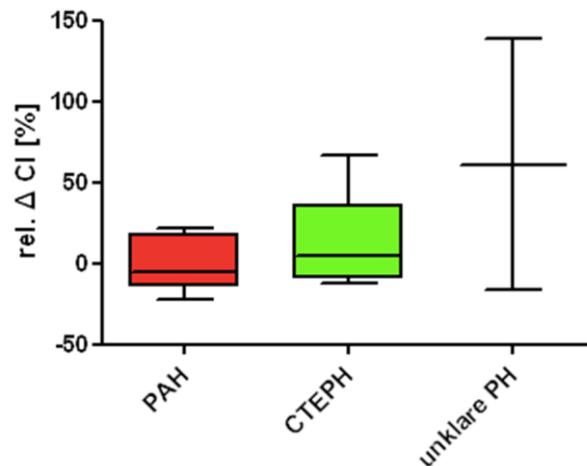


Abbildung 3.24: Prozentuale Veränderung des CI der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der relativen Anzahl der EPC mit der prozentualen Veränderung des Herzzeitvolumen-Indexes konnte im Gesamtkollektiv nicht aufgezeigt werden ($p = 0,75$) (siehe Abbildung 3.25).

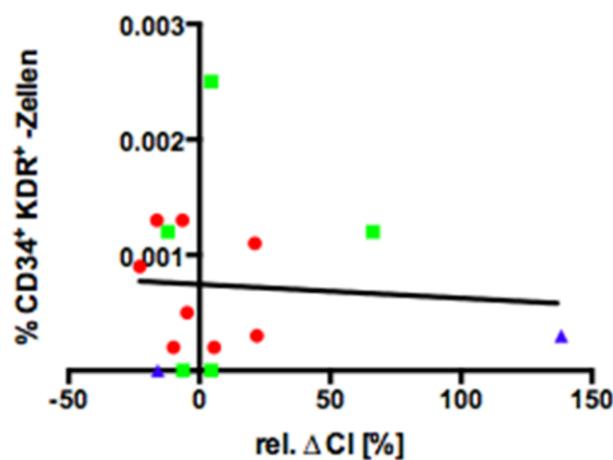


Abbildung 3.25: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung des CI bei allen Patienten

$n = 15$; Spearman $r = -0,08$; $p = 0,75$

3.6.5 Korrelation relative Anzahl der EPC und prozentuale Veränderung des PVRI

Tabelle 3.13 gibt eine Übersicht über die Verlaufswerte des PVRI und die prozentuale Veränderung dieses Parameters bei allen Patientengruppen. Der Mittelwert des PVRI-Wertes betrug im Verlauf $1544 \text{ dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}/\text{m}^2$ bei allen nachuntersuchten Patienten. Die mittlere prozentuale Veränderung dieses Parameters lag im Gesamtkollektiv bei $-1,89\%$.

Tabelle 3.13: Verlaufswerte des PVRI und prozentuale Veränderung des PVRI der Patientengruppen

| | PVRI [$\text{dyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}/\text{m}^2$] (Verlaufswert) | | rel. Δ PVRI [%] | |
|-------------------|--|------------|------------------------|---------------|
| PAH | 1712 \pm 214 (n = 9) | | 9,62 \pm 13,20 | |
| CTEPH | 1413 \pm 311 (n = 5) | 1237; 1261 | -5,55 \pm 19,92 | 8,99; 70,47 |
| unklare PH | 1199 \pm 517 (n = 2) | 1199; 1034 | -38,83 \pm 40,19 | -38,83; 80,83 |
| Gesamt-PH | 1544 \pm 163 (n = 15) | | -1,89 \pm 10,86 | |

Mittelwert \pm SEM, zusätzliche Angabe des Medians; IQR bei nichtparametrischen Daten.

In Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27 werden die Verteilung der erhobenen Verlauf-PVRI-Werte sowie die prozentuale Veränderung dieses Parameters in den Subkollektiven dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede dieser Werte in den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Verlaufs-PVRI-Wert: $p = 0,71$; Δ PVRI: $p = 0,53$; beides Kruskal-Wallis-Test).

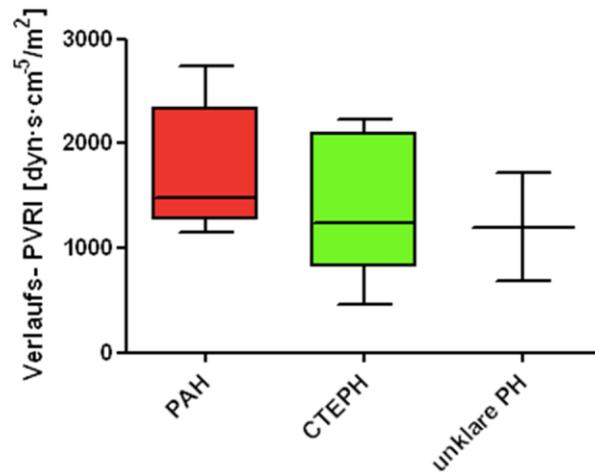


Abbildung 3.26: Verlaufswert des PVRI der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

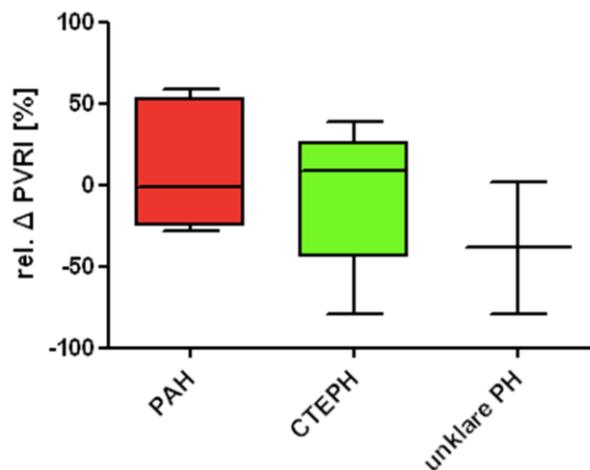


Abbildung 3.27: Prozentuale Veränderung des PVRI der einzelnen Patientengruppen

Box & Whiskers-Graphen zeigen das 25. und 75. Perzentile, den Median, Minimum- und Maximum-Wert an.

Abbildung 3.28 veranschaulicht das Verhältnis zwischen der relativen Anzahl der EPC zur prozentualen Veränderung des PVRI im Gesamtkollektiv. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der EPC-Prozentangabe und der prozentualen Veränderung des PVRI konnte nicht aufgezeigt werden ($p = 0,59$).

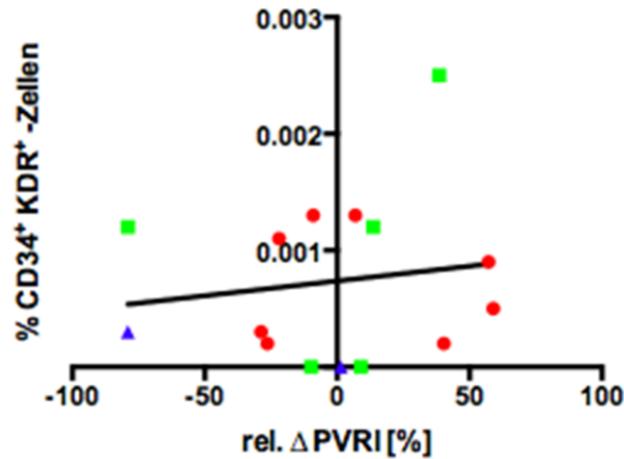


Abbildung 3.28: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung des PVRI bei allen Patienten

n = 15; Pearson r = 0,15; p = 0,59

3.7 Time to Clinical Worsening

Unter *Time to Clinical Worsening* wird der Zeitraum zwischen Analyse der EPC bis zum Eintreten eines der folgenden Ereignisse verstanden: eine Therapieerweiterung mit einem spezifischen Medikament, eine Hospitalisierung aufgrund einer Verschlechterung der PH, eine Transplantation der Lunge, Tod infolge der Erkrankung und eine PEA bei Patienten mit CTEPH. Es wurden Ereignisse, die bis zu 2 ³/₄ Jahre nach Analyse der EPC eintraten, für die Auswertung berücksichtigt. Die Angabe erfolgte in Wochen. Im Gesamtkollektiv trat bei 31 von insgesamt 80 Patienten eines der oben genannten Ereignisse ein, im Mittel nach 45 Wochen (siehe Tabelle 3.14).

Tabelle 3.14: Time to Clinical Worsening der Patientengruppen

| | <i>Time to Clinical Worsening [Wochen]</i> | n (%) |
|-------------------|--|---------|
| PAH | 58 ± 14 | 11 (28) |
| CTEPH | 42 ± 10 | 11 (39) |
| unklare PH | 38 ± 8 | 9 (69) |
| Gesamt-PH | 45 ± 7 | 31 (39) |

Mittelwert ± SEM.

Abbildung 3.29 stellt die Korrelationsanalysen der relativen Anzahl der EPC mit den Wochen bis zum Eintreten eines der oben genannten Ereignisse in den Subkollektiven und der Gesamtgruppe dar. Weder in den Untergruppen noch im Gesamtkollektiv korrelierte die EPC-Prozentangabe statistisch signifikant mit den Wochen bis zum Eintreten eines der oben beschriebenen Ereignisse (PAH: $p = 0,74$; CTEPH: $p = 0,09$; unklare PH: $p = 0,29$; Gesamtkollektiv: $p = 0,29$).

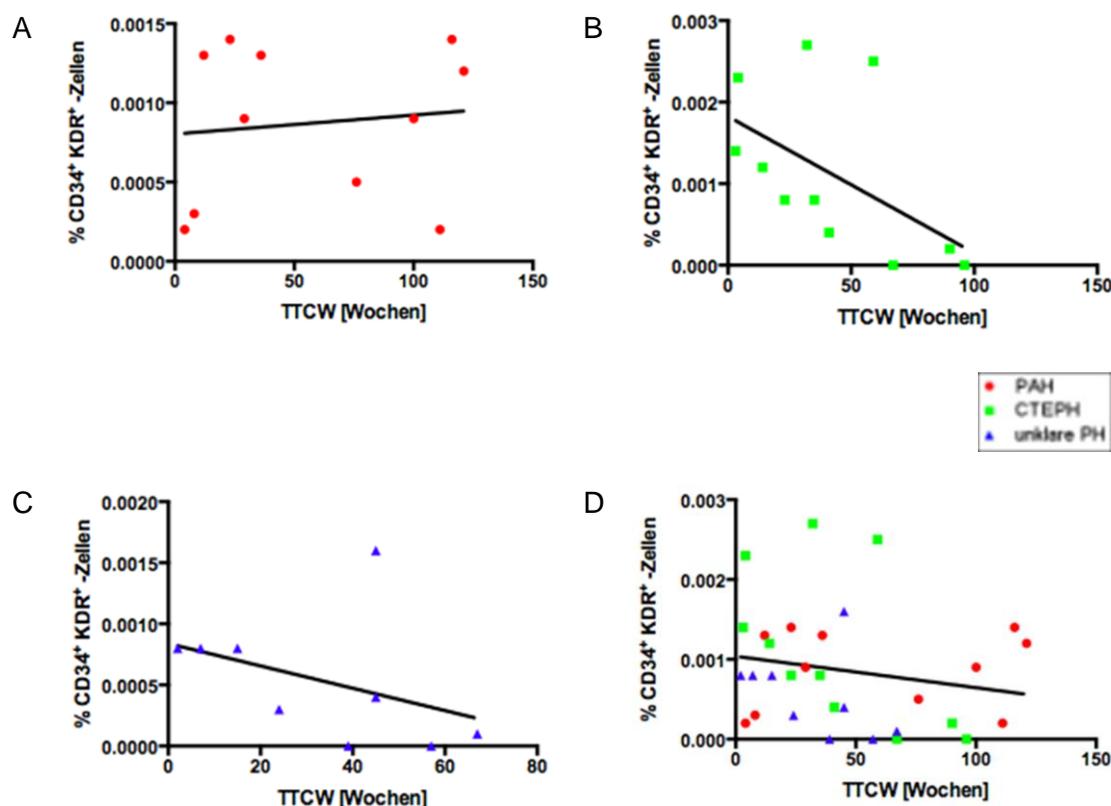


Abbildung 3.29: Time to Clinical Worsening der einzelnen Patientengruppen und des Gesamtkollektivs

TTCW = *Time to Clinical Worsening*

A: n = 11; Pearson r = 0,12; p = 0,74; **B:** n = 11; Pearson r = - 0,54; p = 0,09; **C:** n = 9; Pearson r = - 0,40; p = 0,29; **D:** n = 31; Pearson r = - 0,20; p = 0,29

3.8 Einfluss der Therapie auf die Anzahl an EPC

Tabelle 3.2 des Kapitels 3.1.2 gibt eine Übersicht über die spezifische Therapie der Patienten. Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurden nur sieben Patienten nicht mit einem PDE_{5i}, einem ERA oder einem Prostazyklinanalogon in Mono- oder Kombinationstherapie behandelt. Daher war eine Gegenüberstellung der relativen Anzahl an EPC der Patienten mit und ohne Einnahme eines PAH-spezifischen Medikamentes nicht möglich. Die relative Anzahl der EPC unterschied sich zwischen Patienten mit und ohne Einnahme eines Statins nicht signifikant (p = 0,60; Mann-Whitney-Test; siehe Abbildung 3.30).

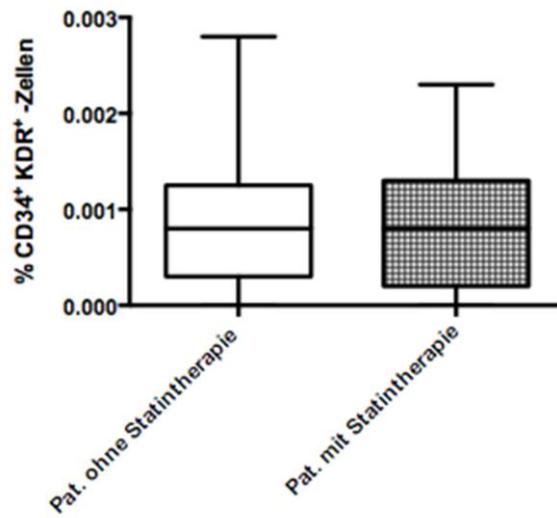


Abbildung 3.30: Relative Anzahl der EPC von Patienten mit und ohne Statineinnahme im Gesamtkollektiv

Patienten ohne Statine (n = 65) vs. Patienten mit Statine (n = 15): p = 0,60

4 Diskussion

4.1 Zirkulierende EPC und ihre Zellmarker

EPC sind eine Zellpopulation, die erstmalig von *Asahara et al.* im Jahre 1997 beschrieben wurde (Asahara et al. 1997). Es handelt sich dabei um die bis heute am meisten untersuchte Subpopulation der Vorläuferzellen (Yeager et al. 2011). EPC spielen eine Rolle in der physiologischen, aber auch pathologischen Angiogenese und sind an der endothelialen Homöostase beteiligt. Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen können EPC als Reaktion auf Stimuli, wie Gewebischämie oder Gefäßschäden, aus dem Knochenmark in die Zirkulation mobilisiert werden (Fadini et al. 2010). Zu dieser heterogenen Zellpopulation werden zirkulierende angiogene Zellen gezählt, die das Blutgefäßwachstum durch Sekretion von Wachstumsfaktoren unterstützen können. Dabei handelt es sich um die sogenannte frühe Fraktion der EPC. Zu der späten Fraktion der EPC (*Late Outgrowth EPC*) werden Zellen, die sich durch ein hohes Proliferationspotential auszeichnen, gerechnet (Hur et al. 2004). Bis heute gibt es keine einheitliche Definition dieser heterogenen Zellpopulation, da keine spezifischen Marker für EPC existieren. Die angiogenen Zellen, die sogenannte frühe Fraktion der EPC, exprimieren hämatopoetische Stammzellmarker wie CD34, CD133 und CD117, sowie den Leukozytenmarker CD45 und den Monozytenmarker CD14. Die späte Fraktion der EPC exprimiert vermehrt Endothelmarker wie KDR/VEGF R2 und *Vascular Endothel-Cadherin* (Liew et al. 2006), (Toshner und Morrell 2010). Zur Beurteilung der EPC kann die Zellkultur und die Durchflusszytometrie verwendet werden. Die Zellkultur eignet sich zur Funktionsanalyse der EPC. Mithilfe der Durchflusszytometrie ist eine quantitative Bestimmung der EPC möglich. Jedoch existiert aktuell kein spezifischer Marker zur Identifikation der EPC (Yang et al. 2013). In bisherigen Studien wurden die Marker CD34, CD133 und KDR zur Bestimmung der EPC verwendet. Nach aktuellem Kenntnisstand sollten jedoch bevorzugt die für EPC-charakteristischen Marker CD34 und KDR angewandt werden (Fadini et al. 2010). *Timmermans et al.* konnten aufzeigen, dass die späte Zellfraktion der EPC sich nicht von CD133-positiven Zellen ableitet (Timmermans et al. 2007). CD34 und KDR wurden auch in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis der EPC im peripheren Blut der Patienten mit PH genutzt. Zu beachten ist, dass die Oberflächenmarker CD34 und KDR auch von reifen

Endothelzellen exprimiert werden können. Da jedoch nur 1-2% dieser Zellen CD34-positiv sind und sich im peripheren Blut nur 1-10 reife Endothelzellen pro ml finden, kann deren Beteiligung an CD34⁺KDR⁺-Zellen nahezu vernachlässigt werden (Fadini et al. 2006). *Khan et al.* geben den Anteil zirkulierender Endothelzellen und EPC an mononukleären Zellen im normalen peripheren Blut mit 0,0001% bis 0,01% an (Khan et al. 2005). Die in dieser Arbeit detektierten Prozentzahlen der EPC lagen bei 0,0% bis 0,0028% der totalen mononukleären Zellfraktion. Mit 0,0009% im Mittel befanden sie sich in diesem Rahmen, wenngleich auch eher im unteren Bereich. Aufgrund dieser sehr seltenen Fraktion der mononukleären Zellen, sollten zur Identifikation einer adäquaten Anzahl an endothelialen Vorläuferzellen mindestens 500.000 bis eine Millionen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden (Khan et al. 2005). In dieser Arbeit wurden durchschnittlich 750.000 Events in der FACS-Analyse aufgezeichnet.

Es wurde bereits belegt, dass EPC eine Rolle in angiogenen Prozessen des Myokards und des Tumorwachstums spielen (Urbich und Dimmeler 2004). Erste Untersuchungen zur Beteiligung endogener Vorläuferzellen an Prozessen der PH wurden 2004 veröffentlicht. So konnten im Tiermodell in den für PH typisch umgebauten Pulmonalgefäßen Zellen nachgewiesen werden, die aus dem Knochenmark stammten (Davie et al. 2004), (Hayashida et al. 2005). Weiterhin gelang der Nachweis von Zellen, die Stammzellantigene für EPC exprimieren, in plexiformen und obliterierenden Läsionen explantierter Lungen von Patienten mit PAH (Majka et al. 2008), (Toshner et al. 2009b). Die genaue Rolle der EPC in der Pathogenese der PH konnte jedoch bis heute nicht geklärt werden (Fadini et al. 2010).

4.2 Anzahl der EPC bei Patienten mit PH

Hill et al. zeigten, dass bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen die Anzahl zirkulierender EPC vermindert ist (Hill et al. 2003). Die bisher über die Anzahl der EPC bei PH veröffentlichten Daten sind allerdings kontrovers. Im Tiermodell der hypoxisch-induzierten PH konnte eine erhöhte Anzahl zirkulierender, aus dem Knochenmark stammender EPC registriert werden (Sato et al. 2006), (Marsboom et al. 2008). *Asosingh et al.* bestätigten diese Angaben in einer Studie bei Patienten mit PAH erstmalig. Sie konnten erhöhte Zellzahlen zirkulierender CD34⁺CD133⁺-Zellen bei Patienten mit IPAH im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe nachweisen. Bei Patienten mit sekundärer PH ließen sich keine Unterschiede in den Prozentangaben der CD34⁺CD133⁺-Zellen im Vergleich zur

Kontrollgruppe feststellen (Asosingh et al. 2008). Aufgrund der fehlenden Verwendung des Zellmarkers KDR kann allerdings nicht sicher gesagt werden, dass es sich bei den detektierten Zellen um EPC handelt, da auch andere, vor allem hämatopoetische, Vorläuferzellen die Oberflächenmarker CD34 und CD133 aufweisen (Fadini et al. 2010). In einer weiteren in 2009 veröffentlichten Studie von *Toshner et al.* konnte durch zwei separate Messmethoden eine erhöhte Anzahl an CD133⁺CD34⁺KDR⁺-Zellen und CD133⁺KDR⁺-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit IPAH und sekundärer PAH im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv nachgewiesen werden (Toshner et al. 2009b). Gegensätzlich dazu publizierten *Junhui et al.* 2007 eine Studie, nach der Patienten mit IPAH eine verminderte Anzahl an zirkulierenden CD133⁺KDR⁺-Zellen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe aufwiesen (Junhui et al. 2008). Weiterhin konnten *Diller et al.* in einer in 2008 veröffentlichten Studie aufzeigen, dass bei Patienten mit IPAH und Eisenmenger-Syndrom die Prozentzahlen von EPC, hier definiert als CD34⁺KDR⁺-Zellen und CD133⁺CD34⁺KDR⁺-Zellen, im peripheren Blut im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermindert sind. Die niedrigste Prozentangabe an zirkulierenden EPC konnte bei Eisenmenger-Patienten mit Down-Syndrom festgestellt werden (Diller et al. 2008). In einer Studie bei Patienten mit obstruktiven und restriktiven Lungenerkrankungen wiesen Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose mit assoziierter PH signifikant niedrigere Level an zirkulierenden CD34⁺CD133⁺KDR⁺-Zellen im Vergleich zu Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose ohne assoziierte PH auf (Fadini et al. 2006), (Fadini et al. 2010).

Vor dem Hintergrund dieser widersprüchlichen Angaben zur Anzahl der EPC bei Patienten mit PH wurde in dieser Arbeit erneut mithilfe einer geeigneten Methode die Anzahl an EPC, definiert als CD34⁺KDR⁺-Zellen, von Patienten mit PH unterschiedlicher Ätiologie bestimmt und diese mit einem Kontrollkollektiv verglichen. Es wurden Patienten mit PAH, CTEPH und PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus (im Folgenden vereinfacht als unklare PH bezeichnet) berücksichtigt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Toshner et al.* und *Asosingh et al.*, ließen sich in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit PAH statistisch signifikant erhöhte Level an EPC im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv nachweisen ($p = 0,043$; Mann-Whitney-Test). Auch zeigten Patienten mit CTEPH im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an EPC auf ($p = 0,046$; Mann-Whitney-Test). Gemäß der aktuellen Studienlage gibt es Hinweise, dass endotheliale Progenitorzellen auch in der Pathogenese der CTEPH eine Rolle spielen

(Yao et al. 2009). Eine Studie, in der die Anzahl an EPC bei Patienten mit CTEPH bereits untersucht wurde, ist die von *Smadja et al.* (Smajda et al. 2010). Es konnte jedoch, im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, kein Unterschied in der Anzahl an EPC, definiert als CD34⁺CD133⁺-Zellen, sowohl bei Patienten mit CTEPH als auch PAH, verglichen mit einem Kontrollkollektiv, nachgewiesen werden. Hier muss jedoch, wie bereits weiter oben erwähnt, bedacht werden, dass es sich bei den detektierten Zellen nicht sicher um EPC handelt (fehlende Verwendung des Zellmarkers KDR).

Im Vergleich der relativen Anzahl an EPC (CD34⁺KDR⁺-Zellen) der Patienten mit unklarer PH und des Kontrollkollektivs ergab sich in der vorliegenden Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,52$; Mann-Whitney-Test). Dies entspricht der Publikation von *Asosingh et al.*, in der sich ebenfalls bei Patienten mit sekundärer PH im Vergleich zu einer Kontrollgruppe keine Differenz in der Anzahl an EPC (CD34⁺CD133⁺-Zellen) feststellen ließ (Asosingh et al. 2008). Aussagen zu dieser Patientengruppe sollten jedoch aufgrund ihrer zum Teil unklaren Ätiologie und heterogenen Pathomechanismen mit Vorsicht getroffen werden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Smadja et al.* ließen sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich der EPC-Anzahl der Patientengruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede nachweisen (Smadja et al. 2010).

Zur Reduktion einer falsch erhöhten Zellzahl durch unspezifische Bindungen wurden bei den hier vorgestellten EPC-Anzahlen die Zellen der KDR-Negativkontrolle abgezogen. Hierdurch wurde eine fast um den Faktor 10 reduzierte Zellzahl bei der ohnehin sehr geringen Zellanzahl in Kauf genommen.

Ohne Abzug der Zellen der KDR-Negativkontrolle ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an EPC zwischen den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv aufzeigen. Im Vergleich der EPC-Anzahl der Patientengruppen untereinander wiesen CTEPH-Patienten signifikant höhere EPC-Prozentangaben als Patienten mit unklarer PH auf.

Es lässt sich schlussfolgern, dass durch den Nachweis erhöhter EPC-Zahlen bei Patienten mit PAH und CTEPH die bereits in vorherigen Studien getroffene Annahme einer Beteiligung der EPC in der Pathophysiologie der PH, zumindest bei den Gruppen PAH und CTEPH, bestärkt wird.

Ein entscheidendes Problem bei der quantitativen Bestimmung der EPC ist jedoch, dass aktuell weder eine allgemeingültige Definition der EPC noch eine standardisierte Methode zur Identifikation dieser Zellen existiert (Toshner und Morrell 2010). So kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung verschiedener Protokolle beachtliche Unterschiede in den Ergebnissen nach sich ziehen kann, was sich in den bisher veröffentlichten kontroversen Daten über die Anzahl der EPC bei Patienten mit PH widerspiegelt.

Bezüglich der relativen Anzahl der Vorläuferzellen, die das Stammzellantigen CD34 exprimieren, ließ sich sowohl in den Patientengruppen untereinander als auch im Vergleich zum Kontrollkollektiv kein statistisch signifikanter Unterschied aufzeigen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten auch *Toshner et al.* und *Diller et al.* keinen Unterschied der CD34⁺-Zellen zwischen Patienten mit IPAH und einer Kontrollgruppe aufdecken (Toshner et al. 2009b), (Diller et al. 2008).

4.3 EPC als Marker für die Schweregradeinteilung der PH

Die endotheliale Dysfunktion wird zunehmend auch für die Aktivierung und ein Voranschreiten der PH verantwortlich gemacht (Humbert et al. 2008), (Hassoun et al. 2009). Möglicherweise könnte die Bestimmung der EPC als Surrogatmarker für endotheliale Dysfunktion genutzt werden (Liew et al. 2006), (Humbert et al. 2004). Somit könnten die EPC auch eine wichtige Rolle bei der Primär- und Verlaufsdagnostik der PH erlangen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Anzahl der EPC in Beziehung zu dem Schweregrad der PH steht. Zu diesem Zweck wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen der relativen Anzahl der EPC und klinischen Parametern, anhand derer eine Beurteilung der Schwere der Erkrankung möglich ist, festzustellen. Dazu wurden die zurückgelegte Gehstrecke im 6MWT, der Laborparameter BNP und die hämodynamischen Parameter mPAP, CI und PVRI berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Patienten mit PAH, CTEPH und PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der relativen Anzahl der EPC und den oben aufgezählten Parametern aufgezeigt werden - mit Ausnahme eines signifikanten inversen Zusammenhangs zwischen der Anzahl an EPC bei Patienten mit CTEPH und der Höhe des BNP-Spiegels (Spearman $r = -0,46$; $p = 0,024$). Lediglich im Gesamtkollektiv ließ sich ein statistisch signifikanter,

wenn auch schwacher, Zusammenhang zwischen der in Prozent angegebenen EPC-Anzahl und der Höhe des BNP-Spiegels (Spearman $r = -0,25$; $p = 0,037$) bzw. des in der RHK-Untersuchung ermittelten CI (Spearman $r = 0,27$; $p = 0,040$) und PVRI (Spearman $r = -0,28$; $p = 0,032$) nachweisen. Dies bedeutet, dass eine höhere relative Anzahl an EPC mit einem erniedrigten BNP-Spiegel und pulmonalen Gefäßwiderstands-Index bzw. mit einem erhöhten Herzzeitvolumen-Index korreliert. Daraus ließe sich wiederum schlussfolgern, dass eine erhöhte relative Anzahl an EPC mit einem milderem Erkrankungszustand einherginge. Diese Aussagen beziehen sich jedoch auf das Gesamtkollektiv und sollten, in Anbetracht der Heterogenität des Patientenkollektives mit teils sehr unterschiedlicher Pathogenese der PH, mit Vorsicht betrachtet werden.

Die in diesem Kapitel dargelegten Ergebnisse sind vergleichbar mit Daten einer in 2009 publizierten Studie von *Toshner et al.*, in der sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl an CD133⁺KDR⁺-Zellen und den hämodynamischen Parameter mPAP, CI und PVR bei Patienten mit PAH feststellen ließ (Toshner et al. 2009b). Hingegen konnten *Junhui et al.* als auch *Diller et al.* einen inversen Zusammenhang zwischen der Anzahl der EPC und dem mPAP bei Patienten mit IPAH darstellen (Junhui et al. 2008), (Diller et al. 2008). Dazu gegensätzlich ist das Resultat einer von *Asosingh et al.* publizierten Arbeit, in der sich die Anzahl an CD34⁺CD133⁺-Zellen positiv mit dem mPAP bei Patienten mit IPAH korrelieren ließ (Asosingh et al. 2008). Eine signifikante positive Korrelation zwischen der Anzahl an zirkulierenden EPC und dem Herzzeitvolumen-Index bei IPAH-Patienten ließ sich in der von *Diller et al.* veröffentlichten Studie aufzeigen (Diller et al. 2008). Letztendlich konnte auch für den PVR ein inverser Zusammenhang mit der Anzahl an CD133⁺KDR⁺-Zellen bei Patienten mit IPAH von *Junhui et al.* dargelegt werden (Junhui et al. 2008).

Analog zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit konnten *Diller et al.* bei Patienten mit IPAH keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl an zirkulierenden EPC im peripheren Blut und der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT aufdecken. Ihnen gelang es jedoch, bei Patienten mit Eisenmenger- Syndrom, das zur assoziierten PAH gezählt wird, eine positive Korrelation zwischen CD34⁺CD133⁺-Zellen und zurückgelegter Wegstrecke im 6MWT darzustellen (Diller et al. 2008). Aufgrund der geringen Fallzahl an Patienten mit assoziierter PAH wurden diese in der vorliegenden Arbeit nicht als eigenständige Gruppe, sondern, mit den IPAH-Patienten

zusammengefasst, als PAH-Gruppe betrachtet. Gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit und den Resultaten von *Diller et al.* wiesen *Junhui et al.* einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der EPC (definiert als CD133⁺KDR⁺-Zellen) und der Wegstrecke im 6MWT bei Patienten mit IPAH nach (Junhui et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte die inverse Korrelation zwischen der Anzahl der EPC und dem BNP-Spiegel bei Patienten mit IPAH und Eisenmenger-Syndrom aus den schon mehrfach zitierten Publikationen von *Junhui et al.* und *Diller et al.* bei Patienten mit PAH nicht aufgezeigt werden (Junhui et al. 2008), (Diller et al. 2008). Jedoch ließ sich, wie bereits erwähnt, ein statistisch signifikanter inverser Zusammenhang zwischen der Höhe des BNP-Spiegels und der Anzahl an EPC bei Patienten mit CTEPH nachweisen. Dies würde bedeuten, dass eine erhöhte Anzahl an EPC mit einem erniedrigten BNP-Spiegel korreliert und somit mit einem stabilen Krankheitszustand gleichzusetzen wäre. Literatur, die diesen Sachverhalt bei Patienten mit CTEPH untersucht, liegt nach unserem Kenntnisstand nicht vor.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit, mit oben genannter Ausnahme, eine Beziehung zwischen der relativen Anzahl an EPC im peripheren Blut und dem Schweregrad der Erkrankung bei Patienten mit PAH, CTEPH und PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus nicht nachweisen konnten. Die Klärung dieses Sachverhalts bedarf, nicht zuletzt aufgrund der teils widersprüchlichen Ergebnisse vorheriger Studien, jedoch weiterer Untersuchungen.

4.4 Prognostische Aussagefähigkeit der EPC bei PH

Es besteht ein wachsendes Interesse, neben der Erforschung des therapeutischen Nutzens der EPC, auch die Rolle der EPC als prädiktiven Biomarker bei PAH zu untersuchen (Rhodes et al. 2009). Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigte sich bereits in einer 2005 veröffentlichten Studie, dass die einmalige Bestimmung der Anzahl an CD34⁺KDR⁺-Zellen als Prädiktor für das kardiovaskuläre *Outcome* genutzt werden und somit bei der Identifikation von Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko hilfreich sein kann. Ein erhöhtes Level an CD34⁺KDR⁺-Zellen korrelierte mit einem verminderten Risiko eines Todes aufgrund kardiovaskulärer Ursache (Werner et al. 2005).

Bei Patienten mit PAH wurde von *Diller et al.* ein möglicher Zusammenhang zwischen einem niedrigen Level an EPC und einer schlechteren Prognose beschrieben (Diller et

al. 2008). Zum einen basiert diese Annahme auf den erwähnten Beobachtungen bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Zum anderen korrelierte in der Studie bei Patienten mit Eisenmenger-Syndrom die Anzahl an EPC invers mit dem Schweregrad der Erkrankung. Bei der Untergruppe der Eisenmenger-Patienten mit Down-Syndrom, die besonders schlechte Überlebenschancen haben, wurden die niedrigsten Levels an EPC gemessen.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob bei Patienten mit PH zwischen der initial bestimmten relativen Anzahl der EPC und dem Verlauf der Erkrankung ein Zusammenhang besteht. Zu diesem Zweck wurden die bereits in Kapitel 4.3 beschriebenen Parameter, die zur Schweregradeinteilung bei PH verwendet werden können, im Verlauf erneut erhoben. Es wurde versucht, die prozentuale Veränderung dieser Werte mit dem ursprünglich gemessenen Level an EPC in Beziehung zu setzen. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl an im peripheren Blut zirkulierender EPC und der prozentualen Veränderung der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT und des Laborparameters BNP festgestellt werden. Auch ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen der relativen Anzahl der EPC und der prozentualen Veränderung der hämodynamischen Parameter mPAP, CI und PVRI. Bei insgesamt 31 Patienten trat in dem Beobachtungszeitraum von bis zu 2 $\frac{3}{4}$ Jahren nach Analyse der EPC ein zu *Time to Clinical Worsening* dazugehöriges Ereignis auf. Jedoch konnte der Zeitraum bis zum Eintreten eines solchen Ereignisses nicht mit der relativen Anzahl an EPC in ein Verhältnis gesetzt werden.

Somit sind nach den hier dargestellten Untersuchungsergebnissen anhand der Anzahl an EPC keine Aussagen über den Verlauf der Erkrankung möglich. Da die Fallzahl der Patienten, von denen Verlaufsdaten, insbesondere hämodynamische Verlaufswerte, erhoben werden konnten, jedoch gering ist, kann den Ergebnissen nur eine orientierende Aussagekraft zugesprochen werden. Bei weiteren Untersuchungen sollte die in dieser Studie für eine chronische Erkrankung relativ kurz gewählte *Follow-up*-Zeit verlängert werden, um den langfristigen Krankheitsverlauf erfassen zu können und somit aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten.

Weiterhin gilt zu beachten, dass durch die Erweiterung der spezifischen Therapie eine Verschlechterung des Krankheitszustandes der Patienten maskiert werden kann. Somit könnte die Aussagefähigkeit der Korrelationsanalysen zur prognostischen Bedeutung der EPC eingeschränkt sein. Ein Ausschluss der Patienten mit einer Erweiterung der

spezifischen Therapie nach Analyse der EPC war jedoch aufgrund der geringen Fallzahl an Patienten mit Verlaufsdaten nicht möglich.

4.5 Einfluss von Medikamenten auf die Anzahl der EPC bei PH

Es gibt Hinweise, dass die Anzahl an zirkulierenden EPC im peripheren Blut durch Medikamente beeinflusst werden kann. So konnten *Dimmeler et al.* nachweisen, dass die zur Lipidsenkung eingesetzten Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktasehemmer (Statine) sowohl die Differenzierung als auch die Anzahl an EPC *in vitro* und *in vivo* hochregulieren können (Dimmeler et al. 2001). Bei Patienten mit stabiler Angina pectoris konnte durch die Einnahme von Statinen die Anzahl an zirkulierenden EPC erhöht werden (Vasa et al. 2001). In präklinischen Studien mit experimenteller PH konnte ein positiver Effekt der Statine aufgezeigt werden. Ob dies durch Beeinflussung der EPC erfolgte, ist jedoch unklar (Fadini et al. 2010). In einer Studie, in der ein therapieinduzierter Einfluss von Statinen auf die Anzahl an endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit IPAH untersucht wurde, konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an EPC im Vergleich zu einer Kontrollgruppe festgestellt werden (Diller et al. 2008). Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Auch hier ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der relativen Anzahl an EPC zwischen Patienten mit und ohne Statineinnahme aufzeigen. Diese Aussage ist jedoch nur für das Gesamtkollektiv zulässig, da eine Analyse der Subkollektive hinsichtlich der Statineinnahme aufgrund geringer Fallzahlen (Patienten mit Statineinnahme: PAH n = 6, CTEPH n = 6, unklare PH n = 3) als nicht sinnvoll erachtet wurde.

Zur spezifischen Therapie der PAH werden PDE_{5i}, ERA und Prostazyklinanaloga gezählt. Durch den Einsatz dieser Substanzen wurde die Lebenserwartung der Patienten mit PAH deutlich verbessert (Galiè et al. 2009). Bezüglich des therapeutischen Einsatzes der EPC bei PH konnten sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien erste erfolgsversprechende Ergebnisse erzielt werden (Zhao et al. 2005), (Raoul et al. 2007), (Wang et al. 2007), (Zhu et al. 2008). Es stellt sich daher die Frage, ob die Effektivität der PAH-spezifischen Therapie unter anderem auch auf einer Beeinflussung der EPC basiert. *Diller et al.* konnten aufzeigen, dass IPAH-Patienten, die mit dem PDE_{5i} Sildenafil behandelt wurden, eine vermehrte Anzahl an zirkulierenden EPC, im Vergleich zu unbehandelten IPAH-Patienten besaßen.

Überdies erwies sich die Anzahl an EPC bei IPAH-Patienten mit Sildenafiltherapie als abhängig von der Dosis dieses Präparates (Diller et al. 2008). In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte durch die Applikation von Treprostinil s.c., einem Prostazyklinanalogon, sowohl eine erhöhte Anzahl als auch ein gesteigertes angiogenes Potential der EPC bei Kindern mit PAH nachgewiesen werden (Smadja et al. 2011). Somit gibt es erste Hinweise, dass die Anzahl und Funktionalität der EPC durch die PAH-spezifische Therapie beeinflusst werden kann. Zur Klärung des genauen Zusammenhangs, insbesondere über welche Signalwege diese Wechselwirkung zustande kommt und ob möglicherweise die Zellzahlbestimmung der EPC als Surrogatmarker für die Therapieeffektivität dieser Medikamente genutzt werden kann, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Die Analyse der Auswirkungen der PAH-spezifischen Therapie auf die Anzahl an EPC war in der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich, da von den insgesamt 80 Patienten nur sieben Patienten nicht mit einem PDE₅i, einem ERA oder einem Prostazyklinanalogon behandelt wurden. Somit konnte eine Gegenüberstellung der relativen Anzahl an EPC von Patienten mit und ohne PAH-spezifische Therapie sowohl in den Subkollektiven als auch im Gesamtkollektiv nicht durchgeführt werden.

4.6 Methodenkritik

4.6.1 Auswahl der Patienten

Im Gesamtkollektiv als auch in den einzelnen Gruppen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, mit Ausnahme der Patienten mit unklarer PH, ein Überwiegen des weiblichen Geschlechts. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass Frauen häufiger an PH erkranken (Gaine und Rubin 1998). Auch in vergleichbaren Studien dominiert das weibliche Geschlecht (Toshner et al. 2009b), (Diller et al. 2008).

Das mittlere Alter des Gesamtkollektivs lag mit 59 Jahren 10-20 Jahre oberhalb des Alters anderer Studien (Asosingh et al. 2008), (Junhui et al. 2008). Ferner gab es signifikante Unterschiede bezüglich des Alters der Patienten mit CTEPH bzw. unklarer PH und des Alters der Kontrollgruppe (CTEPH vs. Kontrollgruppe: $p < 0,01$; unklare PH vs. Kontrollgruppe: $p < 0,05$). Hier muss berücksichtigt werden, dass das für die Kontrollgruppe gewonnene Probenmaterial von freiwilligen Blutspendern der Blutbank stammte, für die ein spendenfähiges Alter von 18-68 Jahren festgelegt ist.

Der überwiegende Anteil der untersuchten Patienten befand sich zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im NYHA-Stadium II oder III. Dies entspricht den Angaben vergleichbarer Studien (Toshner et al. 2009b), (Diller et al. 2008).

Die erhobenen klinischen Parameter wiesen mit Ausnahme des PVRI bei Patienten mit CTEPH und unklarer PH keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen auf. Insgesamt ließen sich bei dem analysierten Patientengut weitestgehend ähnliche Daten zu denen der oben erwähnten Studien feststellen. Somit können sie zu verschiedenen Studien der Literatur gut in Beziehung gebracht werden.

Allgemeingültige epidemiologische Daten zur Verteilung der verschiedenen Gruppen der PH existieren nicht. In einer Untersuchung von knapp 500 Patienten mit PH wiesen nur 4,2% der Patienten eine PAH, 0,6% eine CTEPH und 6,8% eine PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus auf. Die Mehrheit der Patienten litt an einer PH infolge Linksherzerkrankung (78,8%) und an einer PH infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie (9,7%) (Gabbay et al. 2007) in (Galiè et al. 2009). Somit kann das in dieser Arbeit analysierte Patientenkollektiv sicher als hochselektioniert angesehen werden, da Patienten mit PH infolge Linksherzerkrankung (Gruppe 2) und mit PH infolge Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie (Gruppe 3) nicht berücksichtigt wurden. Aufgrund der Tatsache, dass die Durchführung an einem spezialisierten Zentrum für pulmonale Hypertonie stattfand, konnten vermehrt Patienten mit eher seltenen Formen der PH, wie PAH und CTEPH, rekrutiert werden. Wie in vergleichbaren Studien litt auch in der vorliegenden Arbeit die anzahlmäßig größte Gruppe des untersuchten Kollektivs an einer PAH.

4.6.2 Einschränkungen dieser Arbeit

Die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit könnte durch die teilweise geringen Fallzahlen der untersuchten Patientenkollektive (PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus: $n = 13$) und der Kontrollgruppe ($n = 9$) beeinträchtigt sein. Es ist möglich, dass aufgrund der teils niedrigen Fallzahlen keine Unterschiede in der Anzahl an EPC in den einzelnen Gruppen herausgearbeitet werden konnten. Weiterhin wurden aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit assoziierter PAH ($n = 6$) Korrelationsanalysen dieser Untergruppe als nicht sinnvoll erachtet. Diese Patienten wurden daher mit den Patienten, die an einer IPAH erkrankt waren, in der Gruppe PAH zusammengefasst. Somit sind Aussagen hinsichtlich der in dieser Arbeit untersuchten Sachverhalte zu diesen Untergruppen im Einzelnen nicht möglich. In Anbetracht der

Tatsache, dass es sich bei der pulmonalen Hypertonie um eine seltene Erkrankung handelt, konnten aber, da die Daten an einem Schwerpunkt-Zentrum erhoben wurden, vergleichsweise viele Patienten in die Untersuchung mit eingeschlossen werden.

Weiterhin ist die Aussagekraft der Arbeit durch unvollständige klinische Verlaufswerte eingeschränkt. Dies schlägt sich am meisten in den Hämodynamik-Werten nieder, da nur bei ca. 30% der Patienten mit einer *Baseline*-Untersuchung eine RHK-Untersuchung im Verlauf durchgeführt wurde. Aus diesem Grund mussten, um eine statistische Auswertung vornehmen zu können, die einzelnen Patientengruppen zusammen betrachtet werden.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist, dass keine Untersuchungen zur Dynamik der EPC vorgenommen wurden. Somit können keine Aussagen über eine mögliche Veränderung der Anzahl an zirkulierenden EPC im peripheren Blut bei einer Progression der Erkrankung getroffen werden. Eine wiederholte Analyse der EPC bei einzelnen Patienten mit PH unter Berücksichtigung des jeweiligen klinischen Status sollte in folgenden Studien stärkere Beachtung finden.

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit keine Funktionsanalysen der EPC durchgeführt, wodurch die Funktionalität bzw. Dysfunktionalität der EPC im peripheren Blut der Patienten nicht beurteilt werden kann. In den zum Vergleich herangezogenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die untersuchten EPC im peripheren Blut in ihrer Fähigkeit, wirksame Gefäßnetzwerke auszubilden, beeinträchtigt waren (Toshner et al. 2009b).

4.7 Ausblick

Es besteht ein wachsendes Interesse an den recht neu entdeckten EPC, nicht zuletzt aufgrund erster vielversprechender Ergebnisse sowohl experimenteller als auch klinischer Studien über den therapeutischen Nutzen dieser Zellen bei PH (Zhao et al. 2005), (Raoul et al. 2007), (Wang et al. 2007), (Zhu et al. 2008). Die genaue Rolle der EPC in pathophysiologischen Prozessen der PH konnte aber bisher nicht hinreichend geklärt werden. So herrscht Ungewissheit darüber, ob EPC einen protektiven oder schädigenden Einfluss in der Pathogenese der PH haben (Fadini et al. 2010). Es gibt Hinweise, dass *ex vivo* kultivierte Progenitorzellen an PH erkrankter Patienten in ihrer Funktion zur Ausbildung wirksamer Gefäßnetzwerke beschädigt sind (Asosingh et al.

2008), (Junhui et al. 2008), (Diller et al. 2008). Somit scheint die Dysfunktionalität der EPC eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der PH zu spielen.

Kompliziert wird die Analyse der EPC, da bisher weder eine allgemeingültige Definition der EPC noch eine standardisierte Methode zur Identifikation dieser Zellpopulation vorhanden ist. Dies schlägt sich in den gegensätzlichen Ergebnissen von Studien über die Anzahl der EPC bei Patienten mit PH im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nieder.

Die bisherige Studienlage verdeutlicht, dass die genaue Funktion der EPC bei dieser Erkrankung detailliert analysiert und verstanden werden muss, bevor eine mögliche zellbasierte Therapiealternative für Patienten mit PH entwickelt werden kann.

5 Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine Lungengefäßerkrankung, die durch eine Druck- bzw. Widerstandserhöhung der Gefäße des kleinen Kreislaufs charakterisiert ist. Pathogenetisch kommt es bei der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) zu einem *Gefäßremodeling* mit konsekutiver Lumenverengung, welches durch eine Intimaproliferation, eine Hypertrophie und Hyperplasie der Tunica media sowie eine Verdickung der Adventitia gekennzeichnet ist.

Endotheliale Progenitorzellen (EPC), die eine entscheidende Rolle bei der postnatalen Neovaskularisierung und Reendothelialisierung beschädigter Zellen spielen, scheinen auch an pathophysiologischen Prozessen der PH beteiligt zu sein.

Aufgrund erster erfolgsversprechender Ergebnisse sowohl experimenteller als auch klinischer Studien über den therapeutischen Nutzen von EPC bei PH besteht ein wachsendes Interesse an dieser Zellpopulation. Jedoch ist die genaue Funktion der EPC in den pathophysiologischen Prozessen der PH bisher nicht eindeutig geklärt.

Die vorliegende Arbeit sollte dazu dienen, die Bedeutsamkeit der EPC (hier definiert als CD34-positive und KDR-positive Zellen) bei Patienten mit PH weiter zu klären. Hierzu wurden 80 Patienten mit PH rekrutiert [pulmonalarterielle Hypertonie (PAH): n = 39, chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH): n = 28, pulmonale Hypertonie mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus (unklare PH): n = 13]. Die Zahl an im Blut zirkulierender EPC wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurde zunächst untersucht, ob sich die Anzahl an EPC bei Patienten mit PH verschiedener Ätiologien untereinander und im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv (n = 9) unterscheidet. Es ließen sich, analog zu Ergebnissen einiger bisher veröffentlichter Studien, statistisch signifikant erhöhte relative EPC-Anzahlen bei Patienten mit PAH und CTEPH im Vergleich zu einer Kontrollgruppe feststellen (PAH vs. Kontrollgruppe: p = 0,043; CTEPH vs. Kontrollgruppe: p = 0,046; jeweils Mann-Whitney-Test). Im Vergleich der einzelnen Patientengruppen untereinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Zahl der EPC.

Weiterhin wurde untersucht, ob die relative Anzahl an EPC in einem Zusammenhang mit dem Schweregrad der Erkrankung (bestimmt anhand des 6-Minuten-Gehtests, des Laborparameters BNP und den hämodynamischen Parametern pulmonalarterieller Mitteldruck, Herzzeitvolumen- Index und pulmonaler Gefäßwiderstand- Index) steht. Es

ließ sich jedoch keine statistisch signifikante Beziehung in den einzelnen Patientengruppen nachweisen - mit Ausnahme einer statistisch signifikanten inversen Korrelation des BNP-Spiegels und der relativen EPC-Zahl bei Patienten mit CTEPH. Zuvor veröffentlichte Studien zeigten diesbezüglich gegensätzliche Ergebnisse. Auch ließ die initial bestimmte relative Anzahl an EPC keine Aussagen über den Verlauf der Erkrankung (prozentuale Veränderung oben genannter klinischer Parameter über einen bestimmten Zeitraum) zu.

Die Ergebnisse dieser Arbeit spiegeln den widersprüchlichen gegenwärtigen Forschungsstand zur Rolle der EPC bei PH wider. Dies beruht nicht zuletzt darauf, dass bisher weder eine allgemeingültige Definition dieser heterogenen Zellpopulation, noch eine standardisierte Methode zu deren Identifikation existiert. Es bedarf somit einer Reihe weiterer Untersuchungen, bevor eine zellbasierte Therapiealternative für Patienten mit PH etabliert werden kann.

6 Summary

Background: Pulmonary hypertension (PH) is a progressive disease of the lung vasculature characterized by an increased pressure and resistance of the pulmonary vessels. In pulmonary arterial hypertension (PAH) pathogenesis, vascular remodeling processes defined by intimal proliferation, hypertrophy and hyperplasia of the tunica media and adventitial thickening lead to a narrowing of vascular lumen.

Endothelial progenitor cells (EPCs) contributing to postnatal neovascularization and reendothelialization are also supposed to be involved in pathophysiologic processes and genesis of PH as well.

Due to promising first results of both experimental and clinical studies on the therapeutic benefit of EPCs, there has been growing interest in this cell population. However, the exact role of EPCs in pathophysiology of PH remains somewhat unclear to date.

Methods and Results: The aim of this study was to investigate the role of CD34⁺KDR⁺ cells in patients with PH. In total 80 patients suffering from PH [PAH: n = 39, chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): n = 28, PH with unclear and/or multifactorial mechanisms: n = 13] were recruited. Flow cytometry was used to determine the number of circulating EPCs.

In a first step the number of (circulating) EPCs in PH patients of different etiology were compared both to each other and to healthy controls (n = 9). In accordance with the results of some of the studies done so far, significantly increased numbers in the relative count of EPCs were found in patients with PAH and CTEPH in comparison to the control group (PAH vs. control group: p = 0,043; CTEPH vs. control group: p = 0,046; Mann-Whitney-Test in each case). However, no significant difference in the relative count of EPCs amongst the patient groups themselves was determined.

Then the relationship between the relative count of CD34⁺KDR⁺ EPCs and disease severity was investigated, determined by the 6-minute walking test, biochemical marker BNP and hemodynamic parameters such as mean pulmonary arterial pressure, cardiac index and pulmonary vascular resistance index. However, no evidence for a statistically significant relationship between those parameters and cell counts was found, apart from a significant inverse correlation between BNP levels and relative count of EPCs in

CTEPH patients. Previously published studies showed quite contrary results in this respect. Furthermore, the initial relative count of EPCs did not allow any predictions on the progress of the disease, taking into account the percentage of change in the clinical parameters mentioned above over a defined period of time.

Conclusions: The findings of this study reflect the discordant results of the current state of research on the role of EPCs in PH. This is not least due to the lack of both a precise definition of this heterogeneous cell population and a standardized method of identifying EPCs.

Conclusively, the importance of EPCs in PH remains unclear and needs further investigation before an EPC-based therapy can be established.

7 Literaturverzeichnis

Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; van der Zee, R.; Li, T. et al. (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. In: *Science* 275 (5302), S. 964–967.

Asosingh, Kewal; Aldred, Micheala A.; Vasanji, Amit; Drazba, Judith; Sharp, Jacqueline; Farver, Carol et al. (2008): Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Am. J. Pathol.* 172 (3), S. 615–627. Online verfügbar unter doi:10.2353/ajpath.2008.070705.

Badesch, David B.; Champion, Hunter C.; Sanchez, Miguel Angel Gomez; Hoeper, Marius M.; Loyd, James E.; Manes, Alessandra et al. (2009): Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S55-66. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.011.

Barst, Robyn J.; Gibbs, J. Simon R.; Ghofrani, Hossein A.; Hoeper, Marius M.; McLaughlin, Vallerie V.; Rubin, Lewis J. et al. (2009): Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S78-84. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.017.

Barst, Robyn J.; McGoon, Michael; Torbicki, Adam; Sitbon, Olivier; Krowka, Michael J.; Olschewski, Horst; Gaine, Sean (2004): Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (12 Suppl S), S. 40S-47S. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2004.02.032.

Cool, C. D.; Stewart, J. S.; Werahera, P.; Miller, G. J.; Williams, R. L.; Voelkel, N. F.; Tuder, R. M. (1999): Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. In: *Am. J. Pathol.* 155 (2), S. 411–419.

D'Alonzo, G. E.; Barst, R. J.; Ayres, S. M.; Bergofsky, E. H.; Brundage, B. H.; Detre, K. M. et al. (1991): Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. In: *Ann. Intern. Med.* 115 (5), S. 343–349.

Davie, Neil J.; Crossno, Joseph T.; Frid, Maria G.; Hofmeister, Stephen E.; Reeves, John T.; Hyde, Dallas M. et al. (2004): Hypoxia-induced pulmonary artery

adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 286 (4), S. L668-78. Online verfügbar unter doi:10.1152/ajplung.00108.2003.

Deng, Z.; Morse, J. H.; Slager, S. L.; Cuervo, N.; Moore, K. J.; Venetos, G. et al. (2000): Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. In: *Am. J. Hum. Genet.* 67 (3), S. 737–744. Online verfügbar unter doi:10.1086/303059.

Diller, Gerhard-Paul; van Eijl, Sven; Okonko, Darlington O.; Howard, Luke S.; Ali, Omar; Thum, Thomas et al. (2008): Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Circulation* 117 (23), S. 3020–3030. Online verfügbar unter doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769646.

Dimmeler, S.; Aicher, A.; Vasa, M.; Mildner-Rihm, C.; Adler, K.; Tiemann, M. et al. (2001): HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. In: *J. Clin. Invest.* 108 (3), S. 391–397. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI13152.

Dresdale, D. T.; SCHULTZ, M.; MICHOM, R. J. (1951): Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. In: *Am. J. Med.* 11 (6), S. 686–705.

Fadini, G. P.; Avogaro, A.; Ferraccioli, G.; Agostini, C. (2010): Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications. In: *Eur. Respir. J.* 35 (2), S. 418–425. Online verfügbar unter doi:10.1183/09031936.00112809.

Fadini, Gian Paolo; Schiavon, Marco; Cantini, Marcella; Baesso, Ilenia; Facco, Monica; Miorin, Marta et al. (2006): Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. In: *Stem Cells* 24 (7), S. 1806–1813. Online verfügbar unter doi:10.1634/stemcells.2005-0440.

Gabbay, E.; Yeow, W.; Playford, D. (2007): Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an uncommon cause of pulmonary hypertension (PH) in an unselected population: the Armadale echocardiography study. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, S. A713.

Gainé, S. P.; Rubin, L. J. (1998): Primary pulmonary hypertension. In: *Lancet* 352 (9129), S. 719–725. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0140-6736(98)02111-4.

Galiè, N.; Hoeper, M. M.; Humbert, M.; Torbicki, A.; Vachiery, J-L; Barbera, J. A. et al. (2009): Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. In: *Eur. Respir. J.* 34 (6), S. 1219–1263. Online verfügbar unter doi:10.1183/09031936.00139009.

Galiè, Nazzareno; Ghofrani, Hossein A.; Torbicki, Adam; Barst, Robyn J.; Rubin, Lewis J.; Badesch, David et al. (2005): Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. In: *N. Engl. J. Med.* 353 (20), S. 2148–2157. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa050010.

Ghofrani, Hossein A.; Barst, Robyn J.; Benza, Raymond L.; Champion, Hunter C.; Fagan, Karen A.; Grimminger, Friedrich et al. (2009): Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S108-17. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.014.

Giaid, A.; Saleh, D. (1995): Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. In: *N. Engl. J. Med.* 333 (4), S. 214–221. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJM199507273330403.

Giaid, A.; Yanagisawa, M.; Langleben, D.; Michel, R. P.; Levy, R.; Shennib, H. et al. (1993): Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. In: *N. Engl. J. Med.* 328 (24), S. 1732–1739. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJM199306173282402.

Guyatt, G. H.; Sullivan, M. J.; Thompson, P. J.; Fallen, E. L.; Pugsley, S. O.; Taylor, D. W.; Berman, L. B. (1985): The 6-minute walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure. In: *Can Med Assoc J* 132 (8), S. 919–923.

Hassoun, Paul M.; Mouthon, Luc; Barberà, Joan A.; Eddahibi, Saadia; Flores, Sonia C.; Grimminger, Friedrich et al. (2009): Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S10-9. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.006.

Hayashida, Kentaro; Fujita, Jun; Miyake, Yoshiko; Kawada, Hiroshi; Ando, Kiyoshi; Ogawa, Satoshi; Fukuda, Keiichi (2005): Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. In: *Chest* 127 (5), S. 1793–1798. Online verfügbar unter doi:10.1378/chest.127.5.1793.

Hill, Jonathan M.; Zalos, Gloria; Halcox, Julian P. J.; Schenke, William H.; Waclawiw, Myron A.; Quyyumi, Arshed A.; Finkel, Toren (2003): Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. In: *N. Engl. J. Med.* 348 (7), S. 593–600. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa022287.

Hoepfer, M. M.; Ghofrani, H. A.; Gorenflo, M.; Grünig, E.; Schranz, D.; Rosenkranz, S. (2010): [Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: European guidelines 2009]. In: *Pneumologie* 64 (7), S. 401–414. Online verfügbar unter doi:10.1055/s-0029-1244112.

Humbert, Marc; McLaughlin, Vallerie V. (2009): The 4th World Symposium on Pulmonary Hypertension. Introduction. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S1-2. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.013.

Humbert, Marc; Montani, David; Perros, Frédéric; Dorfmueller, Peter; Adnot, Serge; Eddahibi, Saadia (2008): Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. In: *Vascul. Pharmacol.* 49 (4-6), S. 113–118. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.vph.2008.06.003.

Humbert, Marc; Morrell, Nicholas W.; Archer, Stephen L.; Stenmark, Kurt R.; MacLean, Margaret R.; Lang, Irene M. et al. (2004): Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (12 Suppl S), S. 13S-24S. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2004.02.029.

Humbert, Marc; Sitbon, Olivier; Chaouat, Ari; Bertocchi, Michèle; Habib, Gilbert; Gressin, Virginie et al. (2006): Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 (9), S. 1023–1030. Online verfügbar unter doi:10.1164/rccm.200510-1668OC.

Hur, Jin; Yoon, Chang-Hwan; Kim, Hyo-Soo; Choi, Jin-Ho; Kang, Hyun-Jae; Hwang, Kyung-Kook et al. (2004): Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2), S. 288–293. Online verfügbar unter doi:10.1161/01.ATV.0000114236.77009.06.

Ingram, David A.; Mead, Laura E.; Tanaka, Hiromi; Meade, Virginia; Fenoglio, Amy; Mortell, Kelly et al. (2004): Identification of a novel hierarchy of endothelial

progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. In: *Blood* 104 (9), S. 2752–2760. Online verfügbar unter doi:10.1182/blood-2004-04-1396.

Jeffery, T. K.; Morrell, N. W. (2002): Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. In: *Prog Cardiovasc Dis* 45 (3), S. 173–202. Online verfügbar unter doi:10.1053/pcad.2002.130041.

Junhui, Zhu; Xingxiang, Wang; Guosheng, Fu; Yunpeng, Shang; Furong, Zhang; Junzhu, Chen (2008): Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. In: *Respir Med* 102 (7), S. 1073–1079. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.rmed.2007.12.030.

Keogh, Anne M.; Mayer, Eckhard; Benza, Raymond L.; Corris, Paul; Darteville, Philippe G.; Frost, Adaani E. et al. (2009): Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S67-77. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.016.

Khan, Sameena S.; Solomon, Michael A.; McCoy, J. Philip (2005): Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. In: *Cytometry B Clin Cytom* 64 (1), S. 1–8. Online verfügbar unter doi:10.1002/cyto.b.20040.

Kovacs, G.; Berghold, A.; Scheidl, S.; Olschewski, H. (2009): Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. In: *Eur. Respir. J.* 34 (4), S. 888–894. Online verfügbar unter doi:10.1183/09031936.00145608.

Lane, K. B.; Machado, R. D.; Pauciulo, M. W.; Thomson, J. R.; Phillips, J. A.; Loyd, J. E. et al. (2000): Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. In: *Nat. Genet.* 26 (1), S. 81–84. Online verfügbar unter doi:10.1038/79226.

Leschke, M.; Wädlich, A.; Waldenmaier, S.; Faehling, M. (2009): Diagnostics in pulmonary hypertension. In: *Internist (Berl)* 50 (9), S. 1086, 1088-90, 1092-100. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00108-009-2335-9.

Liew, Aaron; Barry, Frank; O'Brien, Timothy (2006): Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations. In: *Bioessays* 28 (3), S. 261–270. Online verfügbar unter doi:10.1002/bies.20372.

Lin, Y.; Weisdorf, D. J.; Solovey, A.; Hebbel, R. P. (2000): Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. In: *J. Clin. Invest.* 105 (1), S. 71–77. Online verfügbar unter doi:10.1172/JCI8071.

Löffler, G.; Petrides, P. (2003): Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl.: Springer, S. 808-810.

Machado, Rajiv D.; Eickelberg, Oliver; Elliott, C. Gregory; Geraci, Mark W.; Hanaoka, Masayuki; Loyd, James E. et al. (2009): Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S32-42. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.015.

Majka, S. M.; Skokan, M.; Wheeler, L.; Harral, J.; Gladson, S.; Burnham, E. et al. (2008): Evidence for cell fusion is absent in vascular lesions associated with pulmonary arterial hypertension. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295 (6), S. L1028-39. Online verfügbar unter doi:10.1152/ajplung.90449.2008.

Marsboom, Glenn; Pokreisz, Peter; Gheysens, Olivier; Vermeersch, Pieter; Gillijns, Hilde; Pellens, Marijke et al. (2008): Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. In: *Stem Cells* 26 (4), S. 1017–1026. Online verfügbar unter doi:10.1634/stemcells.2007-0562.

McGoon, Michael; Gutterman, David; Steen, Virginia; Barst, Robin; McCrory, Douglas C.; Fortin, Terry A.; Loyd, James E. (2004): Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. In: *Chest* 126 (1 Suppl), S. 14S-34S. Online verfügbar unter doi:10.1378/chest.126.1_suppl.14S.

McLaughlin, Vallerie V.; Archer, Stephen L.; Badesch, David B.; Barst, Robyn J.; Farber, Harrison W.; Lindner, Jonathan R. et al. (2009): ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association: developed in collaboration with the American College of Chest Physicians, American Thoracic Society, Inc., and the Pulmonary Hypertension Association. In: *Circulation* 119 (16), S. 2250–2294. Online verfügbar unter doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192230.

McLaughlin, Vallerie V.; Presberg, Kenneth W.; Doyle, Ramona L.; Abman, Steven H.; McCrory, Douglas C.; Fortin, Terry; Ahearn, Gregory (2004): Prognosis

of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. In: *Chest* 126 (1 Suppl), S. 78S-92S. Online verfügbar unter doi:10.1378/chest.126.1_suppl.78S.

Miyamoto, S.; Nagaya, N.; Satoh, T.; Kyotani, S.; Sakamaki, F.; Fujita, M. et al. (2000): Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2 Pt 1), S. 487–492.

Morrell, Nicholas W.; Adnot, Serge; Archer, Stephen L.; Dupuis, Jocelyn; Jones, Peter Lloyd; MacLean, Margaret R. et al. (2009): Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S20-31. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.018.

Nagaya, N.; Nishikimi, T.; Okano, Y.; Uematsu, M.; Satoh, T.; Kyotani, S. et al. (1998): Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 31 (1), S. 202–208.

Nagaya, N.; Nishikimi, T.; Uematsu, M.; Satoh, T.; Kyotani, S.; Sakamaki, F. et al. (2000): Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. In: *Circulation* 102 (8), S. 865–870.

Olschewski, H.; Hoeper, M. M.; Borst, M. M.; Ewert, R.; Grünig, E.; Kleber, F-X et al. (2006): [Diagnosis and therapy of chronic pulmonary hypertension]. In: *Pneumologie* 60 (12), S. 749–771. Online verfügbar unter doi:10.1055/s-2006-954981.

Peacock, A. J.; Murphy, N. F.; McMurray, J. J. V.; Caballero, L.; Stewart, S. (2007): An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. In: *Eur. Respir. J.* 30 (1), S. 104–109. Online verfügbar unter doi:10.1183/09031936.00092306.

Pietra, Giuseppe G.; Capron, Frederique; Stewart, Susan; Leone, Ornella; Humbert, Marc; Robbins, Ivan M. et al. (2004): Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (12 Suppl S), S. 25S-32S. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2004.02.033.

Raoul, William; Wagner-Ballon, Orianne; Saber, Guitanouch; Hulin, Anne; Marcos, Elisabeth; Giraudier, Stéphane et al. (2007): Effects of bone marrow-

derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. In: *Respir. Res.* 8, S. 8. Online verfügbar unter doi:10.1186/1465-9921-8-8.

Rehman, Jalees; Li, Jingling; Orschell, Christie M.; March, Keith L. (2003): Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. In: *Circulation* 107 (8), S. 1164–1169.

Rhodes, Christopher J.; Davidson, Alexandra; Gibbs, J. Simon R.; Wharton, John; Wilkins, Martin R. (2009): Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. In: *Pharmacol. Ther.* 121 (1), S. 69–88. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.pharmthera.2008.10.002.

Rosenkranz, S. (2006): [Pulmonary hypertension: classification, pathophysiology and noninvasive diagnosis]. In: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 131 (49 Suppl 9), S. S295-9. Online verfügbar unter doi:10.1055/s-2006-957195.

Runo, James R.; Loyd, James E. (2003): Primary pulmonary hypertension. In: *The Lancet* 361, S. 1533–1544. Online verfügbar unter 10.1016/S0140-6736(03)13167-4.

Satoh, Kimio; Kagaya, Yutaka; Nakano, Makoto; Ito, Yoshitaka; Ohta, Jun; Tada, Hiroko et al. (2006): Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. In: *Circulation* 113 (11), S. 1442–1450. Online verfügbar unter doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583732.

Schächinger, Volker; Assmus, Birgit; Britten, Martina B.; Honold, Jörg; Lehmann, Ralf; Teupe, Claudius et al. (2004): Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 44 (8), S. 1690–1699. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2004.08.014.

Schenk, Peter; Stiebellehner, Leopold; Burghuber, Otto C.; Kneussl, Meinhard; Lang, Irene M. (2005): Examination of pulmonary circulation using right heart catheterization. Position paper of the Cardiopulmonary Task Force of the Austrian Society for Pneumology and the Austrian Society for Cardiology. In: *Wien. Klin. Wochenschr.* 117 (18), S. 651–662. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00508-005-0437-5.

Simonneau, Gérald; Robbins, Ivan M.; Beghetti, Maurice; Channick, Richard N.; Delcroix, Marion; Denton, Christopher P. et al. (2009): Updated clinical classification of pulmonary hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S43-54. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.012.

Smadja, D. M.; Mauge, L.; Sanchez, O.; Silvestre, J.-S.; Guerin, C.; Godier, A. et al. (2010): Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. In: *European Respiratory Journal* 36 (6), S. 1284–1293. Online verfügbar unter doi: 10.1183/09031936.00130809.

Smadja, David M.; Bièche, Ivan; Silvestre, Jean-Sébastien; Germain, Stéphane; Cornet, Adeline; Laurendeau, Ingrid et al. (2008): Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (12), S. 2137–2143. Online verfügbar unter doi:10.1161/ATVBAHA.108.168815.

Smadja, David M.; Mauge, Laetitia; Gaussem, Pascale; d'Audigier, Clément; Israel-Biet, Dominique; Celermajer, David S. et al. (2011): Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension. In: *Angiogenesis* 14 (1), S. 17–27. Online verfügbar unter doi:10.1007/s10456-010-9192-y.

Stenmark, K. R.; Mecham, R. P. (1997): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. In: *Annu. Rev. Physiol.* 59, S. 89–144. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.89.

Stewart, D. J.; Levy, R. D.; Cernacek, P.; Langleben, D. (1991): Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? In: *Ann. Intern. Med.* 114 (6), S. 464–469.

Timmermans, Frank; van Hauwermeiren, Filip; Smedt, Magda de; Raedt, Robrecht; Plasschaert, Frank; Buyzere, Marc L. de et al. (2007): Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (7), S. 1572–1579. Online verfügbar unter doi:10.1161/ATVBAHA.107.144972.

Tonelli, Adriano R.; Alnuaimat, Hassan; Mubarak, Kamal (2010): Pulmonary vasodilator testing and use of calcium channel blockers in pulmonary arterial

hypertension. In: *Respir Med* 104 (4), S. 481–496. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.rmed.2009.11.015.

Toshner, M.; Morrell, N. W. (2010): Endothelial progenitor cells in pulmonary hypertension - dawn of cell-based therapy? In: *Int J Clin Pract Suppl* (165), S. 7–12. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1742-1241.2009.02232.x.

Toshner, M. R.; Upton, P. D.; Pepke-Zaba, J.; Morrell, N. W. (2009a): Late Outgrowth Progenitor Cells Are Dysfunctional in Pulmonary Arterial Hypertension with BMPRII Mutation. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (179).

Toshner, Mark; Voswinckel, Robert; Southwood, Mark; Al-Lamki, Rafia; Howard, Luke S. G.; Marchesan, Denis et al. (2009b): Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (8), S. 780–787. Online verfügbar unter doi:10.1164/rccm.200810-1662OC.

Tuder, Rubin M.; Abman, Steven H.; Braun, Thomas; Capron, Frédérique; Stevens, Troy; Thistlethwaite, Patricia A.; Haworth, Sheila G. (2009): Development and pathology of pulmonary hypertension. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (1 Suppl), S. S3-9. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2009.04.009.

Urbich, Carmen; Dimmeler, Stefanie (2004): Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. In: *Circ. Res.* 95 (4), S. 343–353. Online verfügbar unter doi:10.1161/01.RES.0000137877.89448.78.

Vasa, M.; Fichtlscherer, S.; Adler, K.; Aicher, A.; Martin, H.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S. (2001): Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. In: *Circulation* 103 (24), S. 2885–2890.

Voswinckel, R.; Reichenberger, F.; Gall, H.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Ghofrani, H. A. (2009): [Therapy of pulmonary arterial hypertension]. In: *Internist (Berl)* 50 (9), S. 1101-2, 1104-9. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00108-009-2336-8.

Wang, Xing-Xiang; Zhang, Fu-Rong; Shang, Yun-Peng; Zhu, Jun-Hui; Xie, Xu-Dong; Tao, Qian-Min et al. (2007): Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 49 (14), S. 1566–1571. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jacc.2006.12.037.

Wensel, Roland; Opitz, Christian F.; Anker, Stefan D.; Winkler, Jörg; Höffken, Gert; Kleber, Franz X. et al. (2002): Assessment of survival in patients with primary pulmonary hypertension: importance of cardiopulmonary exercise testing. In: *Circulation* 106 (3), S. 319–324.

Werner, Nikos; Kosiol, Sonja; Schiegl, Tobias; Ahlers, Patrick; Walenta, Katrin; Link, Andreas et al. (2005): Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. In: *N. Engl. J. Med.* 353 (10), S. 999–1007. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa043814.

Yang JX, Pan YY Zhao YY Wang XX (2013): Endothelial progenitor cell-based therapy for pulmonary arterial hypertension. In: *Cell Transplant* 22 (8), S. 1325–1336. Online verfügbar unter doi:10.3727/096368912X659899.

Yao, Weijuan; Firth, Amy L.; Sacks, Richard S.; Ogawa, Aiko; Auger, William R.; Fedullo, Peter F. et al. (2009): Identification of putative endothelial progenitor cells (CD34+CD133+Flk-1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 296 (6), S. L870-8. Online verfügbar unter doi:10.1152/ajplung.90413.2008.

Yeager, Michael E.; Frid, Maria G.; Stenmark, Kurt R. (2011): Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling. In: *Pulm Circ* 1 (1), S. 3–16. Online verfügbar unter doi:10.4103/2045-8932.78095.

Zhao, Yidan D.; Courtman, David W.; Deng, Yupu; Kugathasan, Lakshmi; Zhang, Qiuwang; Stewart, Duncan J. (2005): Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. In: *Circ. Res.* 96 (4), S. 442–450. Online verfügbar unter doi:10.1161/01.RES.0000157672.70560.7b.

Zhu, Jun Hui; Wang, Xing Xiang; Zhang, Fu Rong; Shang, Yun Peng; Tao, Qian Min; Zhu, Jian Hua; Chen, Jun Zhu (2008): Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. In: *Pediatr Transplant* 12 (6), S. 650–655. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1399-3046.2007.00863.x.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Mittleres Überleben der Patienten mit PAH in Abhängigkeit von der Ätiologie..... | 14 |
| Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau des Durchflusszytometers BD FACSCalibur™ | 28 |
| Abbildung 2.2: Identifizierung der lymphozytenartigen Zellen | 30 |
| Abbildung 2.3: Negativkontrolle Isotyp-APC-Ak und CD34-PE-Ak..... | 31 |
| Abbildung 2.4: Darstellung einer CD34-PE-positiven und KDR-APC-positiven Probe.. | 32 |
| Abbildung 3.1: Relative Anzahl der EPC bei den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv | 38 |
| Abbildung 3.2: Relative Anzahl der EPC bei den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv (ohne Abzug der Zellen der KDR-Negativkontrolle) ... | 39 |
| Abbildung 3.3: Relative Anzahl der CD34 ⁺ -Zellen bei den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv | 41 |
| Abbildung 3.4: 6-Minuten-Gehstrecke der einzelnen Patientengruppen | 42 |
| Abbildung 3.5: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. zurückgelegte Gehstrecke im 6MWT | 43 |
| Abbildung 3.6: BNP-Spiegel der einzelnen Patientengruppen | 44 |
| Abbildung 3.7: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. BNP-Spiegel | 45 |
| Abbildung 3.8: mPAP-Werte der einzelnen Patientengruppen..... | 47 |
| Abbildung 3.9: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. mPAP | 48 |
| Abbildung 3.10: CI-Werte der einzelnen Patientengruppen | 49 |
| Abbildung 3.11: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. CI..... | 50 |
| Abbildung 3.12: PVRI-Werte der einzelnen Patientengruppen..... | 51 |
| Abbildung 3.13: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. PVRI | 52 |
| Abbildung 3.14: Verlaufswert der zurückgelegten Wegstrecke im 6MWT der einzelnen Patientengruppen | 54 |
| Abbildung 3.15: Prozentuale Veränderung der Gehstrecke im 6MWT der einzelnen Patientengruppen | 54 |
| Abbildung 3.16: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung der Gehstrecke im 6MWT | 55 |
| Abbildung 3.17: Verlaufswert des BNP-Spiegels der einzelnen Patientengruppen | 57 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.18: Absolute Differenz des BNP-Spiegels der einzelnen Patientengruppen | 57 |
| Abbildung 3.19: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. absolute Veränderung des BNP-Spiegels | 58 |
| Abbildung 3.20: Verlaufswert des mPAP der einzelnen Patientengruppen | 60 |
| Abbildung 3.21: Prozentuale Veränderung des mPAP der einzelnen Patientengruppen | 60 |
| Abbildung 3.22: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung des mPAP bei allen Patienten | 61 |
| Abbildung 3.23: Verlaufswert des CI der einzelnen Patientengruppen..... | 62 |
| Abbildung 3.24: Prozentuale Veränderung des CI der einzelnen Patientengruppen | 63 |
| Abbildung 3.25: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung des CI bei allen Patienten..... | 63 |
| Abbildung 3.26: Verlaufswert des PVRI der einzelnen Patientengruppen | 65 |
| Abbildung 3.27: Prozentuale Veränderung des PVRI der einzelnen Patientengruppen | 65 |
| Abbildung 3.28: Korrelation relative Anzahl der EPC vs. prozentuale Veränderung des PVRI bei allen Patienten | 66 |
| Abbildung 3.29: <i>Time to Clinical Worsening</i> der einzelnen Patientengruppen und des Gesamtkollektivs..... | 68 |
| Abbildung 3.30: Relative Anzahl der EPC von Patienten mit und ohne Statineinnahme im Gesamtkollektiv | 69 |

8.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1.1: Aktualisierte klinische Klassifikation der PH (nach Dana Point, 2008) | 3 |
| Tabelle 1.2: Funktionelle NYHA-Stadien der PH..... | 7 |
| Tabelle 1.3: Prognostische Parameter..... | 15 |
| Tabelle 1.4: Die gebräuchlichsten Ak zur Bestimmung der zirkulierenden EPC..... | 17 |
| Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper..... | 22 |
| Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien | 22 |
| Tabelle 2.3: Verwendete Geräte | 23 |
| Tabelle 2.4: Verwendete Gebrauchsmaterialien | 24 |
| Tabelle 2.5: Verwendetes Material für das Durchflusszytometer..... | 24 |
| Tabelle 2.6: Verwendete Lösungen und Puffer | 25 |
| Tabelle 2.7: Verwendete Software | 25 |
| Tabelle 2.8: Verwendete Fluorchromkonjugate mit den entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren..... | 28 |
| Tabelle 2.9: Zuweisung der NYHA-Stadien anhand der zurückgelegten Gehstrecke im 6MWT | 33 |
| Tabelle 3.1: Anzahl, Alter und Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs und der Kontrollgruppe | 35 |
| Tabelle 3.2: Therapie der Patientengruppen..... | 36 |
| Tabelle 3.3: Deskriptive Statistik der relativen Anzahl der EPC der Kontroll- und Patientengruppen | 37 |
| Tabelle 3.4: Deskriptive Statistik der relativen Anzahl der EPC der Kontroll- und Patientengruppen (ohne Abzug der Zellen der KDR-Negativkontrolle)..... | 39 |
| Tabelle 3.5: Deskriptive Statistik der relativen Anzahl der CD34 ⁺ - Zellen der Kontroll- und Patientengruppen..... | 40 |
| Tabelle 3.6: Zurückgelegte Gehstrecken im 6MWT und NYHA-Stadien der Patientengruppen | 42 |
| Tabelle 3.7: BNP-Spiegel der Patientengruppen | 44 |
| Tabelle 3.8: Hämodynamische Parameter der Patientengruppen | 46 |
| Tabelle 3.9: Verlaufswert der Gehstrecke im 6MWT und prozentuale Veränderung der Gehstrecke im 6MWT der Patientengruppen | 53 |
| Tabelle 3.10: Verlaufswerte des BNP-Wertes und absolute Veränderung des BNP- Spiegels der einzelnen Patientengruppen..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 3.11: Verlaufswerte des mPAP und prozentuale Veränderung des mPAP der einzelnen Patientengruppen | 59 |
| Tabelle 3.12: Verlaufswerte des CI und prozentuale Veränderung des CI der Patientengruppen | 62 |
| Tabelle 3.13: Verlaufswerte des PVRI und prozentuale Veränderung des PVRI der Patientengruppen | 64 |
| Tabelle 3.14: <i>Time to Clinical Worsening</i> der Patientengruppen..... | 67 |

8.3 Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| Ak | Antikörper |
| ALK-1 | activin receptor-like kinase 1 gene |
| APC | Allophycocyanin |
| BMP | bone morphogenetic protein |
| BMPR2 | bone morphogenetic protein receptor type 2 |
| BNP | brain natriuretic peptide |
| CD | cluster of differentiation |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cGMP | Zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CI | Herzzeitvolumen-Index (cardiac index) |
| cm | Zentimeter |
| CTEPH | Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie |
| CVP | Zentraler Venendruck (central venous pressure) |
| dyn | Dyn(e), beschriebene Größe: Kraft |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| eNOS | Endotheliale NO-Synthase |
| EPC | Endotheliale Progenitorzellen |
| EOC | endothelial outgrowth cells |
| ERA | Endothelinrezeptorantagonisten |
| ET-1 | Endothelin-1 |
| ET _A | Endothelin-Rezeptor Typ A |
| ET _B | Endothelin-Rezeptor Typ B |
| FACS | Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (fluorescent activated cell sorting) |
| FSC | Vorwärtsstreulicht (forward scatter) |

| | |
|----------------|---|
| HPAH | Hereditäre pulmonalarterielle Hypertonie |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HZV | Herzzeitvolumen |
| IPAH | Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie |
| Ig | Immunglobulin |
| IQR | Interquartilsabstand |
| i.v. | Intravenös |
| KDR | kinase insert domain receptor |
| l | Liter |
| m | Meter |
| MCT | Monocrotalin |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| mPAP | Pulmonalarterieller Mitteldruck |
| n | Anzahl |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NT-proBNP | n-terminal pro-brain natriuretic peptide |
| NYHA | New York Heart Association |
| O ₂ | Sauerstoff |
| P | Patient |
| PAH | Pulmonalarterielle Hypertonie |
| PAP | Pulmonalarterieller Druck |
| PAWP | Pulmonalarterieller Verschlussdruck (pulmonary artery wedge pressure) |
| PCH | Pulmonale kapilläre Hämangiomatose |

| | |
|-------------------|---|
| PDE _{5i} | Phosphodiesterase-5-Inhibitor |
| PE | R-phycoerythrin |
| PEA | Pulmonale Endarterektomie |
| PGI ₂ | Prostazyklin |
| PH | Pulmonale Hypertonie |
| paO ₂ | Arterieller Sauerstoff-Partialdruck |
| PPH | Primäre pulmonale Hypertonie |
| PVOD | Pulmonale venookklusive Erkrankung |
| PVR | Pulmonale Gefäßwiderstand |
| PVRI | Pulmonaler Gefäßwiderstand- Index |
| R | Region |
| RAP | Rechtsatrialer Druck |
| rel. Δ | Relative Differenz |
| RHK | Rechtsherzkatheter |
| rpm | rounds per minute |
| s | Sekunde |
| SD | Standardabweichung |
| SSC | Seitwärtsstreulicht (sideward scatter) |
| SvO ₂ | Zentralvenöse Sauerstoffsättigung |
| TAPSE | tricuspid anular plane systolic excursion |
| TGF-β | transforming growth factor-β |
| VEGF R2 | vascular endothelial growth factor receptor-2 |
| vs. | versus |
| WHO | World Health Organisation |
| WHO-FC | Funktionelle WHO-Klassifikation |
| 6MWT | 6-Minuten-Gehtest (6-minute walking test) |

| | |
|---------------|----------------|
| μl | Mikroliter |
| $^{\circ}$ | Winkelgrad |
| $<$ | kleiner |
| $>$ | größer |
| \leq | kleiner gleich |
| \geq | größer gleich |

8.4 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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.“

8.5 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Voswinckel für die Überlassung des Themas, die fachliche und zu jeder Zeit freundliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. W. Seeger danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Promotion an seiner Klinik sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ein außerordentlicher Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Gesa Hild, Kirsten Szelepusa und Sabine Gräf-Höchst, für die kooperative Zusammenarbeit und schöne Arbeitsatmosphäre.

Meinem Bruder Steffen Mücke danke ich herzlich für die zahlreichen Hilfestellungen bei der Formatierung der Arbeit. Weiterhin danke ich Boris Lemmer für die Unterstützung bei statistischen Fragestellungen. Heidrun und Hartmut Saß danke ich sehr für ihr gründliches Korrekturlesen.

Danke an meine Doko-Mädels, Vera, Mira und Eva, für die Ablenkung und vielen schönen gemeinsamen Stunden. Ich hoffe, es werden noch einige folgen!

Meiner Familie danke ich von Herzen für ihre bedingungslose Unterstützung und stetige Motivation.

Benni, dir gebührt mein größter Dank. Ohne deine unerschöpfliche Geduld und deinen uneingeschränkten Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein aufrichtiger Dank gilt allen Probanden für das Mitwirken an der Doktorarbeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6113-5



9 783835 196113 5