

**sFlt-1 als diagnostischer Biomarker bei pulmonaler
Hypertonie**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus- Liebig- Universität Gießen

Vorgelegt von Julia Meier
aus Bitburg

Gießen 2015

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
der Universitätsklinik Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen
Leiter: Professor Dr. med. Werner Seeger

Betreuer: Prof. Dr. Ghofrani
Gutachterin: Frau Prof. Dr. Tikkanen
Prüfungsvorsitz: Frau Prof. Dr. Rohrbach
Prüfungsmitglied: Prof. Dr. Müller
Tag der Disputation: 19.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. Pulmonale Zirkulation.....	5
1.1. Physiologische pulmonale Zirkulation.....	5
1.2. Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie	5
1.3. Pathophysiologische Veränderungen	8
1.4. Klinik der pulmonalen Hypertonie	8
1.5. Diagnostik.....	9
1.5.2. Thoraxröntgenuntersuchung.....	10
1.5.3. Lungenfunktionsdiagnostik.....	10
1.5.4. Labor.....	10
1.5.5. Echokardiographie.....	11
1.5.6. Rechtsherzkatheter	12
1.6. Therapie der pulmonalen Hypertonie	13
1.6.1. Basistherapie	13
1.6.2. Spezifische Therapie.....	14
2. Biomarker	14
2.1. Definition Biomarker	14
2.2. Spezifische Biomarker in der pulmonalen Hypertonie	15
2.2.1 Brain natriuretic peptide (BNP)	15
2.2.2 Troponin	16
2.2.3 Harnsäure	17
2.2.4 Endothelin-1	17
2.2.5 Stickstoff- Monoxid(NO)-Metabolismus.....	18
2.2.6 Serotonin.....	19
3. sFlt-1 und VEGF.....	19
3.1. VEGF	20
3.2. sFlt-1	21
4. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	23

Material und Methoden

1. Studienkollektiv	24
2. Studienprotokoll	25
3. Methoden	25
3.1. Erfassung klinischer Parameter	25
3.1.1. Einteilung des Schweregrades der Dyspnoe	25
3.1.2. Borg-Dyspnoe-Skala	26
3.1.3. Dyspnoe-Index nach Mahler.....	26
3.1.4. 6-Minuten-Gehtest	27

3.2. Echokardiographie	27
3.3. Blutentnahme.....	27
3.4. Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA).....	28
4. Materialien	29
5. Statistische Auswertung	30
<u>Ergebnisse</u>	
1. Studienkollektiv	31
1.1. Demographische Daten	31
1.2. Echokardiographische Zuteilung	31
1.3. Klinische Parameter	32
2. sFlt zentrale vs. periphere Blutentnahme	34
3. Diagnostischer Vorhersagewert von sFlt	35
4. sFlt als Differenzierungsmarker zwischen Patienten mit PH und Patienten ohne PH.....	36
4.1. Sensitivität und Spezifität von sFlt	36
4.2. Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve für sFlt	37
5. Diagnostische Wertigkeit von BNP im Vergleich mit sFlt	38
<u>Diskussion</u>.....	39
Studienkollektiv.....	39
VEGF	41
sFlt-1	43
Unterschiedliche sFlt-1 Spiegel in zentralen und peripheren Proben.....	44
Sensitivität und Spezifität von sFlt.....	45
Wertigkeit von sFlt im Vergleich zu BNP	45
Zusammenfassung	47
Abkürzungsverzeichnis	50
Literaturverzeichnis	52
Anhang	64
Erklärung zur Dissertation	
Danksagung	
Lebenslauf	

Einleitung

1. Pulmonale Zirkulation

1.1. Physiologische pulmonale Zirkulation

Die pulmonale Strombahn unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von den Strombahnen anderer Organe. Sie wird auch als „Niederdrucksystem“ bezeichnet und ist im Vergleich zur systemischen Zirkulation durch einige Besonderheiten gekennzeichnet. Der systolische pulmonal-arterielle Druck (PAPs) beträgt 15-30 mmHg, der mittlere pulmonal-arterielle Druck (PAPm) 12-20 mmHg und der pulmonal-kapilläre Verschlussdruck (PCWP) <12 mmHg. Im Gegensatz zur systemischen Zirkulation ist die pulmonale Gefäßstrombahn durch die Fähigkeit charakterisiert, den Druck in der A. pulmonalis unter körperlicher Belastung trotz einer Steigerung des Blutflusses weitgehend konstant zu halten. Dies wird zum einen durch die Rekrutierung von unter Ruhebedingungen nur minimal perfundierten Gefäßarealen, insbesondere in den Lungenoberfeldern, zum anderen durch eine aktive Vasodilatation pulmonaler Gefäße erzielt (Erdmann 2009).

Muskuläre Arterien, bereits innerhalb der Regulationseinheiten der Azini gelegen, gehen über teilmuskularisierte Gefäße in nicht muskularisierte Gefäße über. Dadurch resultiert ein niedriger Perfusionswiderstand. Der größte Unterschied in der Regulation ist die hypoxische Vasokonstriktion als autonome Leistung der pulmonalen Strombahn im Gegensatz zur hypoxischen Vasodilatation vieler autonom regulierter Organe der systemischen Zirkulation (Olschewski et al. 1999).

1.2. Definition und Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwere Erkrankung der pulmonalen Strombahn. Sie ist gekennzeichnet durch eine anhaltende Erhöhung des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks (mPAP) auf > 25 mmHg in Ruhe (Galiè et al. 2004, Badesch et al. 2009), sowie einem erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand auf > 3 mmHg/l/min (Wood-Einheit) (Badesch et al. 2009, Rosenkranz 2006). mPAP- Werte bis 20 mmHg gelten als normal und bei Werten zwischen 21 und <25 mmHg spricht man von einer grenzwertigen pulmonalen Hypertonie, der sog. „Borderline- PH“. Für die Unterteilung der PH in verschiedene ätiologische Klassen unterscheidet man zwischen den prä- und den post-kapillären Formen der PH. Die Gruppe 2 nach WHO ist

die pulmonal-venöse Hypertonie, welche sich durch einen PAWP > 15 mmHg auszeichnet. Sämtliche andere Formen sind durch einen PAWP ≤15 mmHg definiert (Badesch et al. 2009). Diese Definition basiert auf invasiven Messungen mittels Rechtsherzkatheter. Die Doppler-Echokardiographie als initiales „Screening“-Instrument ist im Rahmen differentialdiagnostischer Untersuchungen an erste Stelle gerückt. Hier liegt ein Hinweis auf eine PH vor, wenn der geschätzte systolischen pulmonal-arteriellen Druck > 36 mmHg in Ruhe übersteigt, oder andere Hinweise auf eine PH vorliegen (Grünig et al. 2010).

Eine Vielzahl von Ursachen können zum Krankheitsbild der pulmonalen Hypertonie führen. Daher ist eine ätiologische Einteilung notwendig. Seit den „World Symposia on Primary Pulmonary Hypertension“ in Evian 1998, in Venedig 2003 und in Dana Point 2008 wurde die Nomenklatur und Klassifikation nach klinischen, pathophysiologischen und therapeutischen Kriterien neu erarbeitet. Die neue Klassifikation ist primär klinisch orientiert und ermöglicht eine genauere Einteilung der verschiedenen pathologischen Ursachen der PH. Der Begriff der primären pulmonalen Hypertonie wurde durch den der idiopathischen pulmonalen Hypertonie (iPAH) ersetzt. Es ist jedoch zu beachten, dass die idiopathische als auch die familiäre PAH eine Ausschlussdiagnose sind, wenn alle anderen möglichen Ursachen nicht festgestellt werden können.

Eine Übersicht der WHO-Klassifikation von Dana Point 2008 zeigt Tabelle 1.

1. Pulmonal- arterielle Hypertension (PAH)

1.1. Idiopathische PAH (iPAH)

1.2. Hereditäre PAH (hPAH)

1.2.1. BMPR2

1.2.2. ALK1, Endoglin (mit oder ohne hereditäre hämorrhagische Teleangiectasien)

1.2.3. unbekannt

1.3. Assoziiert mit Medikamenten und Giftstoffen

1.4. Assoziiert mit

1.4.1. Bindegewebserkrankungen

1.4.2. HIV-Infektion

1.4.3. portaler Hypertension

1.4.4. kongenitalen Herzerkrankungen

1.4.5. Schistosomias

1.4.6. chronischer hämolytischer Anämie

1.5. Persistierende pulmonale Hypertension beim Neugeborenen

1' Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre

Hämangiomatose (PCH)

2. Pulmonale Hypertension bei Erkrankungen des linken Herzens

2.1. Systolische Dysfunktion

2.2. Diastolische Dysfunktion

2.3. Klappenerkrankungen

3. Pulmonale Hypertension bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

3.1. Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung

3.2. Interstitielle Lungenerkrankung

3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischter restriktiver and obstruktiver Komponente

3.4. Schlafapnoesyndrom

3.5. Alveoläre Hypoventilation

3.6. Chronische Höhenkrankheit

3.7. Anlagebedingte Fehlbildungen

4. Chronisch-thromboembolische pulmonale Hypertension (CTEPH)

5. Pulmonale Hypertension unklarer multifaktorieller Mechanismen

5.1. Hämatologische Erkrankungen: myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie

5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell-Histiozytose: Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis

5.3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheiten, Gaucher-Erkrankung, Schilddrüsenerkrankungen

5.4. Andere (Tumor, Mediastinitis, dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz)

Tab.1: Überarbeitete WHO- Klassifikation der PH von 2008 (Simonneau et al. 2009)

1.3. Pathophysiologische Veränderungen

Die pulmonal- arterielle Hypertonie ist histologisch betrachtet eine Erkrankung der kleinen Pulmonalarterien, bei der es zu einer progredienten Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstands kommt. Dabei stehen 1. die Vasokonstriktion, 2. der chronische Gefäßumbau („Remodeling“) und 3. die Thrombosierung in situ als entscheidende Faktoren im Vordergrund (Humbert et al. 2004). Der Prozess des pulmonalen Gefäßumbaus resultiert aus einem Ungleichgewicht apoptotischer und proliferativer Vorgänge und geht hauptsächlich mit einer Endotheldysfunktion und der Aktivierung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen einher. Endotheliale Zellen sind die Hauptregulatoren der Gefäße. Bei der Endotheldysfunktion kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Freisetzung von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren. Auch die Aktivierung und Inhibition von Wachstumsfaktoren wie bFGF, Transforming-growth-factor- β (TGF- β), Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Platelet-derived growth factor (PDGF) der glatten Muskelzellen stehen nicht mehr im Gleichgewicht, was zu einer Zunahme der Mediadicke durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führt. Das Verhältnis zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Signalen, ist gestört (Morrell et al. 2009, Rosenkranz 2006).

Der erhöhte pulmonale Gefäßwiderstand und der erhöhte pulmonal-arterielle Druck führt zu einer zunehmenden Rechtsherzbelastung mit Hypertrophie des rechten Ventrikels, dem sog. Cor pulmonale. Im Verlauf der Erkrankung kommt es rasch zu einem chronischen Rechtsherzversagen und Tod (Steiner et al. 2009).

1.4. Klinik der pulmonalen Hypertonie

Die Symptome sind in der Regel unspezifisch und nur schwer von denen anderen Herz- und Lungenerkrankungen abzugrenzen. Deshalb wird eine PH meist erst in späten Stadien erkannt. Leitsymptom der pulmonalen Hypertonie ist die Dyspnoe, die zunächst nur bei körperlicher Belastung auftritt, im Verlauf der Erkrankung aber stetig zunimmt

bis hin zur Ruhedyspnoe. Weitere typische Symptome sind Zyanose, Abgeschlagenheit, periphere Ödeme, Angina pectoris und im fortgeschrittenen Krankheitsstadium Synkopen (Rabinovitch 2008, Gaine et al. 1998). Der Schweregrad der Dyspnoe entspricht nach der WHO weitgehend der NYHA-Klassifikation der Herzinsuffizienz (Leschke et al. 2009).

Modifizierte Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) in Bezug auf die pulmonale Hypertonie:

NYHA I: Patient mit PH ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu Dyspnoe und Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Synkopen.

NYHA II: Patient mit PH mit leichter Einschränkung der Belastbarkeit. Die Patienten sind in Ruhe beschwerdefrei. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit.

NYHA III: Patient mit PH und deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Die Patienten sind in Ruhe beschwerdefrei. Bereits geringe körperliche Aktivität führt zu Dyspnoe und Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.

NYHA IV: Patient mit PH und Ruhebeschwerden, damit Unfähigkeit, irgendwelche körperlichen Belastungen ohne Beschwerden auszuführen. Die Patienten weisen Zeichen einer manifesten Rechtsherzinsuffizienz auf. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt (Barst et al. 2004, Leschke et al. 2009).

1.5. Diagnostik

1.5.1. Elektrokardiogramm

Zur technischen Basisdiagnostik der pulmonalen Hypertonie zählt das Elektrokardiogramm, das die rechtsventrikuläre Hypertrophie bei 87% und die elektrische Herzachsendrehung bei 79% der manifesten IPAH- Patienten zeigt (Barst et al. 2004). Als Screeningmethode einer signifikanten PAH hat das EKG eine Sensitivität von 55% und eine Spezifität von 70% (Ahearn et al. 2002). Als typischer EKG-Befund bei manifester PAH zeigt sich meist ein Rechts- oder überdrehter Rechtstyp mit tiefem S in den Ableitungen V5-V6, ein inkompletter oder kompletter Rechtsschenkelblock, horizontale ST-Streckensenkungen in den Ableitungen II, III und aVF, sowie T-Negativierungen in V2-V4 (Leschke et al. 2009). Da diese EKG-Veränderungen erst in

dem Stadium der manifesten Rechtsherzhypertrophie auftreten, eignet sich die Echokardiographie jedoch nicht zur Frühdiagnose einer pulmonalen Hypertonie.

1.5.2. Thoraxröntgenuntersuchung

Zur weiteren Basisdiagnostik zählt die Thoraxröntgenuntersuchung in 2 Ebenen. Typisch für die pulmonale Hypertonie sind dilatierte zentrale Pulmonalarterien, wobei die Pars descendens der rechten Pulmonalarterie in Höhe des Zwischenbronchus einen Durchmesser von >18 mm aufweist, sowie Kalibersprünge zu den engen peripheren Lungenarterien und ein prominenter Pulmonalisbogen. Die Hypertrophie des rechten Herzens ist durch einen verkleinerten Retrosternalraum bzw. durch eine verlängerte sternale Kontaktfläche zu erkennen. Das Lungenparenchym ist bei der PAH meist normal (Schannwell et al. 2007).

1.5.3. Lungenfunktionsdiagnostik

Die Lungenfunktionsuntersuchung kann eine leichte restriktive Ventilationsstörung oder eine geringe periphere Atemwegsobstruktion aufweisen, fällt jedoch meist normal aus. Ist die Lungenfunktion massiv verändert, handelt es sich eher um eine pulmonale Hypertonie als Folge einer Lungenerkrankung. Bei der Blutgasanalyse ist der arterielle pCO₂ infolge der Hyperventilation meist leicht erniedrigt; der arterielle pO₂ kann in Abhängigkeit des Schweregrades der PH sehr unterschiedlich ausfallen (Galiè et al. 2004, Leschke et al. 2009).

1.5.4. Labor

Bei allen Patienten mit Verdacht auf PH sollte ein Laborscreening erfolgen, um eventuelle Differentialdiagnosen auszuschließen bzw. um eine möglichst eindeutige Zuordnung ins Klassifikationsschema der PH zu erlangen. Cardiolipinantikörper können auf eine chronisch thromboembolische pulmonalarterielle Hypertonie (CTEPH) hindeuten, bei Kollagenosen können SSA-, SCL-70-, Zentromer- und DNA-Antikörper nachgewiesen werden, aber auch bei der familiären und der idiopathischen Form sind niedrigtitrige antinukleäre Autoantikörper (ANA) nachweisbar. Ebenfalls hilfreich kann die Bestimmung der Leberenzyme und bei entsprechenden Risikogruppen ein HIV-Test

sein (Barst et al. 2004, Schwannwell et al. 2007, Leschke et al. 2009). Plasmaspiegel des Biomarkers „brain natriuretic peptide“ (BNP) und des NT-proBNP dienen als prognostischer Marker der pulmonalen Hypertonie und korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung. (Mehr dazu unter Biomarker bei pulmonaler Hypertonie).

1.5.5. Echokardiographie

Die wichtigste, nicht-invasive Methode stellt die transthorakale Echokardiographie dar. Sie dient der ätiologischen Abklärung, der Prognose- und Verlaufsbeurteilung und zur Screeningdiagnostik. Mit der Doppler-Echokardiographie kann die hämodynamische Situation zentralvenös, im rechten Vorhof und Ventrikel und in den zentralen Abschnitten der Pulmonalgefäße untersucht werden. Die Bestimmung von Flussgeschwindigkeiten in der Systole und Diastole, sowie die Beurteilung der Flussrichtung und der Zeitintervalle sind möglich. Die echokardiographischen Zeichen einer manifesten pulmonalen Hypertonie sind ein hypertrophierter und dilatierter rechter Ventrikel, eine paradoxe Septumbewegung, ein dilatierter rechter Vorhof und eine erweiterte Vena cava inferior mit fehlendem inspiratorischem Kollaps. Bei Trikuspidalinsuffizienz kann mittels kontinuierlicher (cw) Doppler-Echokardiographie der systolische rechtsventrikuläre und pulmonalarterielle Druck abgeschätzt werden (Olschewski et al. 2006, Leschke et al. 2009, Galiè et al. 2004, Rosenkranz 2006). Die Trikuspidalinsuffizienz stellt sich als eine vom Schallkopf weggerichtete systolische Regurgitation innerhalb des rechten Vorhofs dar. Der systolische Druckgradient zwischen rechtem Ventrikel und rechtem Vorhof kann aus der Maximalgeschwindigkeit des Regurgitationsjets (v) über der insuffizienten Trikuspidalklappe mittels der vereinfachten Bernoulli-Gleichung $\Delta p \sim 4 v^2$ berechnet werden. (Die Maximalgeschwindigkeit des Trikuspidalrefluxjets beträgt normal $< 2,8$ m/s, zwischen $2,8 - 3,4$ m/s ist es eine leichte PH und $> 3,4$ m/s eine mittelgradige PH (Olschewski et al. 2006)). Zu diesem Druckgradient muss der rechtsatriale Druck (RAP) addiert werden, der folgendermaßen abgeschätzt werden kann: 5 mmHg werden dazuaddiert, wenn die Vena cava inferior einen Durchmesser von weniger als 20 mm aufweist und bei Inspiration mehr als 50% kollabiert; 10 mmHg bei einem Durchmesser weniger als 20 mm und bei Inspiration die Vena cava inferior weniger als 50% kollabiert, 15 mmHg bei einem Durchmesser größer als 20 mm und inspiratorischem Kollaps von mehr als 50%, 20 mmHg bei einem Durchmesser größer als 20 mm und Kollaps der Vena cava

inferior bei Inspiration unter 50% (Fisher et al. 2009, Mereles et al. 2006, Schwannwell et al. 2007, Olschewski et al. 2006, Kircher et al. 1990). Um die systolische Funktion des rechten Ventrikels zu beurteilen, eignet sich die echokardiographische Messung der sog. TAPSE (tricuspid anular plane systolic excursion). Die Messung der TAPSE erfolgt im apikalen 4-Kammerblick, wobei der M-Mode durch den lateralen Trikuspidalklappenannulus gelegt wird und die longitudinale Exkursion des Trikuspidalklappenannulus zum Apex während der Systole bestimmt wird. Die TAPSE ist ein relativ robuster Wert, der direkt mit der rechtsventrikulären Funktion korreliert. Als Faustregel kann die rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion nach der Formel RV-EF (in %) = TAPSE x 3,2 geschätzt werden. Die TAPSE wird in Millimetern angegeben und liegt bei einer normalen Herzfunktion über 17 mm. Bei Werten unter 17 mm liegt eine rechtsventrikuläre Dysfunktion vor und Werte unter 14 mm gehen mit einer schlechten Prognose einher (Habib et al. 2010, Mereles et al. 2006, Leschke et al. 2009, Rudski et al. 2010, Ghio 2006, Forfia et al. 2006). Der Tei-Index oder myocardial performance index (MPI) ist ein Parameter, der die Ventrikelfunktion erfasst. Er kann sowohl für den linken als auch für den rechten Ventrikel bestimmt werden. Der Tei-Index des rechten Ventrikels wird mittels PW (pulsed wave)-Dopplermessung im rechtsventrikulären Ein- und Ausflusstrakt ermittelt und ergibt sich aus der Summe der isovolumetrischen Kontraktionszeit und der Relaxationszeit, dividiert durch die Ejektionsdauer. Ein Tei-Index über 0,40 weisen auf eine rechtsventrikuläre Dysfunktion hin (Tei et al. 1995, Mereles 2006, Blanchard et al. 2009, Boissiere et al. 2005, Vonk et al. 2007, Olschewski et al. 2006; Lakoumentas et al. 2005).

1.5.6. Rechtsherzkatheter

Die Rechtsherzkatheteruntersuchung stellt als invasive Methode den Goldstandard in der Diagnostik der pulmonalarteriellen Hypertonie dar und wird in den Leitlinien zur definitiven Diagnosestellung gefordert. Bei dem Rechtsherzkatheter handelt es sich um einen Ballon-Einschwemmkatheter, auch Swan-Ganz-Katheter genannt, der mittels Seldinger Technik bevorzugt in die Vena jugularis interna eingeführt wird und über die Vena cava superior, den rechten Vorhof und den rechten Ventrikel bis in eine Pulmonalarterie 4. oder 5. Ordnung eingeschwemmt wird. In dieser Position besteht die Möglichkeit, mit dem Ballon an der Katheterspitze die Pulmonalarterie zu verschließen und den pulmonalarteriellen Verschlussdruck (PCWP, Wedge-Druck) zu messen, der

dem pulmonalvenösen Druck entspricht. Dadurch ist die Abschätzung des linksatrialen Drucks möglich. Die Rechtsherzkatheteruntersuchung ist die einzigste Methode, um den systolischen, diastolischen und mittleren pulmonalarteriellen Druck (PAPm) direkt zu messen. Die Messung des Herzzeitvolumens (HZV) kann durch die Oxymetrie nach der Fick'schen Methode und auch mittels Thermodilution durchgeführt werden. Aus den gemessenen Druckwerten und dem Herzzeitvolumen (HZV) wird der pulmonale Gefäßwiderstand (PVR), der eine entscheidende Rolle in der Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie spielt, nach folgender Formel berechnet: $PVR = (PAPm - PCWPm) / HZV \times 80 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$. Im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung kann eine pharmakologische Testung mit kurzwirksamen Vasodilantien erfolgen, um die Wirkung verschiedener Substanzgruppen auf den pulmonalen Druck und den Gefäßwiderstand vor Beginn einer gezielten medikamentösen Therapie zu testen und kontrollieren (Böhm et al. 2006, Galiè et al. 2004, Leschke et al. 2009, Olschewski et al. 2006).

1.6. Therapie der pulmonalen Hypertonie

1.6.1. Basistherapie

Bei einigen Formen der pulmonalarteriellen Hypertonie, wie z.B. bei PAH bei Kollagenosen, bei HIV-Infektionen oder bei der portopulmonalen Hypertonie ist es für den Verlauf günstig, zunächst die Grunderkrankung optimal zu therapieren. Zur Vermeidung von Mikrothromben und in-situ Thrombosierung werden niedrig dosierte Antikoagulantien, besonders Vitamin-K-Antagonisten mit dem Ziel-INR-Wert von 1,5-2,0 eingesetzt. Diuretika sind bei Patienten mit Zeichen der Rechtsherzbelastung indiziert, um die Volumenbelastung des rechten Herzens zu reduzieren. Da die Hypoxie ein bedeutender Faktor bei der Vasokonstriktion ist, sollte eine Langzeitsauerstofftherapie bei arteriellen pO_2 -Werten $<65 \text{ mmHg}$ durchgeführt werden bzw. die arterielle Sättigung sollte über 90% gehalten werden. Regelmäßige Impfungen gegen Pneumokokken und Influenza werden empfohlen (Voswinkel et al. 2009, McGoon et al. 2009, Galiè et al. 2004, Barst et al. 2009).

1.6.2. Spezifische Therapie

Der Therapiealgorithmus ist nach NYHA-Stadien aufgeteilt. In den NYHA-Stadien I-III können Patienten mit idiopatischer oder familiärer PAH mit Kalziumantagonisten behandelt werden, sofern sie zu den sog. Respondern gehören. Responder werden durch eine Vasoreagibilitätstestung während einer Rechtsherzkatheteruntersuchung mit einem kurzwirksamen Vasodilatanz, meist 20-40ppm inhaliertes Stickstoffmonoxid (NO), ermittelt. Dabei muss es zu einem Abfall des PAPm um mindestens 10 mmHg bei gleichzeitiger Senkung des pulmonalvaskulären Widerstands um $\geq 20\%$ und zu einem deutlich verbesserten Herzzeitvolumen kommen (Voswinkel et al. 2009, Leschke et al. 2009). Patienten in den NYHA-Stadien III und IV können mit Prostazyklinanaloga, Endothelinrezeptorantagonisten und Phosphodiesterase-5-Inhibitoren therapiert werden. Reicht eine Monotherapie mit einer dieser Substanzgruppen nicht aus, um den Patienten aus dem NYHA-Stadium III und IV zu nehmen, ist eine Kombinationstherapie in Erwägung zu ziehen. Ist die medikamentöse Therapie nicht erfolgreich, besteht noch die Möglichkeit einer Lungentransplantation (Voswinkel et al. 2009, Olschewski 2006, Galiè et al. 2004).

2. Biomarker

2.1. Definition Biomarker

Der Begriff Biomarker wurde 1998 von einer Arbeitsgruppe des National Institute of Health (NIH) als „characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to the therapeutic intervention“ definiert. Biomarker sind objektiv messbare Parameter, die als Indikator für normale biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder als pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention dienen. Ihre Definition ist noch uneinheitlich, jedoch wird heute meist die Definition der Definition Working Group der NIH benutzt. In der Vergangenheit waren Biomarker hauptsächlich physiologische Parameter, wie Blutdruck und Herzfrequenz. In letzter Zeit wird der Begriff immer mehr als Synonym für molekulare Biomarker verwendet, zum Beispiel für das Prostataspezifische Antigen (PSA) bei Prostatakarzinomen, CK-MB und Troponin I und T bei kardialer Ischämie, Serumkreatinin als Indikator der

Nierenfunktion etc. Bei einem Biomarker kann es sich um Zellen, Gene, Genprodukte oder um bestimmte Moleküle wie Enzyme oder Hormone handeln (Schmitz et al. 2008).

2.2. Spezifische Biomarker in der pulmonalen Hypertonie

2.2.1 Brain natriuretic peptide (BNP)

Das brain natriuretic peptide (BNP) gehört zur Familie der natriuretischen Peptide, die sich in fünf verschiedene, strukturell ähnliche Peptide aufgliedern. Alle haben als Gemeinsamkeit eine 17-Aminosäuren-Ringstruktur, die über eine Disulfidbrücke geschlossen ist (Cea 2005). ANP (atrial natriuretic peptide) wird vor allem im Vorhof des Herzens sezerniert, während BNP hauptsächlich aus den Ventrikeln stammt. BNP ist ein 32 Aminosäuren umfassendes Protein und wird bei Volumenüberlastung und erhöhtem kardialen Druck von den Kardiomyozyten des Ventrikels als Präpeptid freigesetzt (Yoshimura et al. 1993; Yasue et al. 1994). In geringen Mengen wird BNP in den Vorhöfen und extrakardial in den Lungen, Nieren und Nebennieren gebildet (Sudoh et al. 1988). Es wird nach der Freisetzung durch eine Serinprotease in das aktive Peptid BNP und in einen 76 Aminosäure umfassenden inaktiven Metaboliten N-terminales Fragment (NT-proBNP) gespalten. Die biologische Wirkung dieses Hormons beruht auf Bindung an membrangebundenen Guanulatzyklase-Rezeptoren. Bindet das aktive Peptid BNP an einem sog. Typ-A-Rezeptor, steigt die intrazelluläre Konzentration des second messengers cGMP (zyklisches 3',5'-Guanosin-Monophosphat) an (Kuhn 2004). BNP fördert in den Nieren die Natriurese und Diurese und führt durch dilatative Wirkung an den glatten Muskelzellen der Gefäße eine Reduktion der kardialen Vorlast und des systemischen Blutdrucks (Zhou et al. 2010; Levin et al. 1998; Yoshimura et al. 1991, Abraham et al. 1998). Der BNP-Spiegel korreliert positiv mit dem mPAP und mit der funktionellen NYHA- Klassifikation (Nagaya et al. 2000, Leuchte et al. 2004). BNP hat sich als unabhängiger Prädiktor für die Mortalität erwiesen. Die 2-Jahres Überlebensrate ist deutlich höher bei einem BNP<180 pg/ml (Casserly and Klinger 2009). Auch das NT-proBNP kann als Biomarker verwendet werden und korreliert ebenfalls mit hämodynamischen Parametern des Rechtsherzkatheters sowie dem 6-Minuten-Gehtest (Andreassen et al. 2006). Als prognostischer Parameter der pulmonalen Hypertonie dienen sowohl BNP als auch NT-proBNP (Warwick et al. 2008).

In einer Studie von Maisel et al. 2002 wurden 1586 Patienten mit Dyspnoe untersucht und es konnte nachgewiesen werden, dass BNP sehr gut geeignet ist, um zwischen kardialer und nicht kardialer Dyspnoe zu differenzieren. Die BNP-Messung war in dieser Studie den anderen anamnestischen und klinischen Befunden sowie Laborparametern überlegen. Bei einem Cut-off-Wert von 100 pg/ml lag die Sensitivität bei 90,0% und die Spezifität bei 76,0% um zwischen den Ursachen für Atemnot zu unterscheiden (Maisel et al. 2002).

BNP [pg/ml]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Positiver Vorhersagewert [%]	Negativer Vorhersagewert [%]
80	93	74	77	92
100	90	76	79	89

Tabelle: Cut-off-Werte für BNP in Differenzierung zwischen Dyspnoe bedingt durch Herzinsuffizienz und Dyspnoe aufgrund anderer Ursachen (modifiziert nach Maisel et al. 2002)

Bei der Interpretation der BNP-Werte gilt es jedoch zu beachten, dass das Alter, das Geschlecht und eine renale Dysfunktion die Freisetzung von BNP zusätzlich beeinflussen (Munagala et al. 2004). Da BNP erst vermehrt bei erhöhter rechtskardialen Belastung freigesetzt wird, sollte dieser Biomarker zu den späten Markern der pulmonalen Hypertonie gezählt werden und ist nicht als diagnostischer Marker geeignet. Normale Werte für BNP/NT-proBNP schließen somit eine vorhandene pulmonale Hypertonie im Anfangsstadium nicht aus (Warwick et al. 2008).

2.2.2. Troponin

Das kardiale Troponin T ist ein Regulatorprotein der dünnen Aktinfilamente des Myokards. Bei einer Schädigung des Myokards im linken und rechten Ventrikel kommt es zur Freisetzung von Troponin T. In der Diagnostik des akuten Koronarsyndroms wird der Marker Troponin T bereits routinemäßig eingesetzt (Antman 2002). In einer Studie untersuchte Torbicki et. al 2003 eine kleine Gruppe von PH-Patienten hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft von Troponin T und stellte in dieser Studie fest, dass bei den Patienten mit erhöhtem Troponin T gleichzeitig eine niedrigere Sauerstoffsättigung,

höhere NT-proBNP-Werte und kürzere Strecken im 6-Minuten-Gehtest nachzuweisen waren. Bei diesen Patienten zeigte sich eine signifikant höhere Mortalität im Verlauf von zwei Jahren (Torbicki et al. 2003). Allgemeingültige Empfehlungen für Troponin T in der Diagnostik der pulmonalen Hypertonie können aufgrund des kleinen Studienkollektivs und dem Mangel an weiteren Studien nicht ausgesprochen werden.

2.2.3. Harnsäure

Harnsäure ist das Endprodukt des Purinabbaus. Aufgrund eines gestörten oxidativen Metabolismus konnten bei Patienten mit idiopathischer PAH signifikant erhöhte Harnsäurespiegel gemessen werden. Die erhöhten Serumwerte korrelieren positiv mit dem pulmonal-arteriellen Widerstand und gehen mit einer schlechten Prognose und erhöhten Mortalität dieser Patienten einher (Joshi et al. 2011; Nagaya et al. 1999).

Harnsäure ist jedoch auch bei Patienten mit anderen chronisch hypoxischen Zuständen, wie z.B. im Rahmen einer COPD oder einer chronischen Herzinsuffizienz erhöht und ist daher als Biomarker zur Diagnostik einer PH zu unspezifisch (Nagaya et al. 1999).

Die Harnsäurespiegel sind ebenfalls abhängig von Alter und Geschlecht und werden durch eine renale Dysfunktion und diuretische Therapie beeinflusst. Daher ist eine verlässliche Interpretation des Harnsäurespiegels bei einigen Patienten schwierig (Warwick et al. 2008).

2.2.4. Endothelin-1

Endothelin-1 (ET-1) ist ein hochwirksamer Vasokonstriktor und proliferatives Zytokin. Das aus 21 Aminosäuren bestehende Polypeptid wird in den Endothelzellen gebildet. Es gibt zwei Subtypen von ET-Rezeptoren. Typ A-Rezeptoren (ET_A) befinden sich vor allem auf den glatten Muskelzellen der Gefäße, während die Typ B-Rezeptoren (ET_B) hauptsächlich von den vaskulären Endothelzellen und den Muskelzellen der arteriellen Gefäße exprimiert werden. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt eine Vasokonstriktion und vaskuläres Remodeling, das zu einer Gefäßwandhypertrophie mit nachfolgender Erhöhung des intraarteriellen Gefäßwiderstands führt. Die Aktivierung des ET_B-Rezeptors führt zusätzlich zu einer ET-Clearance und zur Freisetzung vasodilatativer und antiproliferativer Substanzen wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid und Prostazyklin. Das Peptid Et-1 spielt dadurch eine wichtige Rolle in der Regulation

des Gefäßtonus und bei der Entwicklung einer Atherosklerose (Warwick et al. 2003; Miyauchi et al. 1999; Luscher and Barton 2000). Bei Patienten mit idiopathischer PAH konnte eine gesteigerte Genexpression von ET-1 bzw. seiner Vorstufe Big ET-1 in der pulmonalarteriellen Gefäßwand nachgewiesen werden (Rubens et al. 2001). Die Höhe der gemessenen ET-1-Spiegel korreliert positiv mit dem Schweregrad der pulmonalen Hypertonie (Rubens et al. 2001; Ishikawa et al. 1995). Die erhöhte Produktion an ET_A-Rezeptoren kann bei dem Behandlungsansatz der pulmonalen Hypertonie mit Endothelin-Rezeptorantagonisten zunutze gemacht werden und den Verlauf verschiedener PAH-Formen günstig beeinflussen (Rubin et al. 2002; Sitbon et al. 2003). Der first-pass-effect des plasmatischen ET-1 ist jedoch im pulmonalarteriellen Stromgebiet sehr stark. Dadurch unterscheiden sich die Plasmawerte von ET-1 deutlich von denen im peripheren Blut. Des Weiteren liegt die Plasmahalbwertszeit von ET-1 bei 4-7 Minuten und macht dadurch genaue Messungen schwierig und ungenau (Levin 1995). Außerdem ist ET-1 auch bei Patienten mit systemischer Hypertonie erhöht und im klinischen Alltag nicht zur Diagnostik der pulmonalen Hypertonie geeignet.

2.2.5. Stickstoff- Monoxid(NO)-Metabolismus

Stickstoff- Monoxid NO wird in den Endothelzellen der Gefäße durch Abspaltung von der Aminosäure L-Arginin mittels des Enzyms endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet und spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstandes. Es bewirkt eine Erhöhung des zyklischen Guanosin-3'-5'-Monophosphat (cGMP)-Spiegels in den glatten Muskelzellen. Dadurch kommt es zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit zu einer Vasodilatation. Bei alveolärer Hypoxie kommt es zu einer Konzentrationsabnahme von NO, was die pulmonale Hypertonie verstärkt. Bei Patienten mit idiopathischer pulmonaler Hypertonie (IPAH) ist die Synthese von NO und der NO-Synthase vermindert (Giaid and Saleh 1995; Giaid 1998). NO ist als Gas jedoch zu labil, um im Blut von Patienten gemessen werden zu können. Daher wird das Plasma-cGMP als Surrogat-Marker der eNOS-Aktivität gemessen. cGMP ist der intrazelluläre second messenger von NO, Bradykinin und den natriuretischen Peptiden (McDonald and Murad 1996). Da sowohl NO als auch natriuretische Peptide cGMP generieren können, korrelieren plasmatische cGMP-Werte mit der BNP- bzw. ANP-Expression und sind bei Patienten mit PAH signifikant erhöht. In einer Studie zeigten Bogdan et al. 1998, dass

im Urin gemessene cGMP-Spiegel bei Patienten mit PAH im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht waren und mit hämodynamischen Parametern, insbesondere dem Cardiac Index, korrelieren (Bogdan et al. 1998; Warwick et al. 2008). Eine chronische Herzinsuffizienz führt jedoch, wie bei den natriuretischen Peptiden, auch im NO-Metabolismus zu erhöhten Werten. Die diagnostische Aussagekraft bezüglich des Vorliegens einer isolierten pulmonalen Hypertonie ist daher eingeschränkt.

2.2.6. Serotonin

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) gehört neben Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin zu der Gruppe der Monoamine und ist ein potenter Vasokonstriktor, der sowohl in der Lunge als auch im Gastrointestinaltrakt gebildet und hauptsächlich in enterochromaffinen Zellen und in Thrombozyten gespeichert wird. Bei Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie sind erhöhte Serotonin-Plasmaspiegel nachweisbar, die mit dem pulmonalarteriellen Gefäßwiderstand korrelieren (Humbert et al. 2004; Gaine and Rubin 1998; Herve et al. 1995). Jedoch kommt es durch eine gesteigerte Aktivität der Thrombozyten auch zu einem Anstieg des Serotoninspiegels im Plasma.

3. sFlt-1 und VEGF

Eine frühzeitige Diagnose ist für eine erfolgreiche Behandlung der pulmonalen Hypertonie unerlässlich. Von besonderem Wert sind deshalb sog. Biomarker, die mögliche Hinweise auf das Vorliegen einer PH liefern können. Bis auf BNP konnten sich die oben genannten Biomarker jedoch bislang nicht im klinischen Alltag in der Diagnostik der PH durchsetzen. Dies liegt vor allem daran, dass ein geeigneter Biomarker eine hohe Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die Diagnostik der PH aufweisen muss. Im Hinblick auf die Wertigkeit von BNP gilt zu beachten, dass die Synthese und Expression von BNP auf das Myokard beschränkt ist und erst bei Schädigung des Myokards vermehrt freigesetzt wird. Daher ist BNP zur frühen Detektion einer PH eher ungeeignet.

3.1. VEGF

Proteine aus dem Vascular-Endothelium Growth Factor (VEGF)-Signalweg könnten ideale Marker in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Patienten mit PH sein. Hierbei handelt es sich um sekretierte Polypeptide, die durch eine Gruppe von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in Endothelzellen die Bildung von Blutgefäßen fördern. Die VEGF-Familie besteht aus VEGF-A bis E und dem Plazentawachstumsfaktor (PlGF) (Neufeld et al. 1999; Keck et al. 1989). Das humane Gen für den vaskulären Endothelwachstumsfaktor (VEGF) liegt auf dem Chromosom 6 p12-p21 und besteht aus 8 Exons sowie 6 Introns. Durch alternatives Splicing der RNA entstehen mehrere Isoformen. Die am häufigsten untersuchten Isoformen weisen Sequenzen von 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren auf (Robinson and Stringer 2001; Houck et al. 1991). VEGF-A spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gefäßsystems, Wundheilung, Vaskularisierung von Tumoren und für die Angiogenese in ischämischem Gewebe, einschließlich des Herzens (Kroll and Waltenberger 2000). Zur Signalweiterleitung binden die verschiedenen VEGFs an zwei unterschiedliche VEGF-Rezeptoren. Beide gehören in die Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren mit intrinsischer Aktivität. Sie werden als „fms-like tyrosine kinase receptor“ (Flt-1, auch VEGFR-1) und „kinase-domain insert containing receptor“ (KDR, auch VEGFR-2) bezeichnet (Tammela et al. 2005; Ahmad and Ahmed 2004). Sie besitzen sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen im Extrazellulärbereich, einen membrandurchspannenden hydrophoben Anteil und die intrazellulär liegende Tyrosinkinase-Domäne. Flt-1 besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu VEGF-A und PlGF und tritt in zwei Formen auf. Die membrangebundene Form (Flt-1) überträgt die angiogenen Signale ins Zellinnere, während der lösliche zirkulierende Rezeptor (soluble Flt-1, sFlt-1) die freien Wachstumsfaktoren VEGF und PlGF in der Zirkulation abfängt und so die Menge reguliert (Tammela et al. 2005; Kendall and Thomas 1993). Die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren führt zu einer Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Funktionsproteine und einer Erhöhung der zytosolischen Calciumionenkonzentration (Heids et al. 1998; Brock et al. 1991).

Einer der stärksten Stimuli der VEGF-Expression ist Hypoxie und daher wahrscheinlich treibende Kraft für die Einleitung von Angiogenese im Rahmen von Organentwicklung und -wachstum (Levy et al. 1995).

Für VEGF konnte ein hohes angiogenetisches Potential sowie eine antiapoptotische Wirkung vor allem der vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden (Leung et al.

1989). VEGF erhöht zudem die Gefäßpermeabilität und durch eine Steigerung der Stickstoff- Monoxid- (NO-) Abgabe die Vasodilatation (Kroll et al. 1999 et 2000).

3.2. sFlt-1

Der lösliche zirkulierende Rezeptor (sFlt-1) entsteht durch alternatives Spleißen der VEGFR1-prä-mRNA. sFlt-1 fehlt die Immunglobulin(Ig)-ähnliche Domäne, die transmembranöse und die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne des VEGFR1. sFlt-1 agiert als spezifischer Antagonist zu VEGF, indem er die Bindung an VEGFR1 und KDR mit hoher Affinität kompetitiv hemmt und auf diese Weise seine Bioverfügbarkeit *in vivo* beeinflusst (Voelkel et al. 2006; Kendall and Thomas 1993).

Bindet VEGF an den löslichen Rezeptortyp sFlt-1, bleibt die transmembranöse Signaltransduktion aus und die biologische Wirkung von VEGF wird bei erhöhten sFlt-1-Konzentrationen im Plasma zunehmend unterdrückt. Dadurch kommt es zu einer verminderten Gefäßpermeabilität, einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate in den Nieren und einer verminderten NO-Expression. Daraus resultiert ein erhöhter Blutdruck und Wassereinlagerungen.

Im Zusammenhang mit dem Auftreten der Präeklampsie wurde bereits die diagnostische und prognostische Wertigkeit von sFlt untersucht. Die Präeklampsie ist definiert als eine schwangerschaftsinduzierte Hypertonie mit Proteinurie (>3g/l im 24-h-Urin) und ist oft von Ödemen, Mikroembolien und erhöhtem Frühgeburtsrisiko begleitet. Sie ist mit 5% eine der häufigsten Komplikationen in der Schwangerschaft und tritt nach der 20. Schwangerschaftswoche bei zuvor unauffälligen Patientinnen auf (Gruber 2007; Stillman and Karumanchi 2007). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sFlt-1 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Präeklampsie zukommt und die Konzentration von sFlt-1 im Serum präeklampsischer Frauen stark erhöht ist (Koga et al. 2003; Maynard et al. 2003). In einer Studie von Levine et al. konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der späteren Schwangerschaftsmonate die Konzentration von sFlt-1 bei Präeklampsie zunahm und die Konzentration von PIGF gleichzeitig abnahm (Levine et al. 2004). Karumanchi und Mitarbeiter beschreiben 2004 in ihrem Patentantrag US2004/0126828 A1, dass eine erhöhte Konzentration von sFlt-1 und eine erniedrigte Konzentration von VEGF und PIGF als diagnostischer Indikator einer Präeklampsie dienen. Eine bestehende Präeklampsie oder ein erhebliches Risiko, eine Präeklampsie zu entwickeln, kann durch den angiogenen Index festgestellt werden. Der angiogene Index wird nach der Formel $sFlt-1/VEGF+PIGF$ bestimmt. Ist dieser Index >20, kann

von einer Präeklampsie bzw. einem erheblichen Risiko eine solche zu entwickeln ausgegangen werden. Ein sFlt-1-Serumspiegel $> 2\text{ng/ml}$ wird als positiver Indikator einer Präeklampsie angesehen (Karumanchi et al. 2004).

4. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die pulmonal-arterielle Hypertonie ist eine schwere Erkrankung mit stark eingeschränkter Lebenserwartung. Eine frühzeitige Diagnose und die Differenzierung zu anderen Ursachen einer Dyspnoe ist daher von entscheidender Bedeutung für die Prognose und den Therapieverlauf der Erkrankung (Humbert 2005). Eine nicht-invasive Messung des pulmonalarteriellen Druckes ist durch eine echokardiographische Untersuchung zu erreichen. Jedoch ist im niedergelassenen ärztlichen Bereich eine Echokardiographie nur beschränkt verfügbar, so dass die Verwendung einfach bestimmbarer Biomarker von besonderer Bedeutung ist. Proteine aus dem Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF)- Signalweg, vor allem das soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), könnten als diagnostischer Biomarker der pulmonalen Hypertonie dienen. Bereits frühe Untersuchungen konnten zeigen, dass VEGF in den plexiformen Läsionen bei Patienten mit PH exprimiert wird und somit eine signifikante Rolle im Pathomechanismus der PH einnimmt (Fujita et al. 2002).

In dieser Arbeit soll die diagnostische Wertigkeit von sFlt-1 im Rahmen der PH ermittelt werden.

Daraus lassen sich folgende Fragestellungen formulieren:

- Besteht ein signifikanter Unterschied in der sFlt-1-Konzentration bei Patienten mit PAH im Vergleich zu Patienten mit Dyspnoe ohne PAH?
- Wie sicher ist sFlt-1 in der Diagnose der PH in Bezug auf Spezifität und Sensitivität?
- Wie verhält sich sFlt-1 im Vergleich zu dem bereits etablierten Biomarker BNP?

Material und Methoden

1. Studienkollektiv

Das Studienkollektiv umfasste 179 Patienten des Universitätsklinikums Gießen, Klinik für Innere Medizin II. Diese Patienten befanden sich zum Untersuchungszeitpunkt in ambulanter bzw. stationärer Behandlung. Bei 138 Patienten lag Dyspnoe unterschiedlicher Genese ohne Hinweis einer pulmonalen Hypertonie vor, bei 41 Patienten wurde eine pulmonale Hypertonie nachgewiesen. Der Einschluss der Patienten erfolgte von Oktober 2008 bis Januar 2009.

Voraussetzung für den Einschluss der Patienten war eine zu diesem Zeitpunkt vorliegende Dyspnoe. Die Einteilung zur Gruppe mit bzw. ohne Hinweis auf eine pulmonale Hypertonie erfolgte durch eine echokardiographische Abschätzung des systolischen PAP. Die Patienten mit einem Hinweis auf Rechtsherzbelastung bzw. einem systolischen PAP \geq 45 mmHg wurden der PH-Gruppe zugeordnet.

Alle Patienten erhielten zuvor eine ausführliche Aufklärung und erteilten ihre schriftliche Zustimmung zur Durchführung der Untersuchung, sowie zur statistischen Auswertung der durchgeführten Fragebögen und der Analyse der dabei gewonnenen Blutproben.

2. Studienprotokoll

Bei allen 179 in die Studie eingeschlossenen Patienten erfolgte zunächst ein ärztliches Anamnesegespräch mit der Beurteilung des aktuellen klinischen Zustandes. Hatten die Patienten im Rahmen ihrer Erkrankung Dyspnoe, erfolgte eine ausführliche Aufklärung über die Durchführung dieser Studie. Nach schriftlicher Einwilligung des Patienten erfolgte dann eine Blutentnahme sowie die Zuteilung in eine NYHA-Klasse und die Beantwortung eines Borg-Dyspnoe-Fragebogens sowie die Bestimmung des Baseline-Dyspnoe-Indexes nach Mahler durch den Patienten. (Die Einverständniserklärung und die Fragebögen befinden sich im Anhang). Im Anschluss daran wurden diese Patienten durch einen Facharzt für Kardiologie (Dr. Holger Nef) echokardiographisch untersucht. Dabei wurden die folgenden Parameter erfasst: LV-Funktion(%), TAPSE (mm), Tei, PAPsys (mmHg), ZVD (mmHg), Zeichen einer Rechtsherzbelastung, paradoxe Septumbewegung, RVOT-Fluss. AT (ms), AT/ET, Trikuspidalinsuffizienz, RV/RA.

Des Weiteren wurde ein 6-Minuten-Gehtest durchgeführt und der aktuelle BNP-Wert bestimmt.

Die entnommenen Blutproben wurden im Anschluss mittels ELISA-Analyse auf den Biomarker sFlt-1 untersucht. Die dabei erhobenen Werte wurden mit den klinischen Parametern der Patienten korreliert.

3. Methoden

3.1. Erfassung klinischer Parameter

3.1.1. Einteilung des Schweregrades der Dyspnoe

Klinisches Leitsymptom bei der Anamnese der Patienten stellte die Belastungsdyspnoe dar, deren Schweregrad-Einteilung nach der WHO weitgehend der New York Heart Association (NYHA)-Klassifikation der Herzinsuffizienz entspricht (Leschke et al. 2009).

Je nach Schweregrad der Dyspnoe werden die Patienten eine der vier NYHA-Stadien zugeordnet. Entscheidend für die Zuteilung in eine der Klassen ist die körperliche Belastbarkeit.

Modifizierte Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) in Bezug auf die Dyspnoe:

NYHA I: Patient mit PH ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Belastungen führen nicht zu Dyspnoe und Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Synkopen.

NYHA II: Patient mit PH mit leichter Einschränkung der Belastbarkeit. Die Patienten sind in Ruhe beschwerdefrei. Normale körperliche Aktivität führt zu vermehrter Dyspnoe oder Müdigkeit.

NYHA III: Patient mit PH und deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität. Die Patienten sind in Ruhe beschwerdefrei. Bereits geringe körperliche Aktivität führt zu Dyspnoe und Müdigkeit, thorakalen Schmerzen oder Schwächeanfällen.

NYHA IV: Patient mit PH und Ruhebeschwerden, damit Unfähigkeit, irgendwelche körperlichen Belastungen ohne Beschwerden auszuführen. Die Patienten weisen Zeichen einer manifesten Rechtsherzinsuffizienz auf. Dyspnoe und/oder Müdigkeit können bereits in Ruhe vorhanden sein. Bei geringster Aktivität werden die Beschwerden verstärkt (Barst et al. 2004; Leschke et al. 2009).

3.1.2. Borg-Dyspnoe-Skala

In der Borg-Dyspnoe-Skala wird die subjektiv empfundene Atemnot des Patienten vor, während und unmittelbar nach einem Belastungstest mittels einer RPE-Skala (ratings of perceived exertion) von 0 = überhaupt keine Atemnot bis 10 = maximale Atemnot erruiert und lässt eine zuverlässige und valide Abschätzung des Anstrengungsempfindens während eines Belastungstests wie dem 6-Minuten-Gehtest zu (Löllgen und Ulmer 2004). Bei schwer eingeschränkten Patienten kann der Borg-Index auch in Ruhe quantifiziert werden.

3.1.3. Dyspnoe-Index nach Mahler

Zur Ermittlung des Baseline-dyspnea-index (BDI) werden die Patienten im Dyspnoe-Fragebogen nach Mahler gebeten, in drei Kategorien das Ausmaß der Dyspnoe einzustufen. Eine Kategorie beinhaltet die funktionelle Beeinträchtigung in alltäglichen Aktivitäten, die Zweite das Ausmaß der Beschwerden und der dritte Bereich das Ausmaß der Dyspnoe bei körperlicher Anstrengung. Es werden jeweils zwischen 0 bis 4

Punkte vergeben, so dass 0-12 Punkte erreicht werden können. Umso kleiner der erreichte Wert ist, desto schwerer ist das Ausmaß der Dyspnoe (Mahler et al. 1984; Chhabra et al. 2009).

Im Vergleich zu den anderen beiden Dyspnoe-Einteilungen wurde den Patienten hierbei die Möglichkeit gegeben, zwischen funktionellen Beeinträchtigungen, Beeinträchtigungen der Belastbarkeit und Einschränkungen der Leistungsfähigkeit zu differenzieren.

3.1.4. 6-Minuten-Gehtest

Ein weiteres wichtiges Mittel zur Abschätzung der körperlichen Belastbarkeit stellt der Sechs-Minuten-Gehtest dar. Der 6-Minuten-Gehtest (6-minute walk test) ist ein verlässlicher Parameter hinsichtlich Schweregrad, Therapie-/Verlaufskontrolle und Abschätzung der Prognose (Runo und Loyd 2003; Solway et al. 2001; Miyamoto et al. 2000).

Bei der Durchführung dieses Gehtestes soll der Patient auf ebener Strecke innerhalb von 6 Minuten ohne fremde Hilfe so weit gehen, wie es ihnen möglich ist. Zur Erfassung der Dyspnoe wird dabei zusätzlich der Borg-Dyspnoe-Index angegeben und die Sauerstoffsättigung am Finger bestimmt. Innerhalb dieser Zeit gelten zurückgelegte Distanzen > 500 m als normal, Distanzen < 300 m sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Leschke et al. 2009).

3.2. Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung der Patienten erfolgte durch einen Facharzt für Kardiologie (Dr. H. Nef) mit dem Echokardiographiegerät von Vivid i von GE healthcare.

Abschließend erfolgte eine Beurteilung der allgemeinen Schallbedingungen.

3.3. Blutentnahme

Zur Bestimmung der Plasmawerte von sFlt-1 erfolgte die Blutabnahme bei allen Patienten über eine periphere Vene an den Armen in eine EDTA-Monovette®. Direkt im Anschluss wurde das gewonnene Blut bei 3000g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Diese wurden bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung mittels ELISA-Analyse eingefroren und gelagert.

3.4. Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Quantifizierung von sFlt-1 und PlGF im Plasma des Patienten wurde ein „Enzym-linked immunosorbent assay“ (ELISA) durchgeführt. Hierzu wurden für die Untersuchung der Plasmaproben der Quantine® Human sVEGF R1 ELISA-Kits (R & D Systems) verwendet. Diese Kits basieren auf der quantitativen „Sandwich-Enzym Technik“. Dabei ist ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das Zielprotein sVEGF R1 bereits auf den Platten gebunden. 50 µl Standard und Proben wurden daraufhin in Duplikaten in die Vertiefungen (Wells) der 96-well- Platten pipettiert und das im Plasma vorhandene sVEGF R1 wurde von dem immobilisierten Antikörper gebunden. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler erfolgte durch mehrere Spülschritte die Entfernung der nicht gebundenen Substanzen. Anschließend wurden 100µl eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers, der ebenfalls spezifisch an sVEGF R1 bindet, hinzugegeben (anti-sVEGF R1). Es folgte eine erneute Inkubation von zwei Stunden auf dem Schüttler. Nach mehreren Waschschritten wurden 100µl Substrat (H₂O₂/Tetramethylbenzidine, 50:50 v/v) zugegeben, dass einen Farbumschlag proportional zur Menge des gebundenen Proteins bewirkt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit unter lichtgeschützten Bedingungen wurden 25 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert, um die Farbentwicklung zu stoppen. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Zur Konzentrationsbestimmung wird auf derselben 96-well- Platte ein mitgelieferter Standard (0, 125, 250, 1000, 2000, 4000, 5000 pg/ml sVEGF R1) aufgetragen. Mittels eines Photometers (Tecan Sunrise™ Plate-Reader) wird die Messung der Absorption bei 450 nm durchgeführt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4. Materialien

Bei der ELISA-Analyse kamen folgende Materialien zum Einsatz:

- Quantine® Human sVEGF R1 ELISA-Kits (R & D Systems)
- 96-Well Polystyrol Mikroplatte mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF R1
- Peroxidase-gekoppelter (enzym-gekoppelter) Zweit-Antikörper (anti-sVEGF R1)
- Waschpuffer
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂)
- Tetramethylbenzidine
- 2 N Schwefelsäure (Stopplösung)
- Human VEGF R1 Controls (0, 125,250,1000,2000, 4000, 5000 pg/ml sVEGF R1 für menschliche Proben) von R & D Systems
- Tecan Sunrise™ Plate-Reader (Mikrotiterplatten-Lesegerät)
- Pipetten und Pipettenspitzen
- Destilliertes Wasser

Bei der Blutabnahme wurden EDTA-Monovetten verwendet.

4.1. Echokardiographiegerät Produktangaben

Zur Durchführung der echokardiographischen Untersuchung der Patienten wurde das Ultraschallgerät Vivid i von GE healthcare verwendet.

5. Statistische Auswertung

Die Datenerfassung und –verarbeitung der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Computerprogramms Microsoft® Excel durchgeführt. Die statistische Auswertung dieser Daten und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA). Die erhobenen Daten wurden dem jeweils der Fragestellung angepassten Verfahren der deskriptiven Statistik unterzogen.

Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) bzw. 95%-Konfidenzintervall (95%-KI).

Die Korrelation wurde angewendet, um Zusammenhänge zwischen PH und NYHA-Klassen bzw. 6- Minuten-Gehtest zu untersuchen.

Receiver Operating Characteristic (ROC) wurde genutzt, um den besten Trennwert zu erhalten.

Die Sensitivität und Spezifität sowie der PPV und NPV wurden mittels Kreuztabelle errechnet.

Ergebnisse

1. Studienkollektiv

1.1. Demographische Daten

Das untersuchte Gesamtkollektiv bestand aus 179 Studienpatienten mit gleichmäßiger Geschlechtsverteilung von 94 (53%) Männern und 85 (47%) Frauen. Das Alter dieser Studienpatienten lag zwischen 17,3 und 93,5 Jahren. Das Durchschnittsalter der Studienpatienten lag bei $61,1 \pm 17,4$ Jahren.

1.2. Echokardiographische Zuteilung

Bei allen Patienten wurde eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Um sicher und nicht-invasiv eine pulmonale Hypertonie zu erfassen, wurde entsprechend der Kriterien des Symposiums für pulmonale Hypertonie in Dana Point 2008 ab einem systolischen pulmonal-arteriellen Druck > 45 mmHg eine pulmonale Hypertonie angenommen. Das Gesamtkollektiv bestand aus 179 Patienten mit Dyspnoe, von denen 138 Patienten (77%) echokardiographisch keinen Hinweis auf PH (PAP sys $27,1 \pm 6,9$ mmHg) hatten, 41 Patienten (23%) eine PH (PAP sys $65,7 \pm 19,0$ mmHg) hatten. Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Verteilung.

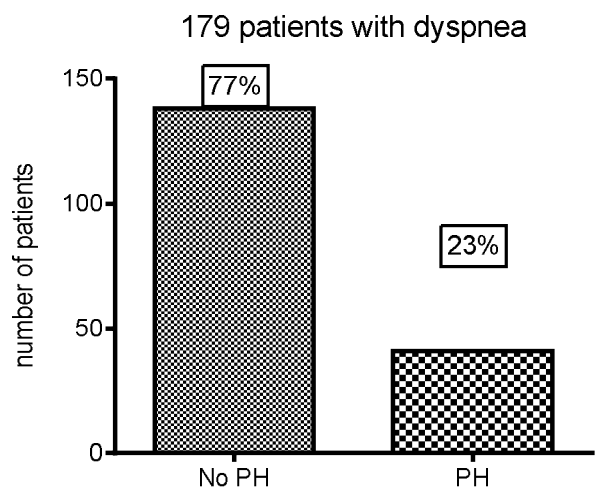


Abbildung 1: Patients with dyspnea. No PH= keine pulmonale Hypertonie, PH= Patient mit pulmonaler Hypertonie.

1.3. Klinische Parameter

Die Schweregradeinteilung der Dyspnoe erfolgte mittels NYHA-Klassifikation. Im Studienkollektiv waren 27 Patienten (15%) dem NYHA Stadium I zuzuordnen, 35 Patienten (20%) befanden sich im NYHA Stadium II, 55 Patienten (31%) waren NYHA III und 62 Patienten (35%) NYHA IV zuzuordnen. Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Verteilung. Bei einer Differenzierung zwischen Patienten mit Hinweis auf PH und Patienten ohne Hinweis auf PH ergab sich folgende NYHA-Klassen-Verteilung: Bei den Patienten mit PAP sys < 45 mmHg waren 21 Patienten (15%) NYHA I, 31 Patienten (23%) NYHA II, 46 Patienten (33%) NYHA III und 40 Patienten (29%) NYHA IV zuzuordnen. Lag ein Hinweis auf PH vor, wurde 1 Patient (2%) NYHA I, 5 Patienten (12%) NYHA II, 10 Patienten (25%) NYHA III und 25 Patienten (61%) NYHA IV zugeordnet.

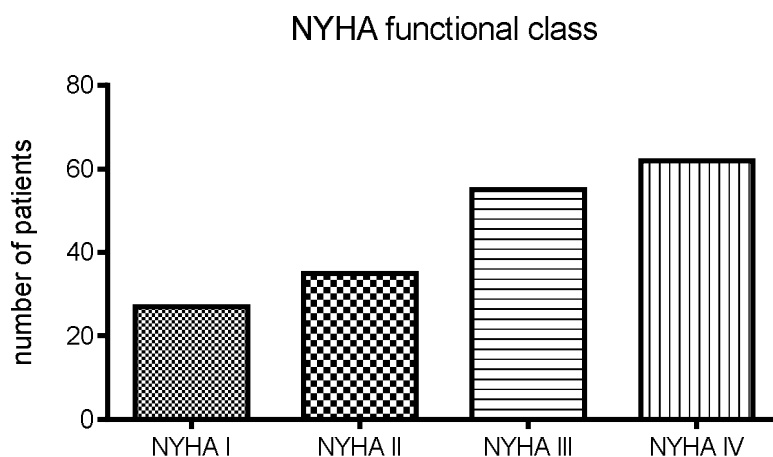


Abbildung 2: NYHA functional class. Graphische Darstellung der NYHA-Klassen-Verteilung im gesamten Studienkollektiv.

Eine weitere Einteilung der Dyspnoe erfolgte durch den Baseline Dyspnoe Index (BDI) nach Mahler. (Borg-Dyspnoe-Skala.) Dabei zeigten sich bei den Patienten ohne PH Werte von $6,26 \pm 0,27$ und bei Patienten mit PH Werte von $4,03 \pm 0,40$.

Im Anschluss an die periphere Blutentnahme folgte ein 6-Minuten-Gehtest. Bei 11 Patienten war die Durchführung des 6-Minuten-Gehtests aufgrund zu stark ausgeprägter Dyspnoe nicht möglich. Die durchschnittlich zurückgelegte Strecke beim 6-Minuten-

Gehtest lag bei den Patienten mit PAP < 45 mmHg bei 347,7±16,78 m und bei den Patienten mit PAP > 45 mmHg bei 251,9±25,64 m.

Im Rahmen der Studie wurde aus den entnommenen Blutproben der BNP-Wert bestimmt. Niedrige Werte unter 80 pg/ml schließen eine Dyspnoe aufgrund einer chronischen Herzinsuffizienz fast völlig aus. Der negative Vorhersagewert liegt bei > 92% (Maisel et al. 2002). Die Food and Drug Administration (FDA) empfiehlt zur Abgrenzung der chronischen Herzinsuffizienz gegen andere Ursachen der Dyspnoe einen Cut-off-Wert von 100 pg/ml. Werte über 100 pg/ml gelten nach aktueller Definition als pathologisch und weisen auf eine Rechtsherzbelastung hin (Prahash et Lynch, 2004). Jedoch gilt es zu berücksichtigen, dass die BNP-Werte von Alter, Geschlecht, körperlicher Belastung, Herzerkrankungen und chronischer Niereninsuffizienz abhängig sind und daher kein einheitlicher Grenzwert bestimmt werden kann. So steigen die Werte mit dem Alter an und Frauen weisen höhere Werte auf als Männer.

Die gemessenen BNP-Werte lagen bei den Patienten ohne Hinweis auf PAH (PAP < 45 mmHg) im Durchschnitt bei 38,45±5,98 pg/ml und bei Patienten mit PAH (PAP > 45 mmHg) bei 237,2±70,46 pg/ml.

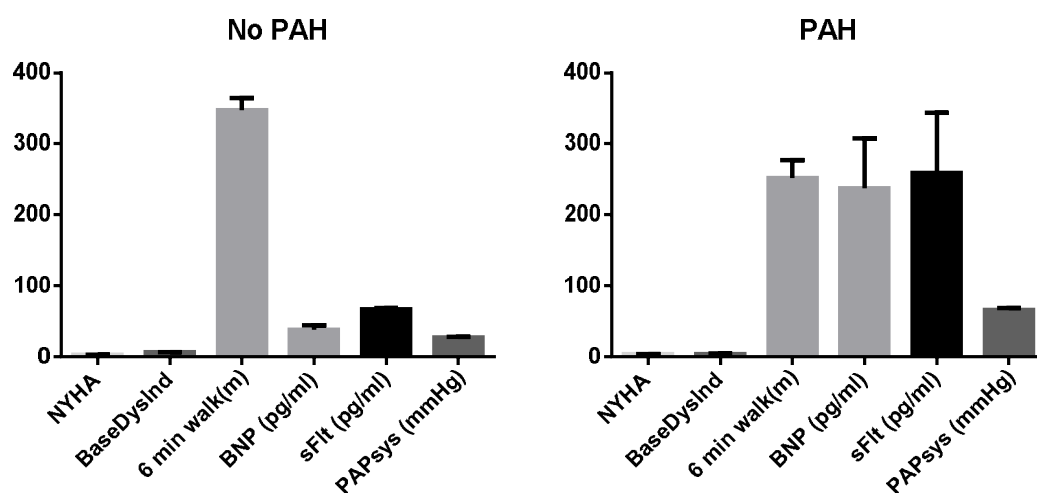


Abbildung 3: Graphische Darstellung der ermittelten klinischen Parameter.

2. sFlt zentrale vs. periphere Blutentnahme

In einer kleineren Studiengruppe von 25 Patienten wurde ein Vergleich zwischen peripher entnommenen Blutproben mit zentral entnommenen Blutproben durchgeführt. Dabei wurde im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung eine Blutprobe aus der Arteria pulmonalis und zur gleichen Zeit aus der Vena cubitalis entnommen. Die Messung der sFlt-Plasmawerte zeigt dabei einen signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Proben. Bei den Patienten mit PAH (mittlere PAP > 25 mmHg) konnten im zentralen Plasma sFlt-Werte von $2239 \pm 206,0$ pg/ml im Vergleich zum peripheren sFlt-Werten von $503 \pm 177,2$ pg/ml gemessen werden. Auch bei den Patienten ohne PAH (mittlerer PAP < 25 mmHg) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den zentralen Proben $1353 \pm 431,4$ pg/ml und den peripheren Proben mit Werten von $105,2 \pm 6,094$ pg/ml.

Die im weiteren Verlauf angegebenen Ergebnisse und Messwerte dieser Arbeit beziehen sich ausschließlich auf peripher entnommene Blutproben.

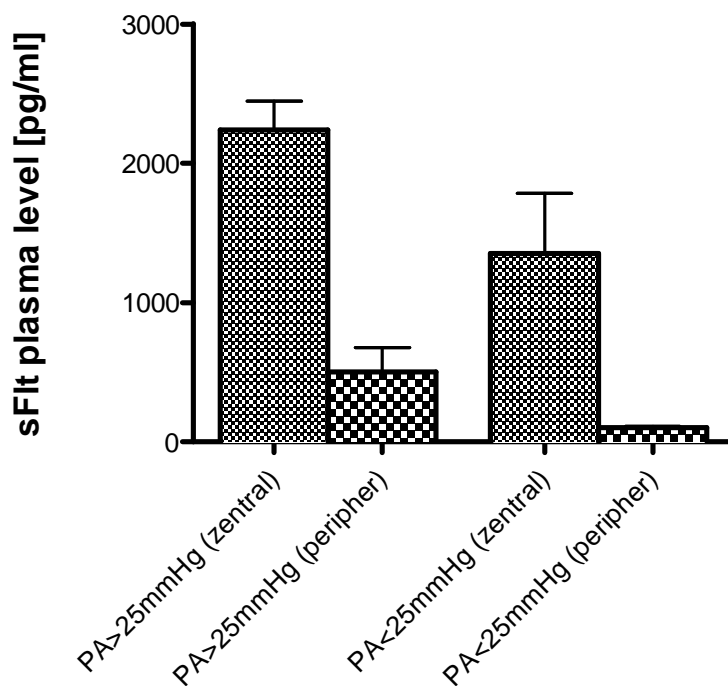


Abbildung 4: sFlt-Konzentrationswerte aus gemischtvenösem Blut (zentral) und Blut aus der Cubitalvene (peripher) bei Patienten mit Dyspnoe ohne Hinweis auf pulmonale Hypertonie ($PA < 25$ mmHg) und bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie ($PA > 25$ mmHg). $p < 0,0004$.

3. Diagnostischer Vorhersagewert von sFlt

Bezugnehmend auf die Fragestellung der vorliegenden Dissertation ist vor allem die Auswertung der Plasmawerte von sFlt-1 von Bedeutung. Wie graphisch in der Abbildung dargestellt, konnten zwischen den Patienten ohne PH und den Patienten mit PH signifikante Unterschiede des Plasmaspiegels von sFlt statistisch ermittelt werden, $p < 0,0001$. Die sFlt-Werte lagen bei Patienten mit Dyspnoe ohne Hinweis auf PH (PAP < 45 mmHg) bei $67,22 \pm 1,68$ pg/ml. In der Vergleichsgruppe mit Zeichen einer PH (PAP > 45 mmHg) zeigten sich Werte von $259,4 \pm 84,86$ pg/ml.

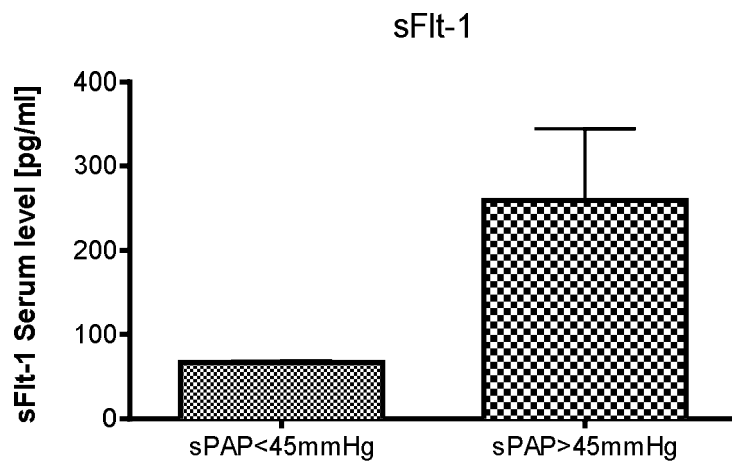


Abbildung 5: sFlt-1. Vergleich der sFlt-Konzentrationswerte bei Patienten mit pulmonale arterielle Hypertonie (sPAP > 45 mmHg) mit Dyspnoe-Patienten ohne Hinweis auf PAH (sPAP < 45 mmHg). $p < 0,0001$.

4. sFlt als Differenzierungsmarker zwischen Patienten mit PH und Patienten ohne PH

4.1. Sensitivität und Spezifität von sFlt

Die Zuverlässigkeit diagnostischer Tests wird mit den Maßzahlen Sensitivität, Spezifität, sowie dem positiven und negativen Vorhersagewert beschrieben.

Die Sensitivität ist nach Definition die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker als krank erkannt wird. Die Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Nicht-Kranker als gesund (nicht krank) erkannt wird. Eine hohe Sensitivität und Spezifität für sFlt ist demnach essentiell zur Differenzierung zwischen Patienten mit Dyspnoe und erkrankten PH-Patienten.

Der positive Vorhersagewert oder positive prädiktive Wert (PPV) ist die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem positiven Testergebnis (krank) die Erkrankung auch tatsächlich vorliegt. Entsprechend gibt der negative Vorhersagewert (NPV) den Anteil der korrekt als negativ erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als negativ erkannten Ergebnisse an, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem negativen Testergebnis (gesund) die Erkrankung auch tatsächlich nicht vorliegt.

Für sFlt wurde ein optimaler „Cut-off“-Wert (Grenzwert) von 73 pg/ml ermittelt. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte eine Sensitivität von 78,0% und eine Spezifität von 71,1% kalkuliert werden. Der positive Vorhersagewert ergab hierbei 45,1% und der negative Vorhersagewert lag bei 91,7%. Daraus kann man schlussfolgern, dass mit einer hohen Wahrscheinlichkeit eine pulmonale Hypertonie bei einem sFlt-Wert < 73pg/ml in peripherem Blut ausgeschlossen werden kann.

	PPV [%]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	NPV [%]
sFlt Referenzwert: 73 pg/ml	45,1	78,0	71,1	91,7

Tabelle 1: Sensitivität und Spezifität von sFlt als diagnostischer Marker der pulmonalen Hypertonie in peripherem Blut von Patienten mit Dyspnoe. PPV=positiver Vorhersagewert, NPV= negativer Vorhersagewert.

4.2. Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve für sFlt

Der Biomarker sFlt wurde auf die Frage hin untersucht, ob anhand der Messwerte eine Differenzierung zwischen Patienten ohne PAH und Patienten mit PAH möglich ist. Die Sensitivität und 1-Spezifität dieser Ergebnisse zeigt die in der Abbildung dargestellte Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve. Die ROC-Kurve stellt visuell die Abhängigkeit von Sensitivität und Spezifität dar. Für sFlt zeigt sich eine Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) von 0,79 bei $p < 0,0001$ und einem 95%-Konfidenzintervall von 0,72-0,86. Diese Werte beziehen sich auf einen Cut-off-Punkt von sFlt < 73 pg/ml.

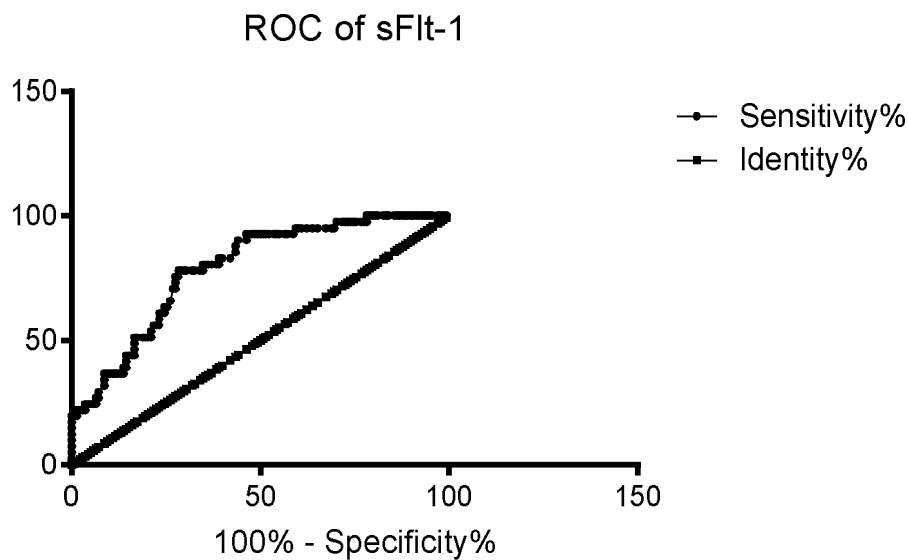


Abbildung 6: ROC of sFlt-1. Darstellung der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve für sFlt als diagnostischer Marker bei Patienten mit Dyspnoe. (sFlt: AUC 0,7878, $p < 0,0001$, 95% CI 0,715-0,860).

5. Diagnostische Wertigkeit von BNP im Vergleich mit sFlt

Im Rahmen der Studie wurde aus den entnommenen Blutproben zusätzlich der BNP-Wert bestimmt. Der Biomarker BNP wird bereits in der Diagnostik der PH eingesetzt und ist vor allem bei Volumenbelastung des rechten und linken Ventrikels erhöht. Werte über 100 pg/ml gelten nach aktueller Definition als pathologisch und weisen auf eine Rechtsherzbelastung hin (Prahash et Lynch, 2004). Wie bereits erwähnt, gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass die BNP-Werte von Alter, Geschlecht, körperlicher Belastung, Herzerkrankungen und chronischer Niereninsuffizienz abhängig sind und daher kein einheitlicher Grenzwert bestimmt werden kann. So steigen die Werte mit dem Alter an und Frauen weisen höhere Werte auf als Männer.

Die gemessenen BNP-Werte lagen bei den Patienten ohne Hinweis auf PH (PAP < 45 mmHg) im Durchschnitt bei $38,45 \pm 5,98$ pg/ml und bei Patienten mit PH (PAP > 45 mmHg) bei $237,2 \pm 70,46$ pg/ml.

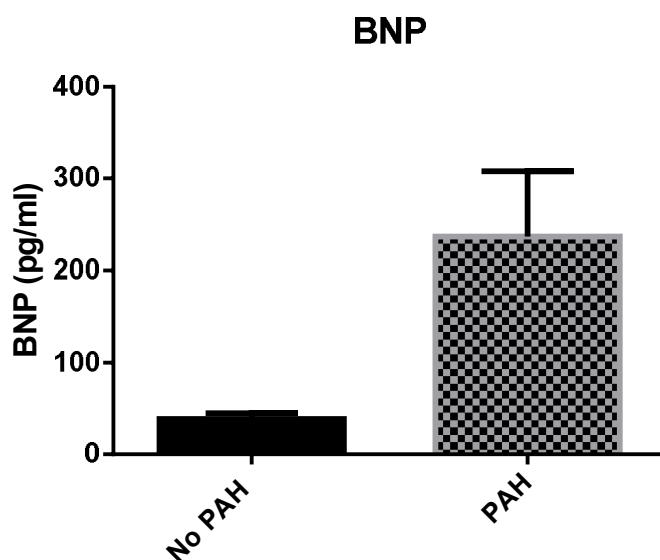


Abbildung 7: BNP. BNP-Spiegel von Patienten mit Dyspnoe ohne PAH und Patienten mit PAH.

Jedoch war BNP als diagnostischer Marker nur in 55% der Fälle bei den Patienten mit gesicherter pulmonaler Hypertonie >80 pg/ml. Bei 45% aller Patienten mit Hinweis auf pulmonaler Hypertonie und BNP < 80 pg/ml war sFlt-1 jedoch positiv, d.h. >73 pg/ml. Dieses Ergebnis zeigt, dass sFlt-1 in fast der Hälfte aller Fälle eine pulmonale Hypertonie genauer vorhersagen konnte als BNP.

Diskussion

Dyspnoe kann durch kardiale und pulmonale Ursachen bedingt sein und ist bei der pulmonalen Hypertonie ein charakteristisches, aber unspezifisches Symptom. Definierendes Merkmal der PH ist ein erhöhter mittlerer pulmonal-arterieller Druck (mPAP) $> 25\text{mmHg}$ mit zunehmender Rechtsherzbelastung bis hin zur Rechtsherzinsuffizienz. Mit einer Prävalenz von 1-2 pro einer Million ist die idiopathische pulmonale Hypertonie eine seltene Erkrankung mit einer schlechten Prognose. (Gaine and Rubin 1998). Die mittlere Überlebenszeit beträgt nach Diagnosestellung ohne spezifische Therapie nur 2,8 Jahre. Aus Daten vor dem Einsatz von wirksamen Therapien lag die 1-Jahres-Überlebensrate bei 68%, nach 3 Jahren bei 48% und nach 5 Jahren nur noch bei 34% (Simonneau et al. 2009; Badesch et al. 2009; Gaine and Rubin 1998; D'Alonzo et al. 1991). Eine frühzeitige Detektion und eine Therapie in einem frühen Krankheitsstadium der pulmonalen Hypertonie sind für die Prognose von entscheidender Bedeutung. Bis zur endgültigen Diagnose und Einleitung einer Therapie vergehen jedoch häufig mehrere Monate (Olschewski 2006; Leschke et al. 2009).

Ein Biomarker für diese Erkrankung, der zur Früherkennung geeignet ist und als Parameter für den klinischen Verlauf und zur Therapieentscheidung eingesetzt werden kann, ist daher von großer Bedeutung. Es wurde bereits eine Vielzahl von potentiellen Biomarkern beschrieben, aber im klinischen Alltag haben sich bisher nur BNP und Nt-proBNP bewährt. Zur Früherkennung einer pulmonalen Hypertonie ist dieser jedoch nur bedingt geeignet, da BNP erst bei erhöhter Volumenbelastung des rechten Ventrikels vom Myokard vermehrt freigesetzt wird. Als Verlaufsparemeter und zur Einschätzung der kardialen Beteiligung findet BNP jedoch bei Patienten mit PH Anwendung.

Ein besser geeigneter Biomarker könnte das Protein sFlt-1 (soluble Fms-like tyrosine kinase-1) aus dem Vascular endothelium growth factor (VEGF)-Signalweg darstellen. In der vorliegenden Dissertation wird dieser Biomarker auf seine diagnostische Wertigkeit und seine Aussagekraft im Hinblick auf die Diagnose pulmonale Hypertonie hin untersucht.

Studienkollektiv

Die Geschlechtsverteilung der in dieser Studie untersuchten Patienten war mit einem Anteil von 47% Frauen ausgewogen. Mit einer Anzahl von 179 Patienten und einer

relativ großen Altersspanne sind die Ergebnisse dieser Arbeit als repräsentativ zu werten. Aufgrund der Tatsache, dass die Patientenrekrutierung in einem spezialisierten Zentrum für pulmonale Hypertonie erfolgte, war es innerhalb eines kurzen Zeitraums möglich, 41 Patienten mit echokardiographischen Hinweisen auf eine pulmonale Hypertonie in die Studie einzuschließen. Jedoch ist in dieser Arbeit die Verteilung der Patienten mit Dyspnoe in die Gruppe ohne Hinweis auf PH mit 138 Studienteilnehmern im Vergleich zur Gruppe mit Hinweis auf eine PH (41 Patienten) unausgeglichen. Da in einer Studie (BIOSPHERE I) mit PH-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe zuvor bereits gezeigt wurde, dass sFlt-1 bei Patienten mit PH signifikant erhöht ist, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob ebenfalls signifikante Unterschiede zu Patienten mit Dyspnoe anderer Ursachen aufzuzeigen sind und damit als Marker zur Diagnostik der PH geeignet ist. Daher wurde bewusst ein größerer Anteil an Patienten mit Dyspnoe ohne Hinweis auf PH gewählt.

Die Abschätzung des systolischen pulmonal-arteriellen Druck und damit die Zuordnung zur Gruppe mit bzw. ohne Hinweis auf PH erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch eine transthorakale Echokardiographie. In der Diagnostik der PH zählt die Rechtsherzkatheteruntersuchung weiterhin zum Gold-Standard. Dieses Verfahren ist jedoch sehr invasiv und zum Screening bei Dyspnoe nicht primär geeignet. Daher wurde bei jedem Patienten des Studienkollektivs eine Echokardiographie durchgeführt, um Hinweise auf das Vorliegen einer PH zu bestätigen bzw. auszuschließen. Entsprechend der Kriterien des Symposiums für pulmonale Hypertonie in Dana Point 2008 liegt ab einem systolischen pulmonal-arteriellen Druck > 45 mmHg der echokardiographische Hinweis auf eine pulmonale Hypertonie vor.

Der Schweregrad der Dyspnoe wurde bei allen Patienten nach NYHA klassifiziert. Dabei zeigte sich, dass das bei zwei Drittel des Gesamtkollektivs die Dyspnoe stark ausgeprägt war und den NYHA-Klassen III und IV zuzuordnen waren. Bei Betrachtung des Patientenkollektivs mit Hinweis auf PH waren sogar 61% aller Patienten der NYHA-Klasse IV zuzuordnen.

Zur Abschätzung der körperlichen Belastbarkeit wurde ein 6-Minuten-Gehtest durchgeführt. Der 6-Minuten-Gehtest ist ein verlässlicher Parameter hinsichtlich Schweregrad, Therapie-/Verlaufskontrolle und Abschätzung der Prognose kardiopulmonaler Erkrankungen (Runo und Loyd 2003; Solway et al. 2001; Miyamoto et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden im 6-Minuten-Gehtest von den Patienten mit Dyspnoe ohne Hinweis auf PH im Durchschnitt knapp 100 Meter mehr

zurückgelegt ($347,7 \pm 16,78$ m) als von den Patienten mit Hinweis auf PH ($251,9 \pm 25,64$ m). Ein Grund dafür kann unter anderem darin bestehen, dass 86% der PH-Patienten in dieser Studie den NYHA-Klassen III und IV zuzuordnen waren. Im Gegensatz dazu waren in der Gruppe mit Dyspnoe ohne Hinweis auf PH nur 62% den NYHA-Klassen III und IV zuzuordnen und hatten daher bessere Voraussetzungen für den 6-Minuten-Gehtest. In einer Studie von Provencher et al. erreichten die Patienten mit idiopathischer PH Werte von 431 ± 87 m, wobei in dieser Studie kein Patient der NYHA-Klasse IV zuzuteilen war (Provencher, Chemla et al. 2006). Paciocco et al. schloss in seine Studie ebenfalls nur PH Patienten der NYHA-Klassen II und III ein und diese Patienten legten im Durchschnitt 275 ± 155 m im 6-Minuten-Gehtest zurück (Paciocco et al. 2001). Provencher et al. zeigten in einer anderen Studie mit IPAH Patienten der NYHA-Klassen III und IV, dass die Patienten im Durchschnitt 319 ± 105 m im 6-Minuten-Gehtest zurücklegen konnten (Provencher, Sitbon et al. 2006). Die ermittelten Werte der vorliegenden Arbeit sind damit den Werten anderen Studien der aktuellen Literatur ähnlich.

In einer Studie mit 1586 Patienten mit Dyspnoe zeigten Maisel et al. 2002, dass BNP sehr gut geeignet ist, um zwischen kardialer und nicht kardialer Dyspnoe zu differenzieren. In dieser Studie war die BNP-Messung den anderen anamnestischen und klinischen Befunden sowie Laborparametern überlegen. Bei einem Cut-off-Wert von 80 pg/ml lag die Sensitivität bei 93% und die Spezifität bei 74% um zwischen Dyspnoe bedingt durch Herzinsuffizienz und Dyspnoe aufgrund anderer Ursachen zu differenzieren (Maisel et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei der Auswertung der ermittelten BNP-Spiegel der Blutproben signifikante Unterschiede zwischen den Patienten ohne Hinweis auf PH (im Durchschnitt $38,45 \pm 5,98$ pg/ml) und den Patienten mit Hinweis auf PH (im Durchschnitt $237,2 \pm 70,46$ pg/ml). Im Hinblick auf die Ergebnisse verschiedener Studien ist bei den gemessenen BNP-Werten der in dieser Arbeit untersuchten Patienten ohne Hinweis auf PH von pulmonalen Ursachen der Dyspnoe auszugehen, die sich in der weiteren klinischen Diagnostik dieser Patienten auch bestätigte.

VEGF

Einer der stärksten Stimuli der VEGF-Expression ist Hypoxie und daher wahrscheinlich treibende Kraft für die Einleitung von Angiogenese im Rahmen von Organentwicklung und -wachstum (Levy et al. 1995). VEGF erhöht zudem die Gefäßpermeabilität und

durch eine Steigerung der Stickstoff- Monoxid- (NO-) Abgabe die Vasodilatation (Kroll et al. 1999 et 2000). Bereits frühe Untersuchungen konnten zeigen, dass VEGF in den plexiformen Läsionen bei Patienten mit PH exprimiert wird und somit eine signifikante Rolle im Pathomechanismus der PH einnimmt (Fujita et al. 2002).

Papaioannou et al. zeigten bereits, dass der Serum VEGF-Spiegel mit dem systolischen pulmonalarteriellen Druck korreliert. In ihrer Studie wurden 40 Patienten mit systemischer Sklerose einbezogen und es konnte gezeigt werden, dass bei den Patienten mit einem sPAP ≥ 35 mmHg der Serum VEGF-Spiegel signifikant höher war als bei den Patienten mit einem sPAP < 35 mmHg (352 [266, 462 pg/ml] vs 240 [201, 275 pg/ml], $p < 0.01$). (Papaioannou et al. 2009). Weiterhin steht der VEGF- Serum- Spiegel in signifikanter negativer Korrelation mit der Diffusionskapazität von Kohlenstoffmonoxid ($r = -0.471$, $p = 0.002$) (Papaioannou et al. 2009). In einer Studie von Kranenburg et al. wurde die vermehrte Expression von VEGF in den verschiedenen Zelltypen bei COPD- Patienten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei COPD ebenfalls eine erhöhter VEGF- Spiegel nachgewiesen werden konnte (Kranenburg et al. 2005). VEGF kann jedoch nur durch Bindung an seine Rezeptoren eine Wirkung erzielen. Zur Signalweiterleitung binden die verschiedenen VEGF-Moleküle (die VEGF-Familie besteht aus VEGF-A bis E und dem Plazentawachstumsfaktor (PlGF) (Neufeld et al. 1999; Keck et al. 1989)) an zwei unterschiedliche VEGF-Rezeptoren. Beide gehören in die Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren mit intrinsischer Aktivität. Sie werden als „fms-like tyrosine kinase receptor“ (Flt-1, auch VEGFR-1) und „kinase-domain insert containing receptor“ (KDR, auch VEGFR-2) bezeichnet (Tammela et al. 2005; Ahmad and Ahmed 2004). Kommt es zu einer Bindung an den Rezeptor „fms-like tyrosine kinase receptor“ (Flt-1, auch VEGFR-1) überträgt die membrangebundene Form (Flt-1) die angiogenen Signale ins Zellinnere, während der lösliche zirkulierende Rezeptor (soluble Flt-1, sFlt-1) die freien Wachstumsfaktoren VEGF und PlGF in der Zirkulation abfängt und so die Menge reguliert und gleichzeitig die Wirkung schwächt (Tammela et al. 2005; Ahmad and Ahmed 2004; Kendall and Thomas 1993). Bei Hypoxie wird die Produktion von sFlt-1 erheblich induziert, so dass vermehrt VEGF an dem löslichen Rezeptor gebunden ist und damit keine proangiogenetische Wirkung mehr erzielen kann. Folglich sinkt der VEGF- Spiegel im Serum in hypoxischen Zuständen. In der BIOSPHERE I- Studie konnte dieser Zusammenhang bereits gezeigt werden. Dabei wurden bei Patienten mit

PH signifikant niedrigerer VEGF-Werte im Vergleich zum gesunden Studienkollektiv gemessen.

sFlt-1

Karumanchi und Mitarbeiter beschreiben 2004 in ihrem Patentantrag US2004/0126828 A1, dass eine erhöhte Konzentration von sFlt-1 und eine erniedrigte Konzentration von VEGF und PlGF als diagnostischer Indikator einer Präeklampsie dienen. sFlt-1 („soluble fms-like tyrosine kinase-1“) hemmt das Gefäßwachstum der Plazenta, PlGF („placental growth factor“) fördert es. Verlohren et al. zeigten in einer Studie 2010, dass bei einem sFlt/PlGF-Quotient >85 ab der 20. Schwangerschaftswoche mit einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 95% eine Präeklampsie vorliegt bzw. sich innerhalb der nächsten vier Wochen entwickeln wird (Verlohren et al. 2010).

Die pathophysiologischen Prozesse bei Präeklampsie und pulmonaler Hypertonie sind insofern zu vergleichen, dass sowohl in der Plazenta als auch in der Lunge von Patienten mit pulmonaler Hypertonie hypoxische Verhältnisse vorliegen. Beide Umstände führen daher zu einer vermehrten Expression von sFlt-1. In der vorliegenden Arbeit konnte die Erhöhung der sFlt-1- Werte im Plasma bei Patienten mit PH gezeigt werden. Um zu zeigen, dass sFlt-1 als Biomarker einer pulmonalen Hypertonie geeignet sein könnte, wurde als Kontrollgruppe ein Patientenkollektiv mit Dyspnoe anderer Genese und echokardiographischem Ausschluss einer PH (PAPsys < 45 mmHg) gewählt. Dabei konnten signifikante Unterschiede des sFlt-1- Plasmaspiegels zwischen den Patienten ohne PH und den Patienten mit PH ermittelt werden, $p < 0,0001$. Die sFlt-1-Werte lagen bei Patienten mit Dyspnoe ohne PH (PAP < 45 mmHg) bei $67,22 \pm 1,68$ pg/ml. In der Vergleichsgruppe mit PH (PAP > 45 mmHg) zeigten sich Werte von $259,4 \pm 84,86$ pg/ml. Eine Ursache dieses Unterschieds liegt möglicherweise in der schlechten Oxygenierung des Blutes bei PH bedingt durch pathophysiologische Veränderungen der Lungenarterien in Form eines chronischen Gefäßumbaus („remodelling“) mit Zunahme der Mediadicke durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. *Im Gegensatz dazu ist bei dem Studienkollektiv mit Dyspnoe ohne PH kein wesentlicher Gefäßumbau zu erwarten.*

Unterschiedliche sFlt-1 Spiegel in zentralen und peripheren Proben

Im Vergleich mit den gemessenen sFlt-1- Werten in der BIOSPHERE I- Studie fiel auf, dass die dabei ermittelten Werte um ein vielfaches höher waren als in der vorliegenden Arbeit (BIOSPHERE II- Studie). In dem Studienkollektiv in der BIOSPHERE I- Studie wurden nur Patienten mit PH unterschiedlicher Ätiologie einbezogen und das gewonnene Plasma ausschließlich im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung aus der Arteria pulmonalis gewonnen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine periphere Vene zur Plasmagewinnung punktiert. Um einen Vergleich zwischen peripher entnommenen Blutproben mit zentral entnommenen Blutproben durchzuführen, untersuchten wir eine kleinere Studiengruppe von 25 Patienten. Dabei wurde im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung eine Blutprobe aus der Arteria pulmonalis und zur gleichen Zeit aus der Vena cubitalis entnommen. Die Messung der sFlt-Plasmawerte zeigt dabei einen signifikanten Unterschied zwischen den jeweiligen Proben. Bei den Patienten mit PH (mittlere PAP > 25 mmHg) konnten im zentralen Plasma sFlt-Werte von $2239 \pm 206,0$ pg/ml im Vergleich zum peripheren sFlt-Werten von $503 \pm 177,2$ pg/ml gemessen werden. Auch bei den Patienten ohne PH (mittlerer PAP < 25 mmHg) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den zentralen Proben $1353 \pm 431,4$ pg/ml und den peripheren Proben mit Werten von $105,2 \pm 6,094$ pg/ml. Die Ursache dieses signifikanten Unterschieds wurde bisher nicht geklärt. Gerber et al. konnten eine Transkriptionssteigerung von Flt-1 infolge Hypoxie via Hypoxie-induzierender-Faktoren, HIF-1, zeigen (Gerber et al. 1997). VEGF und sFlt-1 werde vor allem von den Endothelzellen speziell in der Lunge, Niere, Nebenniere und im Herzmuskel exprimiert und geringere Mengen von VEGF mRNA wurden auch in anderen Geweben wie Milz, Leberepithel, Darmmukosa und Brust entdeckt. Die höchsten Konzentrationen wurden jedoch in den Endothelzellen der Lungenalveolen, den Nierenglomeruli und den kardialen Myozyten nachgewiesen (Berse et al. 1992). Bei Hypoxie werden VEGF und sFlt-1 infolgedessen vor allem in diesen Geweben exprimiert und ins Blut abgeben. Daher befinden sich infolgedessen höhere Konzentrationen von sFlt-1 im Bereich des exprimierenden Gewebes, unter anderem der Lunge, als in der Peripherie. Dies ist eine Hypothese, weshalb es zu Unterschieden zwischen den Messwerten der peripher versus zentral entnommenen Blutproben kommt. In der Verwendung von sFlt als Biomarker für pulmonale Hypertonie sollte jedoch nur peripher entnommenes Blut betrachtet werden, da eine Untersuchung mittels Rechtsherzkatheter bzw. zentral- venösem Zugang zur Gewinnung von Blut aus einem

zentral gelegenen Blutgefäß nicht als Screening verwendet werden kann. Die angegebenen Ergebnisse und Messwerte dieser Arbeit beziehen sich deshalb ausschließlich auf peripher entnommene Blutproben.

Sensitivität und Spezifität von sFlt

Um sFlt-1 als Biomarker im klinischen Alltag nutzen zu können, muss für diesen Parameter ein optimaler „Cut-off“-Wert (Grenzwert) definiert werden. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit mit 73 pg/ml ermittelt. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte somit eine Sensitivität von 78,0% und eine Spezifität von 71,1% kalkuliert werden. Der negative Vorhersagewert ergab hierbei 91,7% und der positive Vorhersagewert lag bei 45,1%. Daraus kann man schlussfolgern, dass sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ein negatives Ergebnis (keine pulmonale Hypertonie) bei einem sFlt-Wert <73pg/ml in peripherem Blut vorausgesagt werden kann und damit eine Differenzierung bei Patienten mit Dyspnoe im Hinblick auf PH als Ursache erfolgen kann. Bei Patienten mit einem sFlt-1-Wert unter 73 pg/ml kann eine pulmonale Hypertonie als Ursache der Dyspnoe mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Bei den Patienten mit Werten über 73 pg/ml sollte weitere Diagnostik in Form von Echokardiographie und Rechtsherzkatheter erfolgen, um eine PH frühzeitig zu diagnostizieren und therapieren, da die Prognose entscheidend vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem Therapiebeginn abhängt (Olschewski 2006; Leschke et al. 2009).

Wertigkeit von sFlt im Vergleich zu BNP

Bisher dienen BNP und NT-proBNP als die am häufigsten eingesetzten Biomarker als prognostischer Parameter der pulmonalen Hypertonie (Warwick et al. 2008). In zahlreichen Studien konnte die positive Korrelation zwischen mPAP mit der funktionellen NYHA- Klassifikation (Nagaya et al. 2000, Leuchte et al. 2004) sowie dem 6-Minuten-Gehtest (Andreassen et al. 2006) aufgezeigt werden. Weiterhin hat sich der BNP-Spiegel als unabhängiger Prädiktor für die Mortalität erwiesen. Die 2-Jahres Überlebensrate ist deutlich höher bei einem BNP<180 pg/ml (Casserly and Klinger 2009). Jedoch gilt zu beachten, dass BNP nicht sensitiv für die pulmonale Hypertonie ist und bei Patienten mit kardialen Erkrankungen, die mit einer erhöhten Volumen- oder Druckbelastung einhergehen, ebenfalls erhöht ist. In der vorliegenden Arbeit wurde

neben sFlt-1 zusätzlich BNP im Serum bestimmt. Dabei zeigten sich zwar signifikante Unterschiede zwischen den Patienten ohne echokardiographische Hinweise auf PH (im Durchschnitt $38,45 \pm 5,98$ pg/ml) und den Patienten mit Hinweis auf PH (im Durchschnitt $237,2 \pm 70,46$ pg/ml), jedoch konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls gezeigt werden, dass BNP als diagnostischer Marker nur in 55% der Fälle bei den Patienten mit gesicherter pulmonaler Hypertonie >80 pg/ml lag. Das heißt, bei 45% aller Patienten mit Hinweis auf pulmonaler Hypertonie wurde ein BNP < 80 pg/ml gemessen. Bei diesen, durch BNP nicht detektierten, PH-Patienten wurden positive sFlt-1-Werte (sFlt-1 >73 pg/ml) gemessen. Dieses Ergebnis zeigt, dass sFlt-1 in fast der Hälfte aller Fälle eine pulmonale Hypertonie genauer vorhersagen konnte als BNP.

Im Hinblick auf dieses Ergebnis könnte sFlt-1 als Biomarker der pulmonalen Hypertonie im klinischen Alltag neben der Echokardiographie eine wichtige Rolle in der Diagnostik, vor allem in den Anfangsstadien der PH spielen, jedoch ist bisher nicht bekannt, ob sFlt-1 als Prädiktor für die Mortalität der PH eingesetzt werden kann.

Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine schwere, im Verlauf rasch progrediente Erkrankung,

mit einer Prävalenz von 1-2 pro einer Million mit einer schlechten Prognose. Die mittlere Überlebenszeit beträgt nach Diagnosestellung ohne spezifische Therapie nur 2,8 Jahre. Daher sind eine frühzeitige Diagnosestellung und eine rasche Therapieeinleitung von entscheidender Bedeutung. Bislang wurde zur Diagnostik der PH das Elektrokardiogramm, die Lungenfunktion, die Thoraxröntgenaufnahme, der BNP- Spiegel sowie die Echokardiographie genutzt. Bestehen in diesen Untersuchungen Hinweise auf einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck, dient die Rechtsherzkatheteruntersuchung weiterhin als Goldstandard in der Diagnostik. Jedoch finden sich Zeichen einer Rechtsherzbelastung erst in späteren Stadien in den oben genannten Untersuchungen. Daher ist eine Methoden zur frühzeitigen Detektion entscheidend.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Gießen 41 Patienten mit Dyspnoe und echokardiographischen Hinweisen auf eine pulmonale Hypertonie, sowie 138 Patienten mit Dyspnoe ohne Hinweis auf PH in die Studie eingeschlossen. Die Abschätzung des systolischen pulmonal-arteriellen Druck und damit die Zuordnung zur Gruppe mit bzw. ohne Hinweis auf PH erfolgten in der vorliegenden Arbeit durch eine transthorakale Echokardiographie. Entsprechend der Kriterien des Symposiums für pulmonale Hypertonie in Dana Point 2008 liegt ab einem systolischen pulmonal-arteriellen Druck > 45 mmHg der echokardiographische Hinweis auf eine pulmonale Hypertonie vor.

Bei diesen Patienten wurde der Biomarker sFlt-1 im Plasma bestimmt und es konnten zwischen den Patienten ohne PH und den Patienten mit PH ein signifikanter Unterschied des Plasmaspiegels von sFlt-1 ermittelt werden, $p < 0,0001$. Die sFlt-Werte lagen bei Patienten mit Dyspnoe ohne Hinweis auf PH ($PAP < 45$ mmHg) bei $67,22 \pm 1,68$ pg/ml. In der Vergleichsgruppe mit Zeichen einer PH ($PAP > 45$ mmHg) zeigten sich Werte von $259,4 \pm 84,86$ pg/ml. Um sFlt-1 als Biomarker der PH im klinischen Alltag nutzen zu können, muss für diesen Parameter ein optimaler „Cut-off“-Wert (Grenzwert) definiert werden. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit mit 73 pg/ml ermittelt. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte somit eine Sensitivität von $78,0\%$ und eine Spezifität von $71,1\%$ kalkuliert werden. Der negative Vorhersagewert

ergab hierbei 91,7%. Bei Patienten mit einem sFlt-1-Wert unter 73 pg/ml kann eine pulmonale Hypertonie als Ursache mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Bei den Patienten mit Werten über 73 pg/ml sollte weitere Diagnostik in Form von Echokardiographie und Rechtsherzkatheter erfolgen, um eine PH frühzeitig zu diagnostizieren und therapieren. Weiterhin wurde aus den entnommenen Plasmaproben zusätzlich BNP bestimmt. Die gemessenen BNP-Werte lagen bei den Patienten ohne Hinweis auf PH im Durchschnitt bei $38,45 \pm 5,98$ pg/ml und bei Patienten mit PH bei $237,2 \pm 70,46$ pg/ml. Jedoch konnten nur 55% der Patienten mit gesicherter pulmonaler Hypertonie durch BNP detektiert werden (BNP >80 pg/ml). Bei 45% der nicht durch BNP detektierten Patienten mit Hinweis auf pulmonaler Hypertonie, war sFlt-1 jedoch positiv, d.h. >73 pg/ml. Dieses Ergebnis zeigt, dass sFlt-1 in fast der Hälfte aller Fälle eine pulmonale Hypertonie genauer vorhersagen konnte als BNP.

Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a severe progressive disease with a median survival time of about 2,8 years to death. The diagnosis at an early stage of the disease is essential for successful treatments and the survival of the patients. To date, the diagnosis is based on exclusion of other causes, using patient history, radiography, pulmonary function testing, serologic tests, echocardiography and right heart catheterization. In the area of laboratory diagnosis, there are no specific markers, except for BNP, for the diagnosis and the process of PH. But BNP is not specific to PH. This study aimed to determine whether soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) could be used as specific biomarkers for PH.

Methods: In the department of pulmonary hypertension of the University Medical Centre of Giessen, 179 patients were included with aggravated respiratory activity. All patients got an echocardiographic examination. To safely and non-invasively detect pulmonary hypertension, a systolic pulmonary artery pressure > 45 mmHg detected pulmonary hypertension according to the criteria of the Symposium on Pulmonary Hypertension in Dana Point in 2008. After echocardiographic criteria 41 patients had pulmonary hypertension and 138 patients had dyspnea not accompanied by pulmonary hypertension. After taking blood of all this patients from the cubital vein, the serum was analyzed for BNP and soluble fms-like tyrosine kinase 1, sFlt-1 using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Result: In patients with pulmonary hypertension sFlt-1 plasma level was significantly higher than in patients with dyspnea without pulmonary hypertension ($259,4 \pm 84,86$ pg/ml vs. $67,22 \pm 1,68$ pg/ml ; $p < 0,0001$). To use sFlt-1 in the clinical routine, an optimal “cut-off” value of 73 pg/ml was determined. In this study a sensitivity of 78,0% and a specificity of 71,1% is calculated. This resulted in a negative predictive value of 91,7%. In conclusion a high probability to have no pulmonary hypertension can be predicted at patients with a sFlt-1 < 73 pg/ml in peripheral blood.

In patients with confirmed pulmonary hypertension BNP as diagnostic marker is in only 55% of cases > 80 pg/ml. 45% of the patients with pulmonary hypertension and negative BNP (< 80 pg/ml) had a positive s-Flat-1 level (> 73 pg/ml). This study demonstrates that sFlat-1 in almost half the cases could predict pulmonary hypertension more accurate than BNP.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ANP	atriales natriuretisches Peptid
BNP	Brain (B-Type) Natriuretic Peptide
bzw.	beziehungsweise
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CW	Continuous wave
Echo	Echokardiografie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
FEV1	in 1 Sekunde maximal expiriertes Volumen (absolut)
FEV1%VC	relative Einsekundenkapazität
HF	Herzfrequenz
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
KHK	Koronare Herzkrankheit
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
mPAP	mittlerer Pulmonalarteriendruck
mRNA	messenger-RNA
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	N-Terminales proBNP
NYHA	New York Heart Association
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarteriendruck
PAPdia	diastolischer Pulmonalarteriendruck

PAPsys	systolischer Pulmonalarteriendruck
PCWP pressure)	pulmonaler kapillärer Verschlussdruck (pulmonary capillary wedge
pg	Piktogramm
PH	pulmonale Hypertonie
PW	Pulsed Wave; PW – Doppler = gepulster Doppler
RNA	Ribonukleinsäure
sFlt-1	soluble VEGFR1
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1	Fms-Like Thyrosinkinase-1; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 1
vs	versus; gegen
WHO	World Health Organisation
ZVD	Zentraler Venendruck

Literaturverzeichnis

- **Abraham WT, Lowes BD, Ferguson DA, Odom J, Kim JK, Robertson AD, Bristow MR, Schrier RW**, Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure, *J Card Fail*, 1998. 4: S.37-44.
- **Ahearn GS, Tapson VF, Rebeiz A, Greenfield JC**, Electrocardiography to define clinical status in primary pulmonary hypertension and pulmonary arterial hypertension secondary to collagen vascular disease. *Chest*, 2002. 122(2): S524-527.
- **Ahmad S and Ahmed A**, Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia, *Circ Res*, 2004. 95(9): S.884-891.
- **Andreassen AK, Wergeland R, Simonsen S, Geiran O, Guevara C, Ueland T.**, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as an indicator of disease severity in a heterogeneous group of patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 2006. 98: S.525–529.
- **Antman EM.** Decision making with cardiac troponin tests. *N Engl J Med*, 2002. 346: S.2079–2082.
- **Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A**, Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension, *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(1): S55-66.
- **Barst RJ, Gibbs JSR, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Rubin LJ, Sitbon O, Tapson VF, Galiè N**, Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension, *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(1): S78-84.
- **Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S**, Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(12): S40-47.
- **Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, and Senger DR**, Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed

differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, 1992. 3 (2):211-220.

- **Blanchard DG, Malouf PJ, Gurudevan SV, Auger WR, Madani MM, Thistlethwaite P, Waltman TJ, Daniels LB, Raisinghani AB, DeMaria AN**, Utility of right ventricular tei index in the noninvasive evaluation of chronic thromboembolic pulmonary hypertension before and after thromboendarterectomy, *J Am Coll Cardiol Img*, 2009. 2: S143-149.
- **Bogdan M, Humbert M, Francoal J, Claise C, Duroux P, Simonneau G, Lindenbaum A**, Urinary cGMP concentrations in severe primary pulmonary hypertension, *Thorax*, 1998. 53: S.1059–1062.
- **Böhm M, Kindermann I, Kindermann M**, Invasive Diagnostik der pulmonalen Hypertonie und der Folgen für das rechte Herz, *Dtsch Med Wochenschr*, 2006. 131: S300-303.
- **Boissiere J, Gautier M, Machet MC, Hanton G, Bonnet P, Eder V**, Doppler tissue imaging in assessment of pulmonary hypertension-induced right ventricle dysfunction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289: S2450-2455.
- **Brock T, Dvorak HF, Senger DR**, Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and vonWillebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol*, 1991. 138: S.213-221.
- **Cassery B, Klinger JR**, Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent, *Drug Des Devel Ther*, 2009. 3: S.269-287.
- **Cea LB**, Natriuretic peptide family: new aspects. *Current Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 2005. 3(2): S.87-98.
- **Chhabra SK, Gupta AK, Khuma MZ**, Evaluation of three scales of dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease, *Ann Thorac Med*, 2009. 4(3): S.128–132.
- **Christ M, Mueller C**, Bestimmung natriuretischer Peptide bei Atemnot, *Dtsch Arztebl*, 2008. 105(6): S.95-100.
- **D’Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, Levy PS, Pietra GG, Reid LM, Reeves JT, Rich S, Vreim CE, Williams GW, Wu M**, Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results from a national prospective registry, *Ann Intern Med*, 1991. 115: S.343–349.

- **Erdmann E**, Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße, *Springer Verlag*, 2009. 7: S.291-303.
- **Fijalkowska A, Kurzyna M, Torbicki A, et al.**, Serum Nterminal brain natriuretic peptide as a prognostic parameter in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 2006. 129: S.1313–1321.
- **Fisher MR, Forfia PR, Chamera E, Houston-Harris T, Champion HC, Girgis RE, Corretti MC, Hassoun PM**, Accuracy of doppler echocardiography in the hemodynamic assessment of pulmonary hypertension, *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 179: S615-621.
- **Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hennes AR, Borlaug BA, Chamera E, Corretti MC, Champion HC, Abraham TP, Girgis RE, Hassoun PM**, Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension, *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 174(9): S1034-1041.
- **Fujita M, Mason RJ, Cool C, Shannon JM, Hara N, Fagan KA**, Pulmonary hypertension in TNF-alpha-overexpressing mice is associated with decreased VEGF gene expression, *J Appl Physiol*, 2002. 93(6): S.2162-2170.
- **Gainé SP and Rubin LJ**, Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 1998. 352: S.719-725.
- **Gainé SP, Rubin LJ**, Primary pulmonary hypertension, *Lancet*, 1998. 352(9129):S719-25.
- **Galiè N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G**, Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension, *Eur Heart J*, 2004. 25:S2243-2278.
- **Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N**, Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDAR, is upregulated by hypoxia, *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272; S. 23659-67.
- **Ghio S**, Role of echo doppler techniques in the evaluation and treatment of heart failure patients, *Eur Heart J Suppl*, 2006. 8: S28-31.
- **Giaid A**, Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Chest*, 1998. 114: S.208-212.

- **Giaid A, Saleh D**, Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1995. 333: S.214-221.
- **Gruber S**, Gynäkologie und Geburtshilfe, *Elsevier, Urban&Fischer Verlag*. 2. Auflage, 2007. S.110-111.
- **Grünig E, Barner A, Bell M, Claussen M, Dandel M, Dumitrescu D, Gorenflo M, Holt S, Kovacs G, Ley S, Meyer JF, Pabst S, Riemekasten G, Saur J, Schwaiblmair M, Seck C, Sinn L, Sorichter S, Winkler J, Leuchte HH**, Nicht-invasive Diagnostik der pulmonalen Hypertonie, *Dtsch med Wochenschr* 2010. 135: S.67-S77.
- **Habib G, Torbicki A**, The role of echocardiography in the diagnosis and management of patients with pulmonary hypertension, *Eur Respir Rev*, 2010. 118(19): S288-299.
- **Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W**, Vacular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations, *Dtsch Med Wochenschr*, 1998. 123: S.259-265.
- **Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L**, Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am.J Med*, 1995. 99: S.249-254.
- **Houck KA, Ferrara J, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW**, The vascular endothelial growth factor family. Identification of a fourth molecular species and characterisation of alternative splicing of RNA, *Mol. Endocrinol*, 1991. 5: S.1806-1814.
- **Humbert M**, Improving survival in pulmonary arterial hypertension, *Eur Respir J*, 2005. 25(2): S.218-220.
- **Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eikelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M**, Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension, *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(12): S13-24.
- **Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M**, Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43: S.13-24.

- **Ishii J, Nomura M, Ito M, et al.**, Plasma concentration of brain natriuretic peptide as a biochemical marker for the evaluation of right ventricular overload and mortality in chronic respiratory disease. *Clin Chim Acta* 2000. 301: S.19–30.
- **Ishikawa S, Miyauchi T, Ueno H, Ushinohama H, Sagawa K, Fusazaki N, Sunagawa H, Honda S, Sakai S, Yamaguchi I, et al.**, Influence of pulmonary blood pressure and flow on endothelin-1 production in humans. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995. 26(3): S.429-433.
- **Joshi K, Anjum F, Gowda S, Damania D, Graham-Hill S, Gillette P, Zein J, Jamaledine G, Demetis S, Wadgaonkar R**, Uric Acid as a Potential Biomarker of Pulmonary Arterial Hypertension in Patients with Sickle Cell Disease, *Indian J Hematol Blood Transfus*, 2011. 27(2): S.96-100.
- **Karumanchi SA, Maynard S, Sukhatme VP**, Methods of diagnosing and treating pre-eclampsia and eclampsia, *United States Patent ApplicationPublication*, 2004. US 2004/0126828 A1.
- **Keck PJ, Hauser SD, Krivi G**, Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF, *Science*, 1989. 246: S.1309-1312.
- **Kendall RL and Thomas KA**, Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993. 90(22): S.10705-9.
- **Kircher BJ, Himelman RB, Schiller NB**, Noninvasive estimation of right atrial pressure from the inspiratory collaps of the inferior vena cava, *Am J Cardio*, 1990. 66: S493-496.
- **Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, Takeda S, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y**, Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88: S.2348-2351.
- **Kranenburg AR, de Boer WI, Alagappan VKT, Sterk PJ, Sharma HS**, Enhanced bronchial expression of vascular endothelial growth factor and receptors (Flk-1 and Flt-1) in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Thorax*, 2005. 60: S.106–113.
- **Kroll J and Waltenberger J**, Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), *Z Kardiol*, 2000. 89: S. 206-218.

- **Kroll J, Waltenberger J**, A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. 265: S.636-639.
- **Kuhn M**, Molecular physiology of natriuretic peptide signaling, *Basic Research in Cardiology*, 2004. 99: 76-82.
- **Lakoumentas JA, Panou FK, Kotseroglou VK, Aggeli KI, Harbis PK**, The Tei Index of Myocardial Performance: Applications in Cardiology, *Hellenic J Cardiol*, 2005. 46: S. 52-58.
- **Leschke M, Wädlich A, Waldenmaier S, Faehling M**, Diagnostik der pulmonalen Hypertonie, *Internist*, 2009.50(9):S1086-1100.
- **Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, et al.**, Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004. 43: S.764–770.
- **Leuchte HH, Holzapfel M, Baumgartner RA, Neurohr C, Vogeser M, Behr J.**, Characterization of brain natriuretic peptide in long-term follow-up of pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2005. 128: S.2368–2374.
- **Leuchte HH, Neurohr C, Baumgartner R, et al.**, Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004. 170: S.360–365.
- **Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N**, Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science*, 1989. 246: S.1306-1309.
- **Levin ER**, Endothelins, *N Engl J Med*, 1995. 333(6): S.356-363.
- **Levin ER, Gardner DG, Samson WK**, Natriuretic peptides, *N Engl J Med*, 1998. 339: S.321-328.
- **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA**, Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia, *N Engl J Med*, 2004. 350: S.672-683.
- **Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA**, Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia, *J Biol Chem*, 1995. 270: S. 13333-13340.

- **Löllgen H, Ulmer HV.**, Das Gespräch während der Ergometrie: Die Borg-Skala. *Dtsch Arztebl* 2004. 101:S.1014-1015 [Heft 15].
- **Luscher TF and Barton M**, Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs, *Circulation*, 2000. 102(19): S.2434-2440.
- **Mahler DA, Weinberg DH, Wells CK, Feinstein AR**, The measurement of dyspnea. Contents, interobserver agreement, and physiologic correlates of two new clinical indexes. *Chest*.1984. 85(6): S.751-758.
- **Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P et al.**, Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med*, 2002. 347(3): S.161–167.
- **Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA**, Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia, *J Clin Invest*, 2003. 111: S. 649-658.
- **McDonald LJ, Murad F**, Nitric oxide and cyclic GMP signaling, *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996. 211: S.1–6.
- **McGoon MD, Kane GC**, Pulmonary Hypertension: Diagnosis and Management, *Mayo Clin Proc*, 2009. 84(2): S191-207.
- **Mereles D, Grünig E**, A stepwise and practical approach to optimizing echocardiography in pulmonary hypertension, *Advances in pulmonary hypertension*, 2006. 5(3): S30-33.
- **Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, Nakanishi N, Miyatake K.**, Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000. 161(2 Pt 1): S.487-92.
- **Miyauchi T and Masaki T**, Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system, *Annu Rev Physiol*, 1999. 61: S.391-415.
- **Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, McLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX,**

Weir EK, Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension, *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(1): S20-31.

- **Munagala VK, Burnett JC Jr, Redfield MM.**, The natriuretic peptides in cardiovascular medicine. *Curr Probl Cardiol* 2004. 29: S.707–769.
- **Nagaya N, Ando M, Oya H, et al.**, Plasma brain natriuretic peptide as a noninvasive marker for efficacy of pulmonary thromboendarterectomy. *Ann Thorac Surg* 2002. 74: S.180–184.
- **Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, et al.**, Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1998. 31: S.202–208.
- **Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al.**, Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000. 102: S.865–870.
- **Nagaya N, Sasaki N, Ando M, et al.**, Prostacyclin therapy before pulmonary thromboendarterectomy in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest* 2003. 123: S.338–343.
- **Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N, Yamagishi M, Kunieda T, Miyatake K**, Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. 160: S.487–492.
- **Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z**, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *The FASEB Journal*, 1999. 13: S.9-22.
- **Olschewski H**, Derzeitige Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie, *Dtsch Med Wochenschr*, 2006. 131: S334-337.
- **Olschewski H, Hoepfer MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber FX, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick I, Wilkens H, Winkler J, Worth H**, Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie, *Pneumol*, 2006. 60:S749-771.
- **Olschewski H, Seeger W, Grimminger F**, Physiologie und Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation, *Internist*, 1999. 40(7): S696-709.
- **Paciocco G, Martinez FJ, Bossone E, Pielsticker E, Gillespie B, Rubenfire M**, Oxygen desaturation on the six-minute walk test and mortality in untreated primary pulmonary hypertension, *Eur Respir J*, 2001. 17:S.647-652.

- **Papaoiannou AI Zakynthinos E, Kostikas K, Kiropoulos T, Koutsokera A, Ziogas A, Koutroumpas A, Sakkas L, Konstantinos I Gourgoulialis KI, Daniil ZD**, Serum VEGF levels are related to the presence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis, *BMC Pulmonary Medicine*, 2009. 9: S.18.
- **Prahash A, Lynch T**, B-type natriuretic peptide: a diagnostic, prognostic, and therapeutic tool in heart failure, *Am J Crit Care*, 2004. 13(1): S. 46-53.
- **Provencher S, Chemla D, Herve P, Sitbon O, Humbert M, Simonneau G**, Heart rate responses during the 6-minute walk test in pulmonary arterial hypertension, *Eur Respir J*, 2006. 27: S.114-120.
- **Provencher S, Sitbon O, Humbert M, Cabrol S, Jais X, Simonneau G**, Long-term outcome with first-line bosentan therapy in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*, 2006. 27: S.589-595.
- **Q. Zhou, Z. J. Ye et al.**, Diagnostic value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide for pleural effusion due to heart failure: a meta-analysis. *Heart (British Cardiac Society)*, 2010. 96(15): S.1207–1211.
- **Rabinovitch M**, Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension, *J Clin Invest*, 2008. 118: S2372-2379.
- **Robinson CJ and Stringer SE**, The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors, *J Cell Sci*, 2001. 114: S.853-865.
- **Rosenkranz S**, Pulmonale Hypertonie: Klassifikation, Pathophysiologie und nicht- invasive Diagnostik, *Dtsch Med Wochenschr*, 2006. 131: S295- 299.
- **Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G**, Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension, *Chest*, 2001. 120(5): S.1562-1569.
- **Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G**, Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*, 2001. 120: S.1562-1569.
- **Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G**, Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2002. 346(12): S. 896-903.

- **Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, Solomon SD, Louie EK, Schiller NB**, Guidelines for the echocardiographic assessment of the right hearts in adults, *J Am Soc Echocardiogr*, 2010. 23: S685-713.
- **Runo JR, Loyd JE.**, Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 2003. 361(9368): S.1533-44.
- **Schannwell CM, Steiner S, Strauer BE**, Diagnostics in pulmonary hypertension. *J Physiol Pharmacol*, 2007. 58(5): S591-602.
- **Schmitz G, Endres S, Götte D**, Biomarker-Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung, *Schattauer Verlag*, 2008.
- **Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing Z, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R**, Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension, *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(1): S43-54.
- **Sitbon O, Badesch DB, Channick RN, Frost A, Robbins IM, Simonneau G, Tapson VF, Rubin LJ**, Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension: a 1-year follow-up study. *Chest*, 2003. 124(1): S. 247-54.
- **Solway S, Brooks D, Lacasse Y, Thomas S.**, A qualitative systematic overview of the measurement properties of functional walk tests used in the cardiorespiratory domain. *Chest*. 2001. 119: S.256-70.
- **Steiner S, Strauer BE**, Pathophysiologie des rechten Ventrikels bei Lungenerkrankungen, *Internist*, 2009. 50(9):S1054-1063.
- **Stillman IE, Karumanchi SA** The glomerular injury of preeclampsia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007. 18(8): S.2281-2284.
- **Sudoh, T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H**, A new natriuretic peptide in porcine brain, *Nature*, 1988. 332: S.78-81.
- **Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K**, The biology of vascular endothelial growth factors, *Cardiovasc Res*, 2005. 65(3): S. 550-563.
- **Tei C, Ling LH, Hodge DO, Bailey KR, Oh JK, Rodeheffer RJ, Tajik AJ, Seward JB**, New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function-a study in normals and dilated cardiomyopathy, *J Cardiol*, 1995. 26(6): S357-366.

- **Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, et al.** Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Circulation*, 2003. 108: S.844–848.
- **Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, Pape J, Dudenhausen JW, Denk B, Stepan H,** An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol*, 2010. 202(2):161.e1-161.e11.
- **Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM,** Vascular endothelial growth factor in the lung, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. 290(2): S.209-221.
- **Vonk MC, Sander MH, van den Hoogen FHJ, van Riel PLCM, Verheugt FWA, van Dijk APJ,** Right ventricle Tei-index: a tool to increase the accuracy of non-invasive detection of pulmonary arterial hypertension in connective tissue diseases, *Eur J Echocardiography*, 2007. 8: S317-321.
- **Voswinkel R, Reichenberger F, Gall H, Seeger W, Grimminger F, Ghofrani HA,** Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie, *Internist*, 2009. 50: S1101-1110.
- **Warwick G, Thomas PS, Yates DH,** Biomarkers in pulmonary hypertension, *Eur Respir J*, 2008. 32: S.503-512.
- **Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K,** Localisation and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*, 1994. 90: S.195–203.
- **Yoshimura M, Yasue H, Morita E, Sakaino N, Jougasaki M, Kurose M, Mukoyama M, Saito Y, Nakao K, Imura H,** Hemodynamic, renal, and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure, *Circulation*, 1991. 84: S.1581-1588.
- **Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H,** Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation*, 1993. 87: S.464-469.

Anhang
Patientenfragebögen

The BIOSPHERE-Study



Biomarker sFlt and PIGF in patients with
acute and chronic dyspnoea



Medizinische Klinik
Paul-Meimberg-Str. 5
35959 Giessen

Studienleiter Prof.
Dr. Ghofrani

Ansprechpartner:
Dr. H. Nef, H. Gall,
Dr. R. Voswinckel,
Julia Meier

Einverständniserklärung

Sehr geehrter Patient, sehr geehrte Patientin,

wir führen zur Zeit die BIOSPHERE-Studie mit dem Ziel durch, um Patienten mit Luftnot (= Dyspnoe) schneller und gezielter helfen zu können.

Dazu werden Patienten mit Luftnot und Lungenerkrankungen untersucht und wir weisen ein Eiweiß im Blut nach, der in Zukunft bereits vor aufwendigen Untersuchungen Auskunft über die Ursache der Luftnot geben soll.

Für diese Studie benötigen wir von Ihnen eine sehr geringe Menge Blut und bitte Sie, einen Fragebogen auszufüllen. Persönliche Daten, Ihre Angaben im Fragebogen, sowie Laborwerte bleiben selbstverständlich anonym. Die Blutproben werden nicht für genetische Analysen verwendet. Eine Blutentnahme hat das Risiko, in seltenen Fällen zu einer Infektion, einer Verletzung von Strukturen nahe der Punktionsstelle oder zu einem Bluterguss führen.

Wir bitten um freundliches Einverständnis, damit wir Patienten mit Luftnot in Zukunft besser helfen können. Wir bedanken uns ganz herzlich für Ihre Mithilfe und wünschen Ihnen alles Gute.

(Datum, Ort)

(Unterschrift Patient)

(Datum, Ort)

(Unterschrift Arzt)

Biomarker sFit and PIGF in patients with acute and chronic dyspnoea

Patientenfragebogen: Bitte mit dem Patienten ausfüllen oder ausfüllen lassen.

Name des Patienten:

Datum:

Bitte tragen Sie hier Ihre typischen Beschwerden/Symptome ein, und bewerten Sie diese anhand der nachfolgenden Punkte:

NYHA IV			
	ja	nein	
manchmal			
1. in Ruhe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. beim Aufstehen oder Anziehen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. beim Waschen, Zähneputzen, Duschen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. im Haus herumgehen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. langsames Gehen in der Ebene	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

NYHA III			
6. Treppensteigen bis 2 Treppen bei langsamer Geschwindigkeit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Gehen in der Ebene bei normaler Geschwindigkeit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

NYHA II			
8. Treppensteigen mehr als 2 Treppen bei normaler Geschwindigkeit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Bergangehen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
NYHA I			

10. Anstrengende körperliche Aktivität

Borg-Skala

Als wie stark empfanden die Sie die Atemnot während der letzten 24 Stunden?

0 = überhaupt keine Atemnot

0,5 = sehr, sehr milde (knapp wahrnehmbar)

1 = sehr milde

2 = milde

3 = mäßig

4 = recht schwer

5 = schwer

6

7 = sehr schwer

8

9 = sehr, sehr schwer (fast maximal)

10 = maximale Atemnot

Körpergewicht (kg) _____

Körpergröße (m) _____

Dyspnoe-Fragebogen nach Mahler

Funktionelle Beeinträchtigung

- Keine Beeinträchtigung: Alltägliche Aktivitäten und Beruf können ohne Atemnot ausgeführt werden
- Leichte Beeinträchtigung: Reduktion der Belastbarkeit im Beruf oder in alltäglichen Aktivitäten, die geringfügig oder nicht ganz eindeutig durch Atemnot verursacht wird.
- Mittlere Beeinträchtigung: Sie haben die Arbeit gewechselt und/oder sind in mindestens einer alltäglichen Aktivität stark beeinträchtigt aufgrund von Atemnot
- Schwere Beeinträchtigung: Sie können nicht mehr berufstätig sein *oder* müssen die meisten alltäglichen Aktivitäten wegen der Atemnot aufgeben
- Sehr schwere Beeinträchtigung: Sie können nicht mehr berufstätig sein *und* müssen die meisten alltäglichen Arbeiten wegen der Atemnot aufgeben

Alltägliche Aktivitäten: Aufgaben des täglichen Lebens, Reinigung der Wohnung, Gartenarbeiten, einkaufen gehen etc.

Ausmaß der Belastungsfähigkeit

- Sehr hoch: Sie haben nur bei außergewöhnlichen Aktivitäten wie dem Tragen von sehr schweren Lasten (>10 kg) und beim Sport Atemnot. Bei alltäglichen Aufgaben kommt es nicht zu Atemnot.
- Hoch: Sie bekommen nur bei schwereren Aktivitäten wie steile Berge gehen, steigen von mehr als drei Etagen Treppen oder tragen von schweren Gegenständen Atemnot.
- Mittelmäßig: Atemnot bei durchschnittlichen Aktivitäten wie z. B. leicht bergauf gehen, weniger als drei Etagen Treppen steigen, leichte Gegenstände (bis 5 kg) tragen
- Leicht: Atemnot bei leichten Aktivitäten wie z.B. in der Ebene gehen, waschen oder stehen
- sehr leicht: Atemnot bereits in Ruhe, im Sitzen oder Liegen

Ausmaß der Anstrengung, die zu Luftnot führt

- Sehr hoch: Atemnot nur bei sehr großen Anstrengungen. Keine Atemnot bei alltäglichen Anstrengungen
- Hoch: Atemnot bei großer Anstrengung. Aufgaben können ohne Pause erledigt werden, es sei denn die Aufgaben benötigen außergewöhnliche Anstrengungen.
- Mittelmäßig: Atemnot bei mäßiger Anstrengung. Aufgaben können mit gelegentlichen Pausen ausgeführt werden, die Ausführung dauert jedoch länger als bei durchschnittlichen Personen
- Leicht: Atemnot bei geringer Anstrengung. Leichte Aufgaben können ohne Pause, schwere Aufgaben mit regelmäßigen Pausen erledigt werden. Sie benötigen zur Ausführung der Arbeit 50-100% mehr Zeit als eine durchschnittliche Person.
- Keine Anstrengung möglich: Atemnot bereits in Ruhe, im Sitzen oder Liegen

Biomarker sFlt and PIGF in patients with
acute and chronic dyspnoea



Medizinische Klinik
Paul-Meimberg-Str. 5
35959 Giessen

Studienleiter Prof.
Dr. Ghofrani

Ansprechpartner:
Dr. H. Nef, H. Gall, Dr.
R. Voswinckel

Rechtsherzechokardiographie

Linksventrikuläre Funktion (EF): _____%

Rechtsventrikuläre Dilatation: ja nein

Paradoxe Septumbewegung: ja nein

RVOT-Flussprofil: AT _____ msec AT/ET _____

Tei-Index: _____

TAPSE: _____mm

Trikuspidalinsuffizienz Grad I II III IV

sPAP (inkl. ZVD): _____mmHg

ZVD: _____mmHg

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Henning Tiede für das entgegengebrachte Vertrauen und die unermüdliche und geduldige Unterstützung dieser Arbeit. Er stand mir jederzeit mit großer Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen zur Seite und motivierte auch in schwierigeren Phasen.

Herrn Prof. Dr. Ardeschir Ghofrani danke ich für die Stellung des Themas und die Möglichkeit umfangreiche Erfahrungen und Kenntnisse im wissenschaftlichen Arbeiten sammeln zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Holger Nef danke ich für die Durchführung der Echokardiographien und der wissenschaftlichen Unterstützung im Hinblick auf die Auswertung der erhobenen Daten.

Dem ganzen Team der Lungenambulanz und den Mitarbeiter der Medizinischen Klinik II der Universitätsklinik Gießen danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen bei der klinischen Tätigkeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Patienten, die der Teilnahme an dieser Studie zugestimmt haben.

Nicht zuletzt gilt der Dank meinem Freund Jan und meiner Familie, die mir während dieser Zeit immer eine unverzichtbare Unterstützung waren und mich mit viel Liebe, Geduld und Aufmunterung immer wieder neu motivierten.

