

Monozyten-chemotaktisches Protein-1 und Thrombomodulin als Biomarker bei pulmonaler Hypertonie

Inauguraldissertation

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

Gießen, 2016

vorgelegt von Insa Katharina Juliane Randaxhe aus Willich/ Kreis Viersen

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger

der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: Prof. Dr. G. Lochnit

Tag der Disputation: 01.06.2017

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Pulmonale Hypertonie	1
1.1.1 Definition und Klinik.....	1
1.1.2 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie.....	1
1.1.3 Physiologie und Pathogenese	6
1.1.3.1 Vasodilatation und Vasokonstriktion.....	7
1.1.3.2 Proliferation und Wachstumsfaktoren.....	8
1.1.3.3 Inflammation	9
1.1.3.4 Gerinnung	9
1.1.4 Diagnostik der pulmonalen Hypertonie	10
1.1.5 Therapie der pulmonalen Hypertonie	11
1.2 Medizinische Biomarker	14
1.2.1 Definition und Entwicklung	14
1.2.2 Bereits genutzte Biomarker bei pulmonaler Hypertonie	15
1.2.3 Monozyten-chemotaktisches Protein-1.....	16
1.2.4 Thrombomodulin (TM).....	17
2 Fragestellung der Arbeit	20
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Probengewinnung und Blutproben	21
3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	21
3.3 Datenanalyse und Statistik	22
4 Ergebnissteil.....	24
4.1 Ergebnisse für MCP-1	24
4.1.1 Charakterisierung des MCP-1-Patientenkollektivs.....	24
4.1.2 Charakterisierung des Ausschlusskollektivs	25
4.1.3 MCP-1-Plasmaspiegel.....	25
4.1.3.1 MPC-1-Plasmaspiegel der einzelnen Entitäten	26

4.1.3.2	MCP-1-Plasmaspiegel der NYHA-Stadien und der Geschlechter...	27
4.1.3.3	Korrelation der MCP-1-Plasmaspiegel mit der Hämodynamik	28
4.1.4	Mortalitätsanalyse aller PH-Patienten.....	28
4.1.4.1	Mortalitätsanalyse in Bezug auf die Höhe von MCP-1	29
4.1.5	<i>Time to clinical worsening</i> aller PH-Patienten.....	30
4.1.5.1	<i>Time to clinical worsening</i> in Bezug auf die Höhe von MCP-1	31
4.1.6	Cox-Regressionsanalyse aller PH-Patienten.....	32
4.1.6.1	Cox-Regressionsanalyse – <i>Time to clinical worsening</i>	33
4.1.7	Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse	33
4.1.8	Einzelgruppenanalyse	35
4.1.8.1	IPAH-Patientenkollektiv.....	35
4.1.8.2	CVD-Patientenkollektiv.....	36
4.1.8.3	CTEPH-Patientenkollektiv	37
4.1.8.4	PVH-Patientenkollektiv.....	37
4.2	Ergebnisse für TM.....	39
4.2.1	Charakterisierung des TM-Patientenkollektivs.....	39
4.2.2	Charakterisierung des Ausschlusskollektivs	40
4.2.3	TM-Plasmaspiegel	40
4.2.3.1	TM-Plasmaspiegel der einzelnen Entitäten	41
4.2.3.2	TM-Plasmaspiegel der NYHA-Stadien und der Geschlechter.....	42
4.2.3.3	Korrelation der TM-Plasmaspiegel mit der Hämodynamik	43
4.2.4	Mortalitätsanalyse aller PH-Patienten.....	43
4.2.4.1	Mortalitätsanalyse in Bezug auf die Höhe von TM.....	44
4.2.5	<i>Time to clinical worsening</i> aller PH-Patienten.....	45
4.2.5.1	<i>Time to clinical worsening</i> in Bezug auf die Höhe von TM.....	46
4.2.6	Cox-Regressionsanalyse aller PH-Patienten.....	47
4.2.6.1	Cox-Regressionsanalyse – <i>Time to clinical worsening</i>	48
4.2.7	Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse	50
4.2.8	Einzelgruppenanalyse	51

4.2.8.1	IPAH-Patientenkollektiv.....	51
4.2.8.2	CVD-Patientenkollektiv.....	53
4.2.8.3	CTEPH-Patientenkollektiv.....	54
4.2.8.4	PVH-Patientenkollektiv.....	55
5	Diskussion.....	56
5.1	Diskussion der MCP-1-Datenauswertung.....	56
5.2	Diskussion der TM-Datenauswertung.....	61
5.3	Ausblick.....	67
6	Zusammenfassung.....	68
7	Abstract.....	69
8	Anhang.....	70
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	70
8.2	Tabellenverzeichnis.....	71
8.3	Verwendete Geräte/ Hersteller.....	72
8.4	Verwendete Substanzen und Chemikalien.....	72
8.5	MCP-1 ELISA-Protokoll.....	72
8.6	TM ELISA-Protokoll.....	73
8.7	Kontrollwerte der TM-ELISA.....	75
8.8	Ethikvotum.....	76
8.9	Literaturverzeichnis.....	77
9	Danksagung.....	88
10	Lebenslauf.....	89

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
6-MWT	Sechs-Minuten-Gehtest (<i>six minute walking test</i>)
95%CI	95% Konfidenzintervall
Abb.	Abbildung
ALK 1	<i>Activin receptor – like kinase type 1</i>
APAH	Assoziierte pulmonal-arterielle Hypertonie
ARDS	Akut progressives Lungenversagen (<i>acute respiratory distress syndrome</i>)
Blan.	<i>Blanc</i> , Leermessung
BMPR2	<i>Bone morphogenic protein receptor type 2</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CAV1	Caveolin-1
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CHD	Kongenitale Herzerkrankung (<i>congenital heart disease</i>)
CI	Herzindex (<i>cardiac index</i>)
CO	Herzzeitvolumen (<i>cardiac output</i>)
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CTEPH	Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (<i>chronic thrombotic pulmonary hypertension</i>)
CVD	Kollagenose (<i>collagen vascular disease</i>)
CVP	Zentralvenöser Druck (<i>central venous pressure</i>)
DIC	Disseminierte intravaskuläre Gerinnung (<i>disseminated intravascular coagulation</i>)
DPG	Diastolischer Druckgradient (<i>diastolic pressure gradient</i>)
EC	Endothelzellen (<i>endothelial cells</i>)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant assay</i>
ENG	Endoglin
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase

EPC	Endotheliale Progenitorzellen (<i>endothelial progenitor cells</i>)
ERA	Endothelinrezeptorantagonisten
ERDF	<i>Endothelium derived growth factor</i>
ET – 1	Endothelin–1
FEV1	Absolute Einsekundenkapazität
FEV1%VC	Relative Einsekundenkapazität in Prozent der Vitalkapazität
GMP	Guanosinmonophosphat
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
HF	Herzfrequenz
HR – CT	<i>high resolution</i> –Computertomographie
ILD	Intestitielle Lungenerkrankung (<i>interstitial lung disease</i>)
INR	<i>International normalized ratio</i>
IPAH	Idiopathische pulmonal–arterielle Hypertonie
IP-Rezeptor	Prostazyklinrezeptor
KCNKJ	<i>Potassium channel super family k member-3</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
klin.	Klinisch
Kon.	Kontrolle
kum.	kumulativ
log.	logarithmiert
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (<i>left ventricular ejection fraction</i>)
MAP	Mittlerer systemischer Blutdruck (<i>mean arterial pressure</i>)
ml	Milliliter
mPAP	Mittlerer pulmonal–arterieller Druck (<i>mean pulmonary artery pressure</i>)
mRAP	Mittlerer rechtsatrialer Druck (<i>mean right atrial pressure</i>)
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxid</i>)
NYHA	New York Heart Association
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PAH	Pulmonal–arterielle Hypertonie
PaO ² /PaCO ²	Arterieller Sauerstoff-/Kohlenstoffdioxid–Partialdruck
PAP	Pulmonal–arterieller Druck (<i>pulmonary arterial pressure</i>)
PAPdia	Diastolischer pulmonal–arterieller Druck
PAPsys	Systolischer pulmonal–arterieller Druck
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit

PCH	Pulmonal–kapilläre Hämangiomatose (<i>pulmonary capillary hemangiomatosis</i>)
PCWP	Pulmonal kapillärer Verschlussdruck, auch Wegde-Druck (<i>pulmonary capillary wedge pressure</i>)
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pg	Pikogramm
PGI ₂	Prostazyklin
PGI-S	Prostazyklinsynthase
PH	Pulmonale Hypertonie
PPH	Primäre pulmonale Hypertonie
PPHN	Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>
Rpm	<i>Revolution per minute</i>
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie (<i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>)
PTEA	Pulmonale Thrombendarteriektomie
PVH	Pulmonal–venöse Hypertonie
PVOD	Pulmonale veno–okklusive Erkrankung (<i>pulmonary veno-occlusive disease</i>)
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand (<i>pulmonary venous resistance</i>)
RR _{sys} /RR _{dia}	Systolischer/diastolischer Blutdruck nach Riva Rocci
s.	siehe
s.c.	subcutan
SaO ₂	Systemisch–arterielle Sauerstoffsättigung
SDF-1	<i>stroma derived factor-1</i>
sek.	sekundäre
sGC	Lösliche Guanylatzyklase (<i>soluble guanylatcyclase</i>)
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SMAD9	<i>Mothers against decapentaplegic 9</i>
SMC	glatte Muskulatur (<i>smooth muscle cells</i>)
Tab.	Tabelle
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TLC	Totale Lungenkapazität (<i>total lung capacity</i>)
TPG	Transpulmonaler Druckgradient (<i>transpumonol pressure gradient</i>)
TTE	Transthorakale Echokardiographie
TTW	Zeit bis zur klinischen Verschlechterung (<i>time to clinical worsening</i>)

VC	Vitalkapazität (<i>vital capacity</i>)
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i>
vergl.	Vergleiche
VIP	<i>Vasoactive intestinal Peptide</i>
V/Q	Ventilations–Perfusions–Quotient
WU	Wood Einheit (wood units)

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

1.1.1 Definition und Klinik

Die Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine seltene, progrediente und potentiell lebensbedrohliche Erkrankung. Sie zeichnet sich durch einen, im Rechtsherzkatheter erhobenen, erhöhten mittleren pulmonal-arteriellen Druck (mPAP) von ≥ 25 mmHg in Ruhe aus. Beim Gesunden finden sich mittlere PAP Werte um 14 ± 3 mmHg, wobei die obere Grenze bei 20 mmHg liegt. Die früher verwendete Definition der PH mit einem pulmonal-arteriellen Druck von > 30 mmHg unter Belastung ist aktuell nicht mehr gebräuchlich. Auch Gesunde können unter Belastung kurzzeitig stark erhöhte pulmonal-arterielle Drücke aufweisen [1]. Mittels Messungen des pulmonal-kapillären Verschlussdruckes (PCWP), des Herzzeitvolumens (HZV) und des pulmonal-vaskulären Widerstandes (PVR) können die Unterformen der PH differenziert werden. Die Gruppen der pulmonal-arteriellen Hypertonie (Gruppe 1), der PH bei Lungenerkrankungen (Gruppe 3), die chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH – Gruppe 4) und die pulmonale Hypertonie unklarer Genese (Gruppe 5) sind gekennzeichnet durch einen mPAP von ≥ 25 mmHg und einem PCWP von < 15 mmHg, bei normalem oder reduziertem HZV. Sie werden als präkapilläre Formen der PH zusammengefasst. Allein die PH bei Linksherzerkrankungen (PVH – Gruppe 2) zeigt neben einem mPAP von ≥ 25 mmHg, auch einen PCWP von > 15 mmHg und wird dann als postkapilläre PH bezeichnet [1]. Die erhöhten Druckwerte führen zu einer, vom Schweregrad abhängigen, Rechtsherzbelastung bis hin zu Dekompensation und Tod des Erkrankten [2]. Typische Symptome bei Erstdiagnose einer PH sind unter anderem reduzierte Belastbarkeit, Dyspnoe, Synkopen, Ödeme, Aszites und Kachexie. Zudem zeigen sich eine Zyanose, Uhrglasnägel, Trommelschlegelfinger, ggf. ein Systolikum als Ausdruck einer Trikuspidalklappen-Insuffizienz oder ein Diastolikum bei Pulmonalklappen-Insuffizienz. Da diese Symptome eher unspezifisch sind, verzögert sich die Zeit von Beginn der Symptome bis zur Diagnose der PH um durchschnittlich zwei Jahre [3][4].

1.1.2 Klassifikation der pulmonalen Hypertonie

Die PH wurde von 1973 bis 1998 in primäre (PPH) und sekundäre PH eingeteilt, je nachdem ob Ursachen identifiziert bzw. Risikofaktoren gefunden wurden oder nicht. Die Diagnose PPH wurde gestellt, wenn keine bekannte Ursache festzustellen war. Im Jahre 1998 wurde in Evian, Frankreich während des zweiten Symposiums zur PH eine

neue klinische Einteilung, die Evian-Klassifikation festgelegt. Deren Zielsetzung war es ähnliche klinische Präsentation, pathophysiologische Mechanismen und Therapieoptionen sinnvoll in Untergruppen zu ordnen. Im weiteren Verlauf wurde 2003 die Evian-Klassifikation zu der modifizierten Venedig-Klassifikation. Unter anderem wurde der Begriff der primären PH durch den Begriff der idiopathischen PAH ersetzt, zudem wurde weitere Risikofaktoren und assoziierte Erkrankungen hinzugefügt [5]. Beim vierten weltweiten Symposium zur PH im Jahre 2008 wurde die Dana Point-Klassifikation beschlossen. Die pulmonale veno-okklusive Erkrankung und die pulmonal-kapilläre Hämangiomatose (PCH) wurden zu einer eigenen Subgruppe zusammengefasst [6]. 2013 wurde beim fünften Weltsymposium zur PH, als große Neuerung, die persistierende pulmonale Hypertonie beim Neugeborenen (PPHN) aus der Gruppe der PAH herausgelöst, da zu große Unterschiede zu den restlichen Entitäten der PAH bestehen. Zudem wurden die kongenitale bzw. erworbene Linksherz-Einfluss/Ausfluss-Trakt-Obstruktion sowie kongenitale Kardiomyopathien zur Gruppe 2 hinzugefügt. Des Weiteren wurde die PH in Assoziation mit chronisch hämolytischer Anämie von Gruppe 1 in Gruppe 5 verschoben [7].

Tab

Tabelle 1: überarbeitete Klassifikation der PH nach dem fünften Welt-Symposium 2013 [7]

BMPR = bone morphogenic protein receptor type II; ALK-1 = Aktivin Rezeptor-like Kinase Typ 1; ENG = Endoglin; SMAD9 = mothers against decapentaplegic 9; CAV1 = Caveolin-1; KCNK3 = Potassium channel super family k member-3; HIV = human immunodeficiency virus

1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

1.1 Idiopathische PAH

1.2 Vererbliche PAH

1.2.1 BMPR2

1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3

1.2.3 Unbekannt

1.3 Medikamenten- und toxininduzierte PAH

1.4 Assoziiert mit:

1.4.1 Kollagenosen

1.4.2 HIV Infektion

1.4.3 Portaler Hypertension

1.4.4 Kongenitalen Herzerkrankungen

1.4.5 Schistosomiasis

1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankungen (PVOD) und/oder pulmonal-kapilläre Hämangiomatose (PCH)

1''. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)

2. Pulmonale Hypertonie aufgrund von Linksherzerkrankung (Pulmonal-venöse Hypertonie – PVH)

- 2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
- 2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion
- 2.3 Klappenerkrankung
- 2.4 Kongenitale/ erworbene Linksherz-Einfluss/Ausfluss-Trakt-Obstruktion und kongenitale Kardiomyopathien

3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

- 3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)
- 3.2 Interstitielle Lungenerkrankung
- 3.3 Andere pulmonale Erkrankungen mit gemischten restriktiven und obstruktivem Muster
- 3.4 Schlafapnoe-Syndrom
- 3.5 Störung durch alveoläre Hypoventilation
- 3.6 Chronischer Aufenthalt in großer Höhe
- 3.7 Entwicklungsstörungen der Lunge

4. Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie

5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen

- 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämolytische Anämie, Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
- 5.2 Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiocytose, Lymphangioliomyomatose
- 5.3 Metabolische Erkrankungen: Glykogen-Speicher-Erkrankungen, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
- 5.4 Andere: Tumorobstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronischen Nierenversagen, segmentale PH

Gruppe I - Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

Idiopathische PH (IPAH): In dieser Subgruppe gibt es weder eine assoziierte Erkrankung, einen Risikofaktor, noch eine bekannte familiäre Belastung, die als Ursache für die PH identifiziert werden können. Wesentliche Pathologie der IPAH ist die Obstruktion der Pulmonalarteriolen [8]. Durch die unterschiedlich stark ausgeprägte Obstruktion kommt es in den Arteriolen zu Minderperfusion (bis hin zur Ischämie) und in Folge dessen zu einer erhöhten Totraum-Ventilation. Dabei kann der CO₂-Partialdruck (PaCO₂) auf fast 0 mmHg absinken. Das end-tidale CO₂ ist bei Patienten mit IPAH in Ruhe und unter Belastung ebenso stark vermindert [9].

Hereditäre PH: Wenn die PAH in einem familiären Kontext auffällt, können in 70% der Fälle eine Mutation im *bone morphogenetic protein receptor*-Typ 2-Gen (*BMPR2*) festgestellt werden. Dieser Rezeptortyp gehört zu Familie des *transforming growth factor*. Seltener findet man Mutationen im *activin receptor-like kinase* -Typ1-Gen (ALK1) oder im Endoglin-Gen (ENG), welche zur selben Signalweg-Kaskade gehören.

Eine *de-novo* Mutation, aber auch eine positive Familienanamnese in Bezug auf PAH können Ursache für eine hereditäre PH sein. Da in ca. 30% der Familien in denen PAH auftritt, keine Mutationen in den bereits identifizierten Genen zu finden sind, wurde der Begriff *familiär* in der Dana-Point-Klassifikation durch *hereditär* ersetzt [6]. Hereditäre PAH beinhaltet also die PAH aufgrund von Keimbahnmutationen (*BMPR2*, *ALK 1*, *ENG*) als auch familiär gehäufte Fälle ohne Keimbahnmutationen [10][11]. In die Gruppe I fallen auch Patienten mit PH als Komplikation einer Kollagenose (CVD) wie zum Beispiel systemische Sklerose, rheumatoide Arthritis oder systemischem Lupus erythematoses (SLE) [12]. Kollagenosen-assoziierte PH ist die zweithäufigste Form nach der IPAH, wobei die systemische Sklerose in Europa und den USA die häufigste Kollagenose darstellt [13]. Der Gruppe I gehören auch Patienten mit PH aufgrund von HIV- bzw. Schistosomen-Infektionen, durch Drogen-und/oder Appetitzügler hervorgerufenen PH, sowie die PH durch kongenitale Herzfehler, portale Hypertension und durch eine chronisch hämolytische Anämie an [7].

Gruppe II – Pulmonale Hypertonie aufgrund von Linkserkrankung (PVH)

Linksherzerkrankungen stellen eine häufige Ursache für die PH dar. Hier entwickeln circa 60-70% der Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz eine PH [14][15]. Bis heute konnte keine spezifische genetische Korrelation für die Entwicklung einer PH bei Patienten mit Linksherzerkrankungen festgestellt werden [16]. Systolische, diastolische oder valvuläre Funktionsstörungen des linken Herzens führen zu erhöhtem linksventrikulärem enddiastolischen Druck. Der Druck im pulmonal-vaskulären System steigt ebenfalls, um die Füllung des linken Ventrikels gegen den erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck zu gewährleisten. Bei einem rein passiven Rückstau in die pulmonale Gefäßbahn resultiert ein normaler transpulmonaler Druckgradient (TPG) von < 12 mmHg (postkapilläre passive Form). Wobei sich der TPG als Differenz zwischen dem mittleren pulmonal arteriellen Druck (mPAP) und dem Wedge-Druck definiert. Reaktive Veränderungen der Lungenstrombahn aufgrund des passiven Rückstromes können allerdings zu TPG-Werten von > 12 mmHg führen. Hierbei steigt der mPAP stärker an als der Wedge-Druck (postkapilläre reaktive Form) [17]. Seit 2015 wird eine weitere Größe zur Differenzierung in der Gruppe II herangezogen. Hierfür wird der diastolische Druckgradient (DPG), als Differenz zwischen diastolischem PAP und dem mPAWP, berechnet. Bei Patienten mit kardialen Erkrankungen liegt der DPG mit 5 mmHg über dem Wert des Gesunden (1-3 mmHg). Insgesamt erscheint die kombinierte Betrachtung von DGP und PVR die differenzierteste Einteilung für die Gruppe II zu bieten: die isolierte post-kapilläre PH definiert sich über einen $DPG < 7$ mmHg und/oder einen $PVR \leq 3$ wood units (WU). Die kombinierte postkapilläre und präkapilläre PH zeigt einen $DPG \geq 7$ mmHg und/oder

einen PVR > 3 WU [18]. Durch die dauerhafte Belastung des rechten Ventrikels kommt es zur rechtsventrikulären Dysfunktion. Pathohistologisch imponieren bei dieser Form der PH verdickte Pulmonalvenen, dilatierte pulmonale Kapillaren und interstitielle Ödeme [19]. Das Risiko eine PH zu entwickeln nimmt bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz in Korrelation zum klinischen Stadium (NYHA-Klasse) zu [14]. Die Prognose für Patienten mit PH aufgrund einer Linksherzerkrankung ist schlecht. Studien zeigen bei Patienten mit Linksherzerkrankungen und assoziierter PH nach 28 Monaten eine Mortalitätsrate von 57%. Patienten ohne PH hingegen weisen eine Letalitätsrate von nur 17% auf [15]. Der Grad der Ausbildung und der Schwere einer PH sind in dem Patientenkollektiv mit Linksherzerkrankungen allerdings sehr variabel. Die ätiologische Einteilung in systolisch, diastolisch oder linksseitig-valvuläre Funktionsstörungen sind für die jeweiligen therapeutischen Ansätze von Bedeutung [19].

Gruppe III – Pulmonale Hypertonie aufgrund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxämie

Bei Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) und interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) tritt, vor allem im fortgeschrittenen Stadium, häufig eine PH auf (teilweise bei über 50%). Diese Form der PH verläuft meist milder als die PAH. Sie äußert sich in nur leicht erhöhten Pulmonaldrücken (mPAP selten über 35 mmHg), unverändertem HZV und nur leicht bis moderat erhöhten pulmonalvaskulären Widerstandserhöhungen [20] [21]. Es kommt viel seltener zum systolischen Pumpversagen des rechten Ventrikels als bei der PAH. Dennoch kann es auch bei dieser Form der PH zu verminderter Oxygenierung, eingeschränkter körperlicher Belastbarkeit sowie ausgeprägten Beschwerdesymptomatik kommen [22]. Bei Patienten mit COPD und einem mPAP über 25 mmHg konnte eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu Patienten mit mPAP-Werten unter 25 mmHg nachgewiesen werden [23]. Weitzenblum et al. stellte bei COPD-Patienten mit mPAP Werten unter 20 mmHg eine 4-Jahres-Überlebensrate von 72% fest. Bei Patienten mit mPAP Werten über 20 mmHg lag die Überlebensrate bei nur 49% [24]. Diese Daten zeigen, dass auch niedrigere mPAP-Werte, als per Definition für die PAH festgelegt, für die Prognose und Diagnostik der PH bei Lungenerkrankungen maßgeblich sein können. Es gilt, bei Patienten mit Lungenerkrankungen und PH immer auch andere mögliche Ursachen für die PH auszuschließen (Herzerkrankung, Lebererkrankung, CTEPH). Es sollte geprüft werden, ob es sich nicht doch primär um eine PAH mit gleichzeitig vorliegender Lungenerkrankung handelt. Diese Unterscheidung ist für die Therapie und Prognose der Patienten relevant [22].

Gruppe IV – Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)

Im Allgemeinen werden rezidivierende oder auch einzelne Lungenembolien als auslösende Faktoren für die CTEPH angenommen [25]. Wobei nur in circa 70% der Betroffenen typische Symptome einer Lungenembolie vorgefunden werden [26]. Insgesamt scheint das Thromboseereignis allerdings nur der initiale Auslöser zu sein, zu dem weitere Faktoren, wie zum Beispiel Klein-Gefäß-Erkrankungen, für das Voranschreiten der PH hinzukommen. Nach lokaler Reizung und Stimulation durch das thrombembolische Material, kann es zur fehlerhaften Reorganisation dieses Materials kommen. Ursachen für diese unvollständige Auflösung des Thrombusmaterials sind allerdings noch unklar. Ein normales, pulmonales Gefäßsystem hat starke fibrinolytische Eigenschaften. Bei Patienten mit CTEPH konnten jedoch bis heute keine, diesen Pathomechanismus erklärende, Störungen im Gerinnungssystem identifiziert werden [25]. Es wird trotzdem angenommen, dass eine pathologische Blutgerinnung bzw. gestörte Fibrinolyse-Prozesse und hinzukommende immunologische, entzündliche und infektiöse Vorgänge, Auslöser für ein vaskuläres Remodeling und damit für die CTEPH sind [27].

Gruppe V – Pulmonale Hypertonie mit unklarer, multifaktorieller Genese

Die WHO-Gruppe V umfasst eine relativ inhomogene Anzahl von Ursachen für PH. Neben hämatologischen Erkrankungen, wie der Polycythämia vera und chronisch myeloischer Leukämie, kann auch der Zustand nach Splenektomie unter Umständen zu einer PH führen [28][29]. Auch bei systemischen Erkrankungen wie der Sarkoidose kann die PH mit einer Prävalenz von 1% – 28% nebenbefundlich diagnostiziert werden [30]. Sehr selten assoziiert mit der PH sind Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose vom Typ Recklinghausen und der Morbus Gaucher [6].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen der Biomarker für die Gruppen IPAH, CTEPH, PVH und PH aufgrund von CVD sowie einer Ausschluss-Gruppe berücksichtigt

1.1.3 Physiologie und Pathogenese

Insgesamt ist die Pathogenese der PH ein multifaktorielles Geschehen, welches sich vor allem in einem erhöhten pulmonal–vaskulären Widerstand niederschlägt. Zu den wichtigsten Faktoren gehören die veränderten Mechanismen für Vasodilatation und Vasokonstriktion, die Umbauprozesse der Pulmonalgefäße, sowie Inflammation und Thromboseneigung [31][32]. Abbildung 1 fasst die histologischen Veränderungen bei PH zusammen.

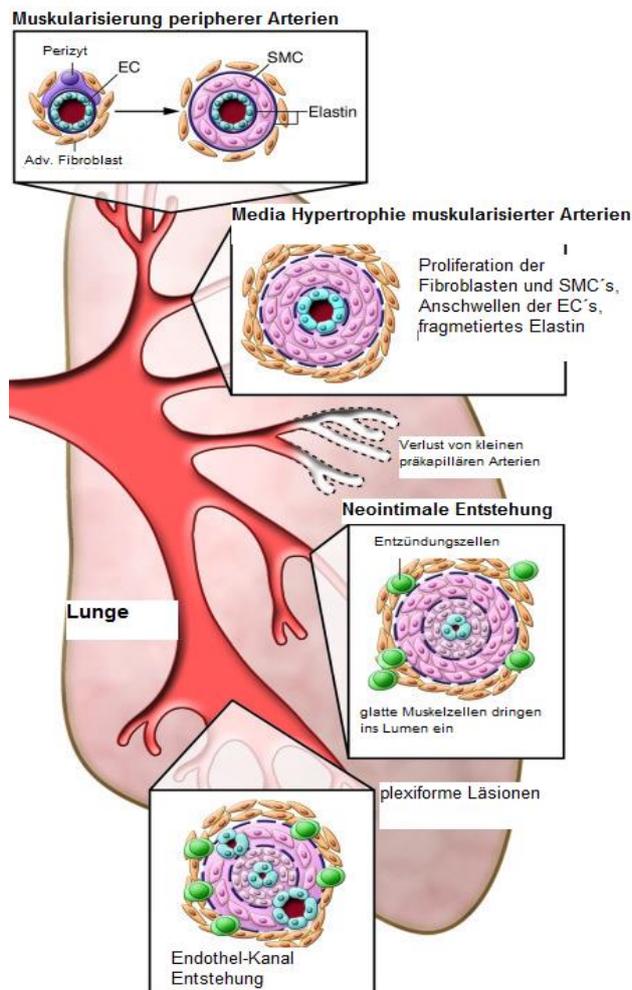


Abbildung 1: Gefäßveränderungen bei PAH

Muskularisierung distaler und medialer präkapillärer Arterien, Verlust präkapillärer Arterien, Verdickung der großen Pulmonalarterien, *Neointima*-Entstehung, die zur Okklusion von Gefäßen mit plexiformen Läsionen führt. SMC: smooth muscle cells, EC: endothelial cells, Endothelzellen, (verändert nach [33]).

1.1.3.1 Vasodilatation und Vasokonstriktion

Zu den wichtigsten physiologischen Vasodilatoren der menschlichen Lunge gehört Stickstoffmonoxid (NO). NO bewirkt in glatten Gefäßmuskelzellen die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase. Dieses Molekül induziert die Bildung des Botenstoffes *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). cGMP fungiert dann als ein *second messenger* und bewirkt über eine Aktivierung von Kalium-Kanälen und eine Inhibition von Kalzium-Kanälen eine Verringerung der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Der Aufnahme von Kalzium in das Sarkoplasmatische Retikulum folgt ein verminderter Tonus der glatten Muskelzelle und somit eine Vasodilatation. Die Wirkung von NO wird durch Phosphodiesterasen begrenzt, welche den Abbau des Botenstoffes cGMP katalysieren [34]. Patienten mit PH weisen überdurchschnittlich häufig eine verminderte NO-Synthese auf, was eine pathophysiologische Besonderheit

darstellt [35]. Weitere wichtige Vasodilatoren sind Prostacyclin und vasoaktives intestinales Peptid (VIP) [36][37]. VIP agiert nicht nur pulmonal sondern auch systemisch vasodilatatorisch. Analog zur verminderten NO-Synthese ist auch die Prostacyclin-Synthase in Endothelzellen vermindert exprimiert und die VIP-Serumkonzentration bei PH Erkrankten niedrig [38]. In Pulmonalgefäßen von IPAH-Patienten zeigen sich zudem erhöhte Rezeptordichten und vermehrte Bindungsaktivitäten der VIP-Rezeptoren. Dies lässt einen VIP-Mangel, mit folgender erhöhter Sensitivität, noch wahrscheinlicher erscheinen [37]. Zu den Vasokonstriktoren gehört Endothelin (ET-1), ein vom Endothel gebildetes Peptid, welches den stärksten vasokonstriktorischen Einfluss auf die glatte Muskulatur der pulmonalen Gefäße zu haben scheint. ET-1 ist zudem ein Mitogen und kann die Proliferation von glatten Muskelzellen induzieren [39]. Bei Patienten mit IPAH konnten erhöhte Serumspiegel von ET-1 im Gegensatz zu gesunden Probanden festgestellt werden. Die erhöhten ET-1 Konzentrationen könnten ein weiterer Faktor in der Entstehung von PH darstellen [40]. Indirekt zu den Vasokonstriktoren gehören auch die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle in den pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen. Diese Kalium-Kanäle werden durch Hypoxie inhibiert, was zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials und damit zur Öffnung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen führt. Das intrazelluläre Calcium steigt, Muskelaktivierung und Vasokonstriktion sind die Folge. Dass diese spannungsabhängigen Kalium-Kanäle bei Patienten mit PAH herunterreguliert sind, konnte nicht nur im Rattenmodell sondern auch in menschlichen glatten Muskelzellen der Lunge nachgewiesen werden [41][42].

1.1.3.2 Proliferation und Wachstumsfaktoren

Es zeigt sich, dass in fortgeschrittenen Stadien der PH, Zellen der Gefäßwand (glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, etc.), Blutbestandteile sowie Entzündungsmediatoren sich geflechtartig in den PA ansammeln [43][44]. Dass gestörtes Endothelzellenwachstum eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PH spielt, konnte bei IPAH-Patienten nachgewiesen werden. Deren pulmonal-arterielle Endothelzellen waren nicht nur quantitativ erhöht, sondern zeigten auch stärkere Proliferation und Migration [45]. Zudem sind Endothelzellen in der Lage das Gerinnungssystem zu aktivieren und die Exprimierung von Wachstumsfaktoren bzw. vasoproliferativen Substanzen zu veranlassen. Neben den Endothelzellen spielen auch glatte Muskelzellen und Fibroblasten eine Rolle in der Entstehung der PH [46]. Allen Formen des PH-Remodeling ist gemein, dass es zu einer Auswanderung von glatten Muskelzellen in distal gelegene Pulmonalarterien kommt, die normalerweise nicht muskularisiert sind. Bei schwerer PAH findet man eine dünne Schicht von

Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix zwischen Endothel und der *Lamina elastica interna*, die sogenannte *Neointima* [47]. Aufgrund dieser Zusammenhänge hält man sowohl die veränderte endotheliale Proliferation, als auch Proliferation der glatten Muskelzellen für ein äußerst wichtiges Merkmal in der PAH [47]. Mikrovaskuläre Endothelzellverbände der Lunge beinhalten unter anderem endotheliale Progenitorzellen (EPC). Diese besitzen ein starkes Wachstums-, -und angiogenetisches Potential [48]. In den Gefäßwänden verbleibenden EPC sind wahrscheinlich an der Pathogenese verschiedener vaskulärer Erkrankungen beteiligt [49] [47].

1.1.3.3 Inflammation

Auch Entzündungszellen und ihre Mediatoren spielen eine wichtige Rolle im Pathogeneseprozess einiger Unterformen der PH. Einen Zusammenhang mit Autoimmunprozessen konnte man vor allem in den Untergruppen der HIV- bzw. SLE-assoziierten PH feststellen. Bei PH-Patienten mit SLE verbesserte sich der Zustand des Lungenhochdrucks nach immunsuppressiver Therapie erheblich [50]. Bei Patienten mit IPAH konnten erhöhte Level von Zytokinen und ihren Rezeptoren, wie zum Beispiel Fraktalkalin, *stromal derived factor-1* (SDF-1), Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1) und *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* (GM-CSF), nachgewiesen werden [33]. In histologischen Präparaten von Patienten mit PAH konnten zudem erhöhte Antinukleäre-Antikörper und eine vermehrte Anzahl von Makrophagen und Lymphozyten dargestellt werden [51].

1.1.3.4 Gerinnung

Ebenfalls von enormer Bedeutung bei der Entstehung von PH scheinen ein gestörter bzw. veränderter Gerinnungsprozess und die daraus resultierende erhöhte Thromboseneigung zu sein. Prinzipiell kann die Ursache für eine Thrombose im pulmonalen System auf jedem Level der Gerinnungskaskade, in den Endothelzellen aber auch in den Thrombozyten zu finden sein [52]. Verstärkte intravaskuläre Koagulation ist ein kontinuierlicher Prozess bei Patienten mit PAH, was sich unter anderem in erhöhten Fibrinopeptid A- und D-Dimer Plasmawerten widerspiegelt. Eine Dysfunktion in der Gerinnungskaskade kann auch über eine gesteigerte Produktion des von-Willebrand-Faktors und Plasminogen-Activator-Inhibitor-Typ-1 bei PAH-Patienten aufgezeigt werden. Wahrscheinlich führt eine vermehrte Interaktion zwischen Thrombozyten und den pulmonalarteriellen Gefäßwänden zu strukturellen und funktionellen Veränderungen [47]. Neben der Gerinnung beeinflussen Thrombozyten auch die Freisetzung von Mediatoren, die zu Vasokonstriktion und Remodeling führen. Dazu gehören u.a. Thromboxan-A₂, *platelet activating factor* (PAF), Serotonin, *platelet-derived growth factor* (PDGF), sowie transforming growth factor (TGF) und *vascular*

endothelial growth factor (VEGF). Unklar ist allerdings noch, ob die Thrombosen bzw. die Gerinnungsstörung Ursache oder Konsequenz der PH sind [52]. Die potentiellen Risikofaktoren für die Entwicklung einer PH werden in Abbildung 2 dargestellt.

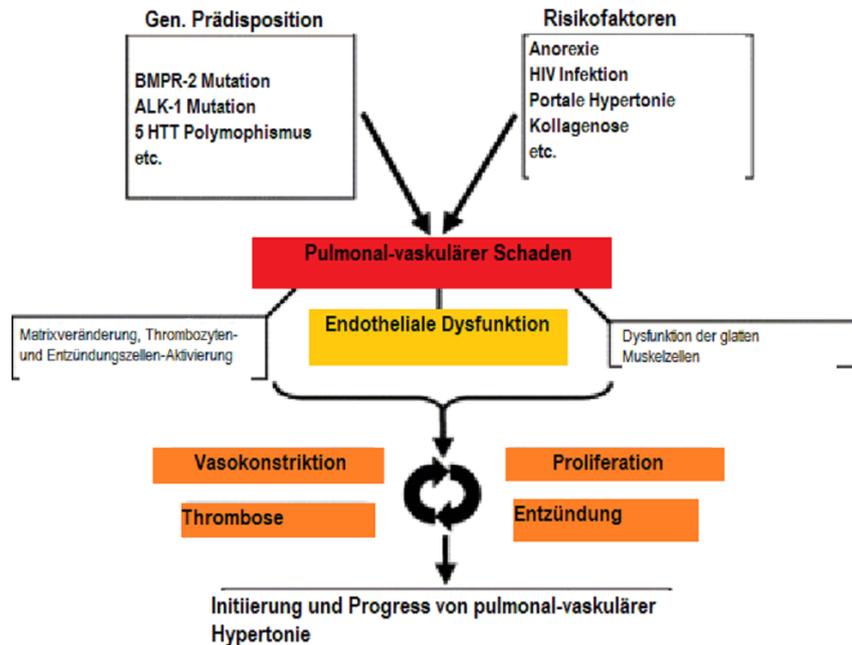


Abbildung 2: Pathogenese bei PAH

potentielle pathogenetische und pathobiologische Mechanismen. BMPR-2: bone morphogenetic receptor protein-2 Gen; ALK-1: activin-receptor-like kinase-1 Gen; 5-HTT: Serotonin Transporter Gen. Verändert nach [53].

1.1.4 Diagnostik der pulmonalen Hypertonie

Die diagnostische Kaskade zur Detektion einer PH sollte vor allem bei ungeklärter Belastungsdyspnoe oder bei zufällig diagnostizierter Rechtsherzbelastung in Gang kommen [54]. Zu den Zeichen der Rechtsherzbelastung im EKG gehören ein (überdrehter) Rechtsherzlagetyp, ein inkompletter oder kompletter Rechtsschenkelblock, sowie ST-Streckenveränderungen in II, III und aVF [54]. Als wichtigste, nicht-invasive Untersuchung zum Screening der PH dient die transthorakale Echokardiographie. Korrelationen zwischen erhöhtem systolischem PAP in der Echokardiographie und einer im Rechtsherzkatheter diagnostizierten PH konnten bereits 1997 nachgewiesen werden [55]. Allerdings ist die Rate an falsch-positiven Befunden in der Echokardiographie deutlich erhöht, da der systolische PAP hier nur geschätzt und nicht wie im Rechtsherzkatheter direkt gemessen werden kann [56]. Die Echokardiographie kann ebenfalls als Prognose- und Verlaufsparemeter herangezogen werden. Als weitere wichtige diagnostische Mittel zur Beurteilung der kardiopulmonalen Belastungsfähigkeit werden der Sechs-Minuten-Gehtest (6-MWT) und die Spiroergometrie genutzt. Im 6-MWT läuft der Patient innerhalb von sechs Minuten

soweit er kann. Zurückgelegte Strecken von über 500 Metern sind normal, pathologisch und mit schlechteren Prognosen verbunden sind Distanzen unter 300 Metern. Schlechte Ergebnisse im 6-MWT gehen mit schlechteren Funktionsklassen und Überlebensraten der Patienten einher [57]. In der Spiroergometrie zeigt sich typischerweise eine Ventilations-Perfusionsverteilungsstörung. Während die Ventilation weitestgehend normal ist, werden große Teile der Lunge bei erhöhtem Widerstand in den Gefäßen nicht ausreichend perfundiert [9]. Die bei Dyspnoe durchgeführte Lungenfunktionsuntersuchung zeigt bei PH-Patienten oft eine normalen Befund oder nur leichte obstruktive Ventilationsstörungen [54]. Zur definitiven Diagnosestellung einer PH ist die invasive Rechtsherzkatheter-Untersuchung unabdingbar. Bei dieser Untersuchung wird ein Swan-Ganz-Katheter bei aufgeblasenem Ballon an der Katheterspitze mit dem Blutstrom über die Vena Cava, den rechten Vorhof und die rechte Kammer bis in eine der Lungenarterien eingeschwenkt. Mittels des Rechtsherzkatheters können der linkskardiale Rückstau (indirekte Messung über den PCWP), mPAP und das Herzzeitvolumen bestimmt und daraus der pulmonale Gefäßwiderstand errechnet werden. Das Herzzeitvolumen wird nach der Fick'schen Methode sowie über die Thermodilutions-Methode errechnet. Als Serummarker werden die Plasmaspiegel des *brain natriuretic peptid* (BNP) und seines Vorläuferpeptids NT-proBNP herangezogen. Beide Marker zeigen Korrelation mit dem Schweregrad der Rechtsherz-Dilatation und der PH. Das BNP dient der Einschätzung der rechtsventrikulären Funktion sowie der Prognose des Patienten [58].

Ein Laborscreening auf zirkulierende Antikörper ist zur weiteren Diagnostik essentiell. Bei den familiären und den idiopathischen Formen der PH finden sich überproportional häufig niedrig-titrige antinukleäre Antikörper (ANA). Erhöhte Plasmaspiegel von SSA-, SCL-70-Zentromer- und von DNA-Antikörpern deuten auf eine Kollagenose hin, Cardiolipin-Antikörper zeigen eine mögliche chronisch thrombembolische pulmonalarterielle Hypertonie (CTEPH) an [54].

1.1.5 Therapie der pulmonalen Hypertonie

Grundsätzlich sollte je nach Genese der PH eine optimale Therapie der Grunderkrankung erfolgen (z.B. bei HIV-Infektionen oder Kollagenosen). Allein diese Maßnahme kann sich positiv auf das Ausmaß der PH auswirken. Auch regelmäßige Impfungen gegen Pneumokokken und Influenza sowie eine frühzeitige antibiotische Therapie sollten durchgeführt werden. Bei Patienten mit Rechtsherzbelastung wird fast immer eine Diuretika-Therapie angewendet, da sie die Volumenbelastung auf das rechte Herz und deren Symptome (gestaute Halsvenen, Aszites, Pleuraergüsse) mindert [59]. Ebenso empfiehlt sich eine Antikoagulations-Therapie für die IPAH- und

CTEPH-Entität (INR zwischen 1,5-2,0). Für diese Unterform lässt sich durch Antikoagulation ein signifikant besseres Überleben darstellen. Für alle weitere Formen ist der Vorteil der oralen Antikoagulation nicht belegt [60]. Bei Hypoxie sollte eine Langzeit- O₂-Therapie erfolgen, die die arterielle Sauerstoffsättigung über 90% hält [61]. Als heilbar gilt bis heute nur die CTEPH. Mittels einer pulmonalen Thrombendarteriektomie (PEA) wird der Patient kuriert [62]. Für die CTEPH und die PAH stehen Medikamente zur Verfügung, die die Progredienz der Erkrankung verlangsamen und das Überleben der Patienten verlängern können. Die meisten der aktuellen Therapieansätze zielen darauf ab, die Balance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation wiederherzustellen. Zusätzlich gibt es Substanzgruppen, die antiproliferative Wirkung auf die glatten Muskelzellen der Lungengefäße und ihr Endothels ausüben [63]. Zu den Substanzgruppen zählen Prostanoiden, Endothelinrezeptorantagonisten (ERA), Phosphodiesterase-Typ-5(PDE-5)-Inhibitoren und die Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase [“soluble guanylate cyclase“ (sGC)] [64]. Diese wirken über drei verschiedene Signalwege, welche zur Vasodilatation führen. Eine Zusammenfassung der Signalwege ist in Abbildung 3 dargestellt.

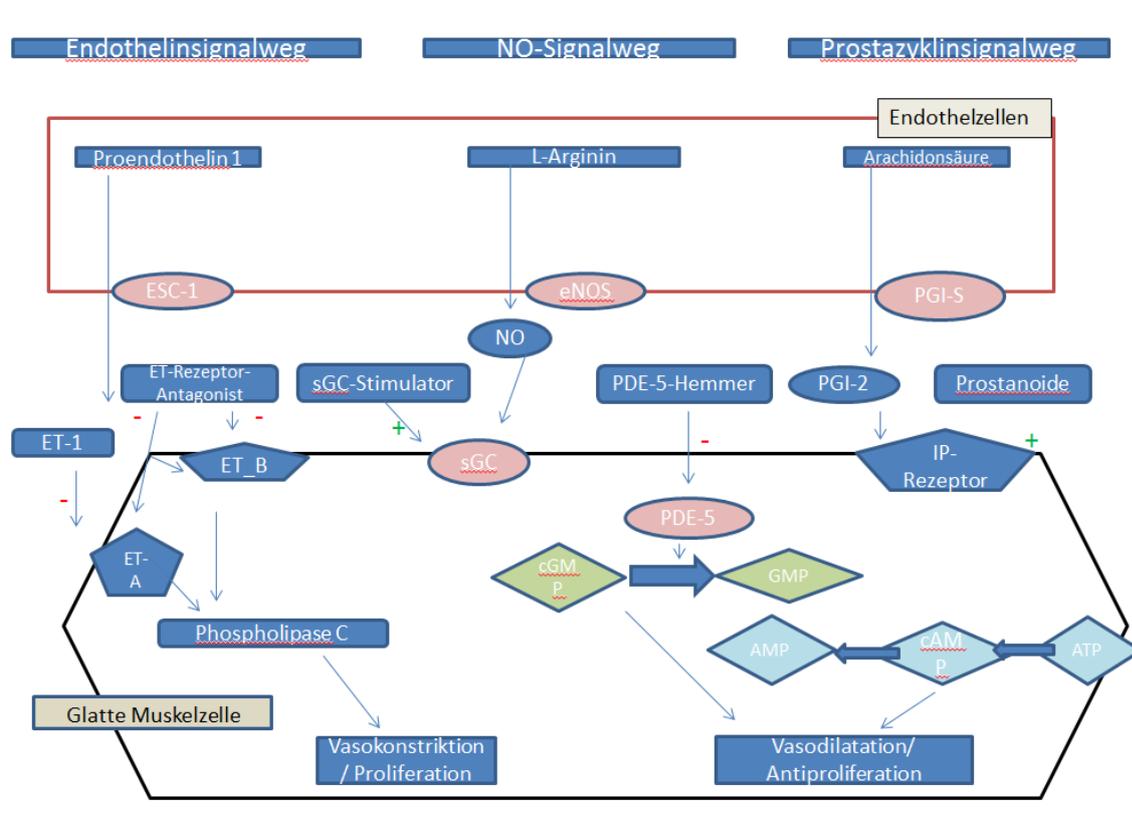


Abbildung 3: Signalwege bei der pulmonalarteriellen Hypertonie und Therapieoptionen

AMP Adenosinmonophosphat; cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat; ATP Adenosintri-phosphat; cGMP zyklisches Guanosi-nmonophosphat; ECE-1 Endothelin-konvertierendes Enzym („endothelin-converting enzyme 1“); eNOS endotheliale Stick-stoffmonoxidsynthase; ET Endothelin; ET-1 Endothelin-1; ET-A Endothelinrezeptor A; ET-B Endothelinrezeptor B; GMP Guano-sinmonophosphat; IP-Rezeptor Prostazyklinrezeptor; NO Stickstoffmonoxid; PDE-5 Phosphodiesterase Typ 5; PGI2 Prostaglandin I2

(Prostazyklin); *PGI-S* Prostaglandinsynthase; *sGC* lösliche Guanylatcyclase („soluble guanylate cyclase“). modifiziert nach Richter [64].

Prostanoide (Prostaglandine/ Prostazykline): Bei Patienten mit PH ist die Wirkung der Prostazyklinsynthese und ihrer Metaboliten im Gefäßendothel herabgesetzt [38]. Prostazykline wirken stark vasodilatatorisch und zeigen zudem antiproliferative, immunmodulierende und antithrombotische Eigenschaften. Die s.c. und i.v. zugelassene Therapie mit Prostanoiden ist allerdings nur sehr kurz wirksam [64][65][66].

Endothelin-Rezeptor-Antagonisten: Endothelin vermittelt über seine beiden Rezeptoren (Endothelin-Rezeptor A und B) Vasokonstriktion in den glatten Muskelzellen der kleinen Pulmonalgefäße [67]. Durch Endothelin-Rezeptor-Antagonisten konnte eine signifikante Verbesserung der Symptome, der Hämodynamik und körperlicher Fitness von Patienten mit IPAH und HIV-assoziiertes PH erreicht werden [68]. Eingesetzt wird es bei Patienten ab einer WHO-Klasse von II und III.

PDE-5-Hemmer: Seine relaxierende Wirkung bewirkt NO über die Aktivierung der sGC und der daraus folgenden Umwandlung des ATP-Analogs GTP in cGMP. cGMP führt im weiteren Verlauf zum Calcium-Ausstrom aus der glatten Muskelzelle, somit zu einer verminderten Aktin-Myosin-Interaktion und insgesamt zu einer Vasodilatation. Phosphodiesterase-5 baut cGMP ab und vermindert so die Vasodilatation [69]. Bei Patienten mit PH ist dieser Signalweg gestört. Phosphodiesterase-5-Hemmer erhöhen die Konzentration von cGMP in der glatten Muskelzelle und führen damit in der weiteren Kaskade zu einer Vasodilatation der Gefäße. Außerdem verlangsamen sie den Abbau des cGMPs und zeigen antiproliferative Effekte [67][70].

Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase (sGC): Relativ neu in der Therapie der PAH ist als Stimulator der sGC *Riociguat* [64]. Es hat einen direkt vasodilatatorischen Effekt an den Pulmonalgefäßen und zeigte in klinischen Studien einen positiven Effekt auf die körperliche Belastungsfähigkeit bei PH-Patienten [71].

Bei Patienten mit PH aufgrund von Linksherzerkrankungen und chronischen Lungenerkrankungen (Gruppe II und III) ist die vasodilatative Therapie nicht zugelassen [72].

Die finale Option für Patienten mit therapieresistenter PH besteht in einer Herz-Lungentransplantation [73].

1.2 Medizinische Biomarker

1.2.1 Definition und Entwicklung

Die *biomarkers definition working group* beschreibt Biomarker als eine messbare Charakteristik, die als Indikator für physiologische, pathologische oder für pharmakologisch veränderte Prozesse herangezogen werden und diese objektiv widerspiegeln kann. Biomarker müssen quantitativ reproduzierbare Ergebnisse liefern und zuverlässig Grenzen zwischen „krank“ und „gesund“ definieren [74]. Die Entwicklung eines Biomarkers beginnt mit präklinischen Studien, in denen gesunde und erkrankte Gewebe z.B. immunhistochemisch oder via Western-Blots analysiert werden (Phase I). In diesem Schritt sollen mögliche Zielstrukturen ausfindig gemacht. Dabei ist zu beachten, dass das zu untersuchende Gewebe im Diagnosestadium, also vor Therapiebeginn, analysiert wird. Durch eine Therapie können womöglich wichtige Zielstrukturen in Intensität und Ausmaß verändert werden [75]. Wenn unterschiedliche hohe Expressionen von bestimmten Genen oder Proteinen festgestellt werden, gilt es diese in klinischen Studien bzw. im Objekt zu verifizieren. In diese Phase II der Biomarker-Entwicklung sollte Messung in einer Fall-Kontroll-Studie durchgeführt werden [76]. Grundvoraussetzung dafür ist, dass das in Verdacht stehende Gen bzw. Protein messbar ist. Es muss dafür also eine Messmethode oder ein Protokoll geben, dem bei jeder Messung in gleicher Weise gefolgt werden kann. Der ideale Biomarker sollte mit hoher Spezifität und Sensitivität (am besten jeweils 100%) zwischen „krank“ und „gesund“ unterscheiden können. Ebenso wichtig sind die falsch-positiven bzw. falsch-negativen Ergebnisse. Um einen neuen Marker zu verifizieren muss es auch einen schon bestehenden Test bzw. Goldstandard geben, mit dem die Richtigkeit der Diagnose durch den neuen Biomarker überprüft werden kann [77]. In der dritten Phase sollte eine retrospektive, longitudinale Analyse stattfinden. Es werden Proben von erkrankten Patienten auf Höhe des Markers untersucht, die abgenommen wurden bevor die Diagnose gestellt wurde. Diese können dann mit einem Kontrollkollektiv verglichen werden und lassen so Aussagen über den frühen diagnostischen Wert eines Markers zu [76]. In der Phase IV werden prospektive Screening-Studien durchgeführt. In dieser Phase wird der Marker bereits in einem relevanten Kollektiv als Screening eingesetzt und sollte z.B. das Stadium der Erkrankung bzw. im Falle der PH zwischen den Untergruppen der PH differenzieren können. Auch Alter, Geschlecht und ethnische Herkunft werden in dieser Phase stärker berücksichtigt. In der fünften und letzten Phase wird geschaut, ob sich durch das Screening die Belastung durch die Erkrankung signifikant reduziert lässt. Im besten Fall, wird dann nach früher Detektion und frühem Therapiebeginn eine verbesserte Prognose bzw. Mortalitätsrate der Erkrankung durch

das Screening erzielt (primäres Ziel). [76]. Denn auch wenn ein Biomarker maligne Erkrankungen oder Krebs frühzeitig detektieren kann, gibt es unterschiedliche Gründe dafür, dass sich ein Marker für den klinischen Alltag nicht nutzen lässt. Dazu gehören fehlende Therapiemöglichkeiten für die Erkrankung, schlechte Compliance für das Screening sowie hohe *Screening-* und *Follow-up*-Kosten bei hoher falsch-positiv Rate [78].

1.2.2 Bereits genutzte Biomarker bei pulmonaler Hypertonie

Die sichere Diagnose einer PH erbringt weiterhin nur die invasive Rechtsherzkatheteruntersuchung, die als Screening-Verfahren nicht zur Wahl steht [79]. Erste relevante Biomarker für PH waren die natriuretischen Peptide, bei denen signifikante Unterschiede im Plasmaspiegel zwischen PH-Patienten und einem gesunden Kontrollkollektiv gefunden wurde [80]. Die aktuellen Guidelines empfehlen BNP bzw. das N-terminale Fragment des pro-BNP's (NT-pro BNP) als Marker für Mortalität sowie zur Risikoprognostizierung [31]. BNP ist ein Polypeptid, welches bei Dehnung der Kardiomyozyten aus den Ventrikeln freigesetzt wird und vasodilatatorisch wirkt. Nagaya et al. wiesen 2000 zum ersten Mal signifikant erhöhte Plasmalevel des BNP's bei Patienten mit PH nach. Dabei zeigte sich, dass erhöhte Plasma-BNP-Werte mit einer schlechteren Prognose einhergehen [58]. Zusätzlich kann BNP als Marker für einen Therapieerfolg nach PEA genutzt werden [81]. Auch das Nebenprodukt der BNP-Synthese NT-proBNP konnte durch Mauritz et al. als wichtiger prognostischer Marker identifiziert werden. Erhöhte NT-proBNP Werte gehen mit schlechterer funktioneller Klasse und erhöhter Mortalität einher [82]. Das NT-proBNP erweist sich zudem als Marker für einen Therapieerfolg mit inhalativem *Treprostinil* [83]. Auch Troponin-T, ein Proteinkomplex, der primär zur Diagnostik des Herzinfarkts eingesetzt wird, konnte bei Patienten mit PAH als Mortalitätsmarker identifiziert werden [84]. Als Routinelaborparameter erweist sich ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) als negativer Prädiktor für den Progress in verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, so auch bei PAH und CTEPH. Eine Erhöhung dieses Laborparameters ist im Wesentlichen Ausdruck von Entzündungen u.a. im pulmonalen Gefäßsystem. Ursächlich können ein verminderter rechtsventrikulärer Auswurf und Ischämie-getriggerte Reaktionen sein [85]. Vor allem in der CTEPH spielen mikrovaskuläre Thrombosen und vaskuläres Remodeling eine herausragende Rolle [52]. Gerinnungsparameter wie der vWF konnten allerdings auch in den anderen Formen der PH als überdurchschnittlich erhöht festgestellt werden und dienen so als Verlaufsmarker [86]. *Growth differentiation factor-15* (GDF-15), welcher in Endothelzellen Proliferation und Apoptose beeinflusst, scheint einen

vielversprechenden prognostischen Wert zu haben. Die Höhe des Plasmalevels von GDF-15 korrelierte bei IPAH-Patienten positiv mit Wedge-Druck, dem rechtsatrialen Druck und NT-pro-BNP-Werten [87]. Zudem konnte gezeigt werden, dass GDF-15 nur bei Patienten mit systemischer Sklerose und PH erhöht ist. Patienten mit systemischer Sklerose ohne PH wiesen keine erhöhten GDF-15-Plasmaspiegel auf. GDF-15 zeigte sich zudem als Marker für verkürztes Überleben. Dementsprechend wird für GDF-15 von einer starken prognostischen Aussagekraft ausgegangen [88]. Auch die Serumlevel von Zytokinen wie IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, sowie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) waren im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv in einer PAH-Patientengruppe erhöht. In verschiedenen Studien zeigten sich allerdings unterschiedliche Aussagen über die Prognose bei erhöhten IL-Werten. Während Soon et al. ein längeres Überleben bei Patienten mit erhöhten Plasmaspiegeln von IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12p70 beobachteten, wiesen Selimovic et al. auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen hohen IL-6 Spiegel und einer erhöhten Mortalität bei Patienten mit PAH hin [89][90]. Trotz der großen Bandbreite an bereits getesteten Biomarkern, gibt es bis heute wenige im klinischen Alltag gebräuchliche Marker, mit denen zuverlässige Aussagen über die Diagnose bzw. die Prognose der PH gemacht werden können. Da viele Studien retrospektiv, mit kleinen Patientenzahlen oder heterogenen Patientenkollektiven veranlasst wurden, ist die Datenlage zu Biomarkern bei PH kritisch zu betrachten [79].

1.2.3 Monozyten-chemotaktisches Protein-1

Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (MCP-1) gehört zu der C-C-Chemokinfamilie. Es ist ein sehr potenter chemischer Lockstoff für Monozyten und Lymphozyten. Die Ausschüttung von MCP-1 sorgt für die Aktivierung und Abwanderung von Monozyten als auch Lymphozyten in entzündetes Gewebe. MCP-1 wird von verschiedenen Zellen, unter anderem Monozyten selbst, Endothelzellen und glatten Muskelzellen ausgeschüttet [91][92]. Außerdem spielt MCP-1 eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von glatten Muskelzellen, sowie der Migration von Endothelzellen [93][94][95]. Den Stimulus zur Monozyten-Infiltration scheint MCP-1 vor allem in verletzten Gefäßen auszusenden. Genau dort kann MCP-1 auch zur Wachstumsanregung der glatten Muskelzellen führen. Gezeigt wurde dies in Modellen für kardiale Vaskulopathien, pulmonale Hypertonie und systemische Hypertonie [96]. Nach akuter Gefäßverletzung kommt es innerhalb von circa vier Stunden zur mRNA-Hochregulation, was einen erhöhten MCP-1-Spiegel in den Gefäßwänden, als auch in der Blutzirkulation, nach sich zieht. Die MCP-1-Expression in glatten Muskelzellen kann auch durch *platelet derived growth factor* (PDGF) und Thrombin gesteigert

werden [97][98]. Wobei PDGF selbst die Neubildung der Gefäßintima beeinflusst und beide Substanzen kurz nach arterieller Gefäßverletzung ausgeschüttet werden [99]. Die Hochregulation von MCP-1 ist allerdings nur kurzzeitig – nach drei bis vier Tagen werden wieder normwertige Plasmaspiegel des Chemokins gemessen [100]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass sich mit hochdosiertem MCP-1-neutralisierendem Antikörper die Intima-Neubildung im Rattenmodell signifikant reduzieren ließ. Der Effekt der MCP-1-Inhibition stellt sich durch eine reduzierte Anzahl an glatten Muskelzellen in der Neointima dar. Die Infiltration durch Leukozyten verändert sich durch die Inhibition von MCP-1 allerdings nicht. Dementsprechend scheint MCP-1 vor allem eine Anreicherung der glatten Muskelzellen in der Neointima zu initiieren. Entzündungsreaktionen werden durch MCP-1 zwar vorangetrieben, bei dessen Ausfall allerdings von anderen Chemokinen übernommen [101][102]. Im Rattenmodell wurde belegt, dass eine durch Monocrotalin-induzierte PH erhöhte MCP-1-Spiegel zur Folge hat [103]. Die Hemmung des MCP-1-Übertragungssignals wiederum verbessert den Krankheitsverlauf bei Ratten mit PH [103][104]. Mehrere Studien zeigen, dass MCP-1 bei der Pathogenese von Gefäßkrankheiten, wie zum Beispiel bei der Atherosklerose, mitverantwortlich sein könnte [105][106][107][108]. Cipollone et al. konnten darstellen, dass Patienten mit Re-Stenose nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) signifikant höhere MCP-1-Plasmaspiegel aufweisen, als jene Patienten die keine Re-Stenose erleiden [109]. Insgesamt spielt MCP-1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von vaskulärem Remodeling und könnte dementsprechend auch prognostische bzw. diagnostische Qualitäten bei der PH haben.

1.2.4 Thrombomodulin (TM)

TM ist ein transmembranes Glykoprotein, welches von Endothelzellen produziert und exprimiert wird [110][111]. Zirkulierendes Thrombin (Faktor IIa) bindet auf Endothelzellen mit hoher Affinität an dieses Oberflächenprotein [110][112]. Physiologischerweise spaltet Thrombin Fibrinogen zu Fibrin und Fibrinopeptiden und aktiviert außerdem die Gerinnungsfaktoren V, VII, VIII, XIII. Gebunden an TM kann Thrombin weder Fibrinogen spalten, noch Plättchen aktivieren. Im weiteren Verlauf der Kaskade ist dieser Thrombin-TM-Komplex zusätzlich ein sehr potenter Aktivator des Protein C [113][114]. Abbildung 4 stellt diese Zusammenhänge schematisch dar. Das aktivierte Protein C (APC) fungiert als körpereigenes Antikoagulan, indem es die Schlüsselfaktoren Va und VIIIa inaktiviert [115]. So werden durch die Aktivierung von Protein C mittels TM sowohl die extrinsische als auch die intrinsische Gerinnungskaskade abgeschwächt [110]. Abbildung 5 stellt eine Übersicht über die nachgeschaltete Gerinnungskaskade und den antithrombotischen Weg dar.

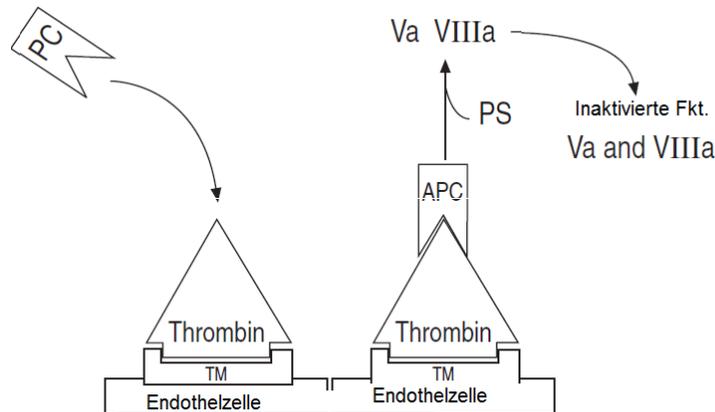


Abbildung 4: Thrombomodulin im Protein-C-System

APC: aktiviertes Protein C; TM: Thrombomodulin; PS: Protein S; PC: Protein C. Verändert nach [115]

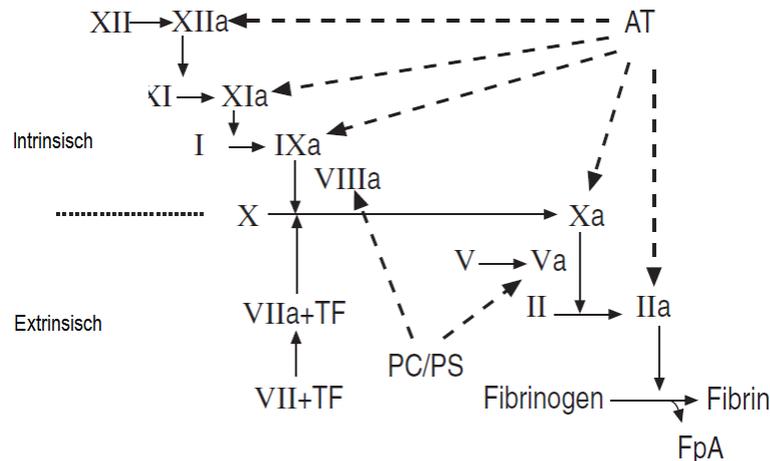


Abbildung 5: Gerinnungskaskade und der antithrombotische Weg (gestrichelte Pfeile)

II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII: Gerinnungsfaktoren; a: aktiviert; AT: Antithrombin; FpA: Fibrinopeptide A; PC: Protein C; PS: Protein S; TF: tissue factor, Gewebefaktor. Verändert nach [115]

TM hat zusätzlich einen direkten antiinflammatorischen Effekt, indem es die Zytokin-Ansammlung und Leukozyten-Adhäsion an der Endothelwand minimiert [113]. 2013 veröffentlichten Yamada et al. eine Studie in der getestet wurde, ob TM die Entwicklung von Monocrotalin-induzierter PH im Rattenmodell verhindern kann. Durch die Therapie mit TM konnten hämodynamische Parameter wie mPAP, sowie die Muskularisierung der Pulmonalgefäße signifikant reduziert werden. In der Mortalitätsanalyse konnte jedoch kein Unterschied zwischen der mit TM behandelten und einer mit Placebo behandelten Kontrollgruppe dargestellt werden [116]. Physiologischer Weise beträgt der TM-Spiegel beim gesunden Erwachsenen $4,0 \pm 0,6$

ng/ml [117]. Erhöhtes Plasma-TM kann auf verstärkte intravaskuläre Gerinnung bzw. eine Erkrankung des Gerinnungssystems hinweisen. Man findet beispielsweise bei Patienten mit akutem und chronischem Nierenversagen, disseminierter intravaskulärer Gerinnung (DIC), akutem progressivem Lungenversagen (ARDS) und pulmonalen Embolien erhöhte TM-Spiegel [118]. Die Gruppe Cacoub et al. konnte zeigen, dass Patienten mit pulmonaler Hypertonie ebenfalls gehäuft an einer verminderten TM-Expression leiden und somit einem erhöhten Risiko vaskulärer Thrombosen ausgesetzt sind [119]. Auch Sakamaki et al. stellten dar, dass in ihrem Studienkollektiven Patienten mit PAH signifikant erniedrigte TM-Plasmaspiegel, im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv, aber auch zu einer PVH-Gruppe aufweisen [117]. Die Arbeitsgruppe Cella et al. kontrollierte verschiedene Plasmamarker vor und nach einer Bosentan-Therapie bei PH-Patienten. In dieser Versuchsreihe zeigte sich weder unterschiedliche TM-Plasmawerte zwischen den PH-Patienten und dem Kontrollkollektiv, noch Veränderung des TM's durch die Therapie mit Bosentan [120]. Insgesamt scheint TM jedoch ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Gerinnungsstörungen, mit relevantem Krankheitswert für die pulmonale Hypertonie zu sein [121].

2 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die Fragestellung, ob TM und MCP-1 einen diagnostischen bzw. prognostischen Aussagewert oder einen Zusammenhang zum Schweregrad für die PH besitzen. Beide Proteine sind in vorherigen Arbeiten als potentiell wegweisende Marker für die PH beschrieben worden. Insgesamt werden für MCP-1 167 und für TM 180 Plasmaproben aus dem Rechtsherzkatheterlabor der pneumologischen Ambulanz der Uniklinik Gießen gewonnen. Wobei zu den vier wichtigen Entitäten (IPAH, PH bei Linksherzerkrankungen, PH bei CVD, CTEPH) als auch für ein Ausschlusskollektiv ungefähr gleich viele Proben berücksichtigt werden. Die Höhe der potentiellen Biomarker im Blutplasma wird dabei mittels Enzyme-linked-Immunosorbend-Assay (ELISA) gemessen.

3 Material und Methoden

3.1 Probengewinnung und Blutproben

Für die Probengewinnung bzw. deren Weiterverwendung liegt ein positives Ethikvotum der Justus-Liebig-Universität Gießen vor (s. Anhang 7.8). Die Gewinnung der Plasmaproben findet ausschließlich im Rechtsherzkatheterlabor der pneumologischen Ambulanz des Universitätsklinikum Gießens statt. Hier erfolgt bei jedem Patienten mit Verdacht auf PH eine invasive Rechtsherzkatheter-Untersuchung mit gleichzeitiger Abnahme einer venösen Blutprobe über den liegenden Swan-Ganz-Katheter (mit schriftlicher Einwilligung der Patienten). Es werden jeweils zwei EDTA-Röhrchen abgenommen. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 3000 rpm wird das Plasma der Blutprobe entnommen, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und dann unverzüglich bei -80 °C gelagert. Für die Messungen der Plasmakonzentrationen von MCP-1 bzw. TM werden jeweils die Proben der initialen Katheteruntersuchung der Patienten verwendet. Die Messung der Konzentration von MCP-1 bzw. TM in den Proben erfolgt mittels ELISA. Die Messungen wurden im Zeitraum vom 31.10.2012 bis zum 22.06.2013 im Biomedizinischen Forschungszentrum am Seltersberg in Gießen durchgeführt. Dafür wurden die Proben aufgetaut, aliquotiert und nach den jeweiligen Anweisungen der ELISA-Kits verwendet.

3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA steht für Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay. Dies ist ein Verfahren zum Detektieren bzw. zum quantitativen Nachweis von Proteinen, Viren, Hormonen oder Toxinen mittels Antikörpern. Die ELISA-Untersuchung wird standardmäßig mit einer 96-well-Platte durchgeführt. Bei dem angewendeten *Sandwich*-ELISA wird der erste Antikörper auf der Mikrotiterplatte fixiert. Der nachzuweisende Stoff (Antigen) bindet an den ersten Antikörper, während ein zweiter Enzym-gebundener Antikörper über ein Farbstoffsubstrat zu einer Reaktion führt. Die Signalstärke des Farbstoffes kann mit einem Photometer bestimmt werden und so die Konzentration des zu bestimmenden Stoffs (Antigen) nachweisen. Abbildung 6 skizziert die Abläufe einer ELISA-Analyse. Da diese Nachweismethode als sehr genau und sensitiv angesehen ist, wird sie bis heute in der klinischen Laboratoriumsmedizin als Goldstandard zum Detektieren von Zytokinen verwendet. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist sein hoher quantitativer Charakter und eine generelle Reproduzierbarkeit [122].

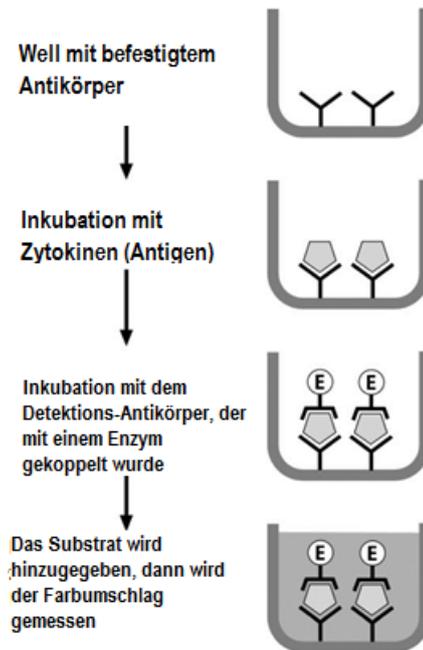


Abbildung 6: schematische Darstellung des ELISA Prinzips nach [122]

3.3 Datenanalyse und Statistik

Die statistische Auswertung erfolgt mittels der Statistik- und Analyse-Software SPSS (IMB, Version 21). Eine deskriptive Auswertung der Plasmakonzentrationen wird mit Darstellung des arithmetischen Mittelwerts \pm Standardabweichung (SD) bei normalverteilten Daten und des Medians und Interquartilabstands bei nicht-normalverteilten Werten vorgenommen. Die Plasmakonzentrationswerte werden mittels Pearson-Korrelation mit hämodynamischen Parametern in Zusammenhang gesetzt. Für die diskreten Variablen wird der Kruskal-Wallis-Test, für die stetigen Variablen der Mann-Whitney-U-Test verwendet. So wird untersucht, ob sich die unterschiedlichen PH-Entitäten, die NYHA-Stadien oder die Geschlechter hinsichtlich der Biomarker-Konzentrationen unterscheiden. P-Werte von $< 0,05$ werden als statistisch signifikant anerkannt. Verwendet werden hierzu nur die logarithmierten Werte der Plasmaspiegel. So ist, mit normalverteilten Daten, die weitere statistische Auswertung möglich. Eine Überlebensanalyse erfolgt mittels Kaplan-Meier-Analyse und die Auswertung der Ergebnisse mittels Cox-Regressions-Analyse. Die Cox-Regression macht eine Vorhersage über die Zeit bis zum Eintreten eines bestimmten Ereignisses (Tod eines Patienten). Es können verschiedene Einflussvariablen in die Analyse miteinbezogen werden, um den hypothetischen Einfluss bestimmter Faktoren auf den Todeszeitpunkt zu analysieren [123]. Während in der univariaten Analyse nur ein Faktor (LN-MCP-1 bzw. LN-TM) mit dem Überleben in Zusammenhang gesetzt wird, können in der multivariaten Analyse verschiedene Faktoren (PVR, 6-MWT, Geschlecht und NYHA-Stadien) zusätzlich miteinbezogen werden. Dabei wird die Aussagekraft des

Plasmaspiegels als Überlebensmarker mit bereits etablierten klinischen Verlaufsmarkern der PH in Zusammenhang gebracht und verglichen. So ist es möglich verdeckte Zusammenhänge in der Mortalitätsanalyse aufzuzeigen.

4 Ergebnissteil

4.1 Ergebnisse für MCP-1

4.1.1 Charakterisierung des MCP-1-Patientenkollektivs

Insgesamt werden 167 Proben auf die Höhe ihres Plasmawertes von MCP-1 untersucht. Es werden dabei 35 Proben (21%) von IPAH-Patienten, 35 Proben (21%) von CVD-Patienten, 37 Proben (22,2%) von CTEPH-Patienten, 24 Proben (14,4%) von Patienten mit PVH und 36 Proben (21,6%) von Patienten mit dem Ausschluss einer PH benutzt. 104 Patienten (62,3%) sind weiblich, 63 (37,7%) sind männlich. Das Verhältnis weiblicher zu männlicher Patienten beträgt 1,6:1. Das Alter der Patienten beträgt $63,8 \pm 13,9$ Jahre. Im gemessenen Kollektiv gehören 40 Patienten (24%) dem NYHA-Stadium II an, 93 Patienten (55,7%) dem Stadium III und 22 Patienten (13,1%) sind dem Stadium IV zugeordnet. Von insgesamt 12 Patienten (7,2%) ist kein NYHA-Stadium erfasst.

Belastungsfähigkeit und pulmonale Hämodynamik des Patientenkollektivs werden in Tabelle 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 2: durchschnittliche Hämodynamik des gesamten MCP-1-Patientenkollektivs

m: Meter, mmHg: Millimeter Quecksilbersäule, l/min: Liter pro Minute, ml/min/m²: Milliliter pro Minute pro Quadratmeter, dyn*sec*cm⁻⁵, N: Anzahl der Proben, SD: Standardabweichung, IQR: Interquartil range, Interquartilabstand.

Hämodynamik	6-MWT	mPAP	PAWP	HZV	CI	PVR
	Mittelwert (±SM)	Mittelwert (±SM)	Mittelwert (±SM)	Mittelwert (±SM)	Mittelwert (±SM)	Median (IQR)
Einheit	m	mmHg	mmHg	l/min	ml/min/m ²	dyn*sec*cm ⁻⁵
N	138	167	167	167	167	167
	319,62 (121,205)	37,40 (±15,010)	9,52 (± 5,40)	4,53 (± 1,21)	2,43 (± 0,58)	443 (531)

Tabelle 3: Hämodynamik der einzelnen Entitäten des MCP-1-Patientenkollektivs

m: Meter, mmHg: Millimeter Quecksilbersäule, l/min: Liter pro Minute, ml/min/m²: Milliliter pro Minute pro Quadratmeter, dyn*sec*cm⁻⁵, N: Anzahl der Proben, SD: Standardabweichung, IQR: Interquartil range, Interquartilabstand

	6-MWT Mittelwert (±SD)	MPAP Mittelwert (±SD)	PAWP Mittelwert (±SD)	HZV Mittelwert (±SD)	CI Mittelwert (±SD)	PVR Median (IQR)
Einheit	m	mmHg	mmHg	ml/min	l/min/m ²	dyn*sec*cm ⁻⁵
IPAH	343,29 (132,26)	47,69 (15,43)	7,51 (3,42)	4,10 (1,02)	2,24 (0,57)	727,00 (604)
CVD	320,37 (126,94)	43,17 (11,50)	7,57 (3,69)	4,23 (0,97)	2,37 (0,50)	632,00 (501)
CTEPH	310,12 (118,24)	39,78 (9,79)	9,72 (4,28)	4,41 (1,14)	2,31 (0,50)	462,00 (410)
PVH	304,42 (92,05)	39,25 (9,83)	17,17 (6,73)	4,87 (1,25)	2,56 (0,59)	331,50 (269)
Ausschl.	309,36 (127,11)	18,08 (3,95)	8,08 (3,86)	5,14 (1,36)	2,72 (0,63)	155,50 (117)

4.1.2 Charakterisierung des Ausschlusskollektivs

Das Ausschlusskollektiv umfasst 36 Patienten. Das Verhältnis männlicher zu weiblichen Patienten beträgt 1:2,2. Die Patienten mit Ausschluss einer PH im gemessenen Kollektiv haben zum Zeitpunkt des Katheters ein durchschnittliches Alter von 66 ± 10 Jahren. Der gemittelte BMI beträgt $27,88 \pm 6,24$ kg/m². Die echokardiographisch gemessene linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) beträgt im Durchschnitt 57 ± 17 %. Bei 13 Patienten ist die LVEF nicht bestimmt worden. 13 Patienten (36,1%) der Ausschluss-Gruppe weisen eine diastolische Compliance-Störung des linken Ventrikels auf (echokardiographisch gemessen). Von den 36 Patienten des Ausschlusskollektivs zeigen 13 Patienten (36,1%) eine kardiologische Begleiterkrankung, 17 Patienten (47,2%) sind pulmonal erkrankt, 3 Patienten (8,3%) zeigen ein stattgefundenes thrombembolisches Ereignis und weitere 3 Patienten (8,3%) weisen eine Kollagenose als Nebenbefund auf.

4.1.3 MCP-1-Plasmaspiegel

Die Messungen der MCP-1-Plasmaspiegel aller Patientenproben (inklusive Ausschluss-Diagnose) sind in Abbildung 7 dargestellt und zeigen eine Spannweite von 37,60 bis 2000,00 pg/ml (wobei 2000,00 die Obergrenze der Detektion durch den benutzten ELISA darstellt). Der Median der linksverteilten Daten beträgt 221,58 pg/ml (IQR 176,29 pg/ml). Der Mittelwert \pm SD beträgt $289,50 \pm 285,81$ pg/ml. Bei links-gipfliger Verteilung der MCP-1-Plasmaspiegel erfolgt eine Logarithmierung zur weiteren statistischen Auswertung. Der Mittelwert \pm SD der normalverteilten Auswertung ist $5,42 \pm 0,66$ (s. Abb. 8).

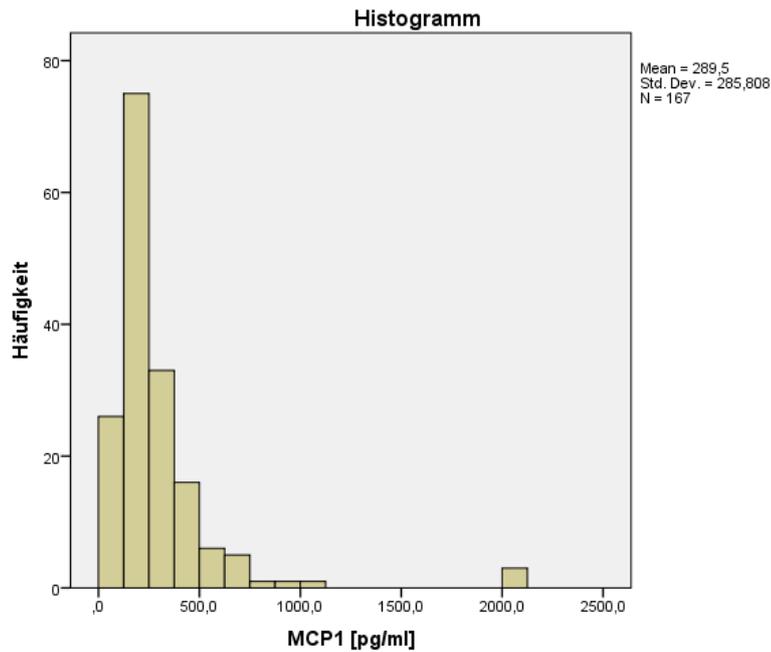


Abbildung 7: Boxplot MCP-1-Plasmaspiegel aller Messungen

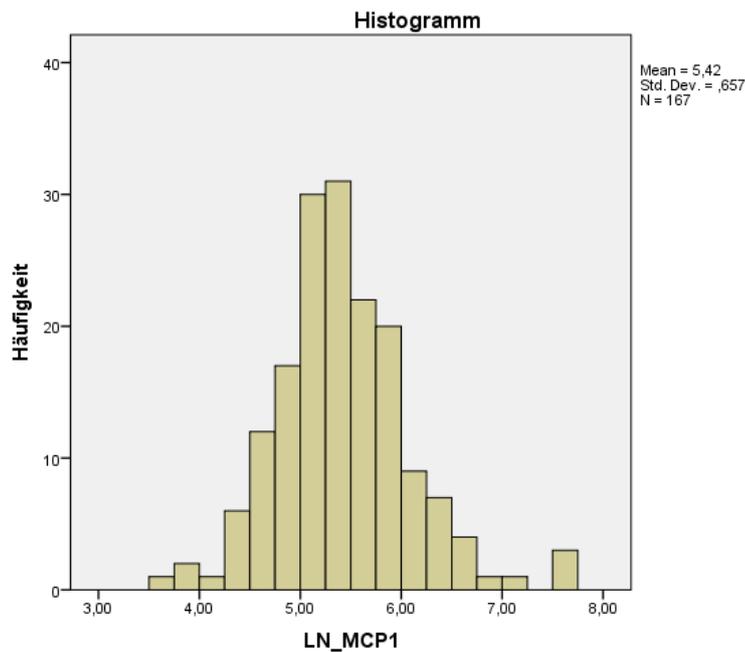


Abbildung 8: Boxplot logarithmierte MCP-1-Plasmaspiegel aller Messungen

4.1.3.1 MPC-1-Plasmaspiegel der einzelnen Entitäten

Der Median (IQR) des Plasmaspiegels für MCP-1 in der IPAH-Gruppe beträgt 172,60 pg/ml (IQR 170,30 pg/ml), in der CVD-Gruppe 285,00 pg/ml (IQR 296,40 pg/ml), in der CTEPH-Gruppe 225,62 pg/ml (IQR 192,10 pg/ml), in der PVH-Gruppe 230,54 pg/ml (IQR 146,70 pg/ml) und in der Ausschluss-Gruppe 193,33 pg/ml (IQR 146,70 pg/ml) (s. Abb. 9). Die Varianzanalyse mittels ANOVA-Test wird mit den logarithmierten

Plasmawerten durchgeführt. Sie weist einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Entitäten auf ($p=0,012$). Der Post-hoc-Test bestätigt die signifikante Differenz zwischen der IPAH-Gruppe und CVD-Gruppe ($p=0,005$). Zwischen den Gruppen der Erkrankten und der Ausschlussgruppe lässt sich kein signifikanter Unterschied im MCP-1-Plasmaspiegel feststellen.

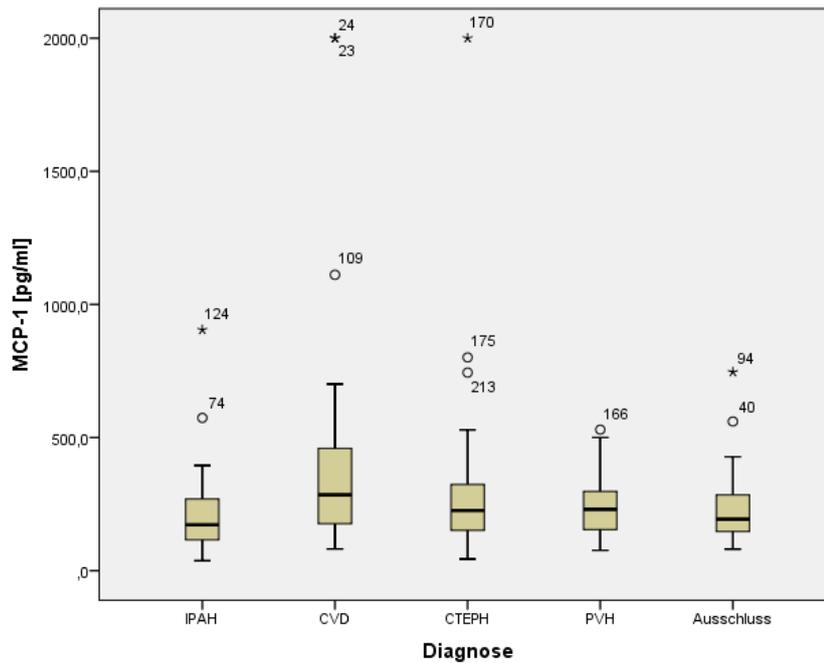


Abbildung 9: Boxplot: MCP-1-Plasmaspiegel geordnet nach Diagnose

4.1.3.2 MCP-1-Plasmaspiegel der NYHA-Stadien und der Geschlechter

Die Analysen der MCP-1-Plasmaspiegel für die Geschlechterverteilung und die NYHA-Stadien wurden jeweils nur für Patienten mit der definitiven Diagnose PH durchgeführt. In der Varianzanalyse können zwischen den einzelnen NYHA-Stadien keine signifikanten Unterschiede in den logarithmierten MCP-1-Plasmaspiegel festgestellt werden ($p=0,631$). Auch zwischen den Geschlechtern ist kein bedeutender Unterschied in den logarithmierten MCP-1-Plasmaspiegeln zu vermerken ($p = 0,317$) (s. Tab. 4).

Tabelle 4: MCP-1-Plasmaspiegel aufgelistet für NYHA-Stadien und Geschlecht

Pg/ml: Pikogramm pro Milliliter, IQR: Interquartil range, Interquartilabstand

NYHA Stadium	MCP-1 Plasmaspiegel	
	Median (pg/ml)	IQR (pg/ml)
II	227,14	129,20
III	223,60	214,40
IV	239,68	268,10
Geschlecht		
Männlich	237,38	184,50
Weiblich	206,43	176,30

4.1.3.3 Korrelation der MCP-1-Plasmaspiegel mit der Hämodynamik

Die Darstellung der Zusammenhänge zwischen MCP-1-Plasmaspiegel und den hämodynamischen Parametern erfolgt mittels Pearson-Korrelation. Tabelle 5 stellt die Korrelationen dar. Die Korrelation ist signifikant ab einem p-Wert von $< 0,05$. Zwischen keinem der hämodynamischen Parameter und den logarithmierten MCP-1-Konzentrationen lässt sich ein signifikanter linearer Zusammenhang darstellen.

Tabelle 5: Pearson-Korrelation LN-MCP-1 und Hämodynamik

LN-MCP-1: Logarithmierter MCP-1-Wert, Sig.: Signifikanz, N: Anzahl der hämodynamischen Werte

	LN-MCP-1		
	Pearson Korrelation r	Sig.	N
6-MWT	-0,07	0,44	116
MPAP	-0,08	0,39	131
PAWP	-0,10	0,26	131
HZV	-0,01	0,87	131
CI	-0,04	0,62	131
PVR	-0,08	0,39	131

4.1.4 Mortalitätsanalyse aller PH-Patienten

In die Mortalitätsstatistiken sind 130 Patienten mit PH einbezogen. Von diesen verstarben 22 Patienten (16,9%) innerhalb des Beobachtungszeitraums. Bei 37 Patienten (22,1%) ist kein Sterbedatum bzw. kein Datum des letzten Kontaktes bekannt. Insgesamt zeigt die Kaplan-Meier-Darstellung für alle Patienten mit PH eine durchschnittliche Überlebensrate von 83,1%. Das 1-Jahres-Überleben liegt bei 90,3%, das 3-Jahres-Überleben bei 77,1% und für das 5-Jahres-Überleben zeigt sich ein Wert von 71,5% (s. Abb. 10). Die mittlere Überlebenszeit beträgt im Patientenkollektiv 143 Monate (95% CI 118-169).

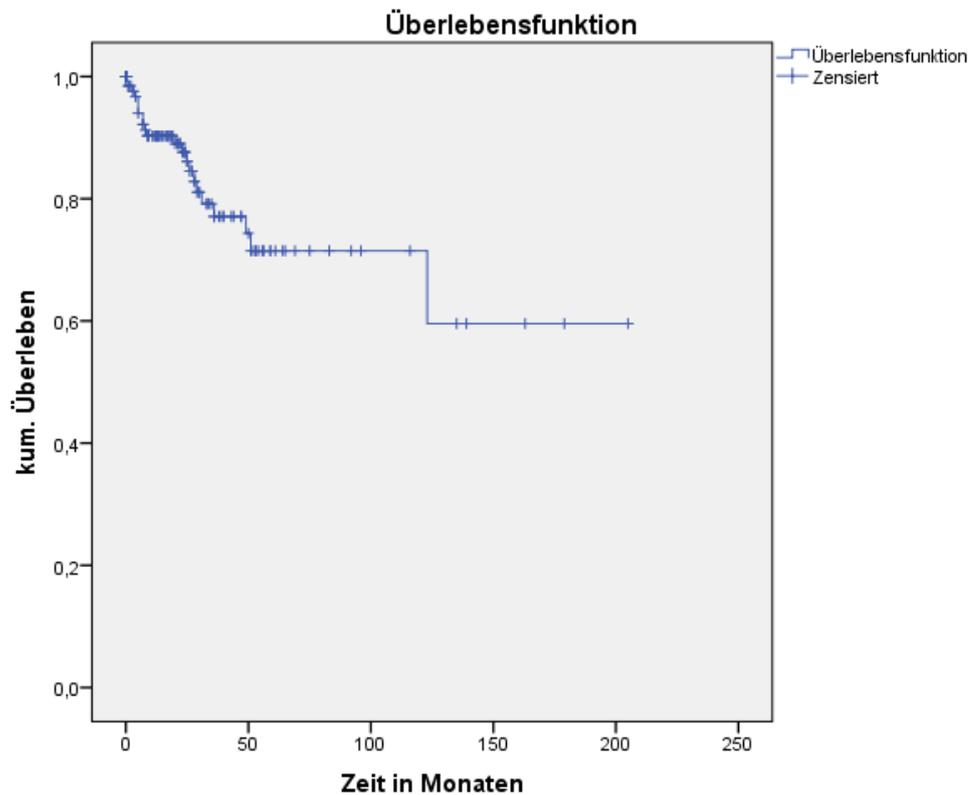


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurve aller Patienten mit PH

4.1.4.1 Mortalitätsanalyse in Bezug auf die Höhe von MCP-1

Das Aufteilen der MCP-1-Plasmakonzentrationen in vier Quartile erlaubt eine detailliertere Darstellung für das Überleben. (s. Abb. 11).

Die schlechteste Prognose ergibt sich für Patienten mit sehr hohen MCP-1-Plasmaspiegeln. Allerdings zeigen sich im Log-Rank-Test keine signifikanten Unterschiede für Mortalität zwischen den einzelnen Quartilen der LN-MCP-1-Spiegel ($p = 0,179$).

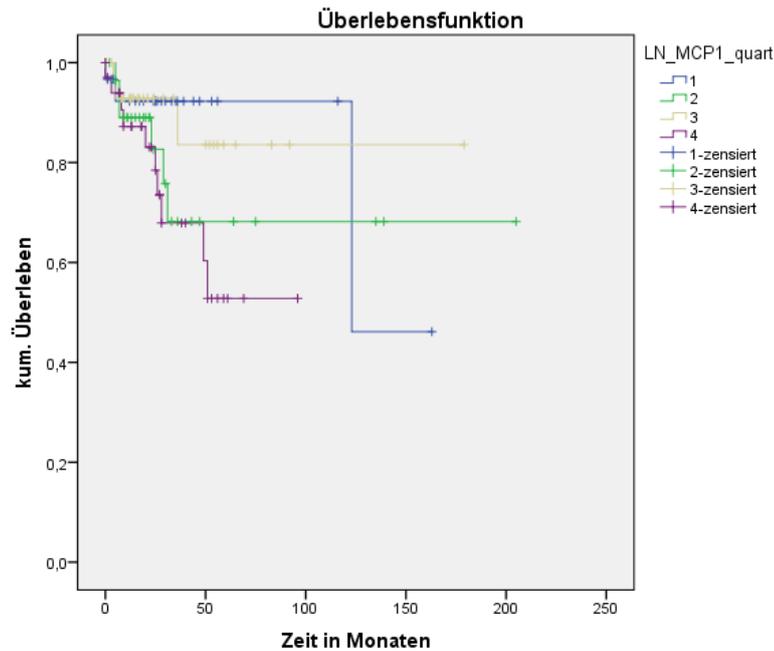


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die log. MCP-1-Quartile

4.1.5 Time to clinical worsening aller PH-Patienten

Die *Time to clinical worsening*, also die Zeit bis zu einer klinischen Verschlechterung, definiert sich über die Notwendigkeit einer Therapie-Eskalation. In die Analyse werden 121 Patienten einbezogen. Von ihnen erhalten 47 Patienten (38,84%) aufgrund der Verschlechterung ihres Krankheitszustandes eine Therapieerweiterung. Die Wahrscheinlichkeit innerhalb des ersten Jahres eine Therapieerweiterung zu benötigen liegt im beobachteten Patientenkollektiv bei 25,2%. Nach 3 bzw. 5 Jahren betragen die Wahrscheinlichkeiten 45,8% und 66,7% (s. Abb. 12). Der mittlere Zeitraum bis zum Erhalt einer Kombinationstherapie beträgt 67 Monate (95% CI 45–90 Monate).

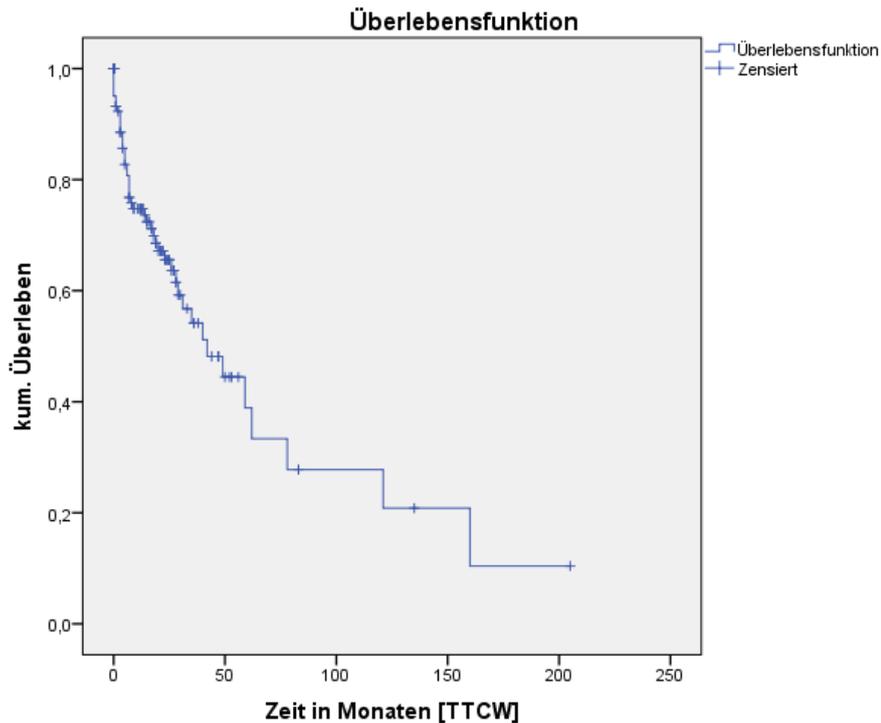


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für alle Patienten mit PH

4.1.5.1 *Time to clinical worsening* in Bezug auf die Höhe von MCP-1

Wie auch bei der Analyse für das Überleben ist das vierte Quartil mit der kürztesten Zeit bis zu einer klinischen Verschlechterung und folgender Therapieerweiterung behaftet. Es kann aber kein signifikanter Unterschied in der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung zwischen den einzelnen logarithmierten MCP-1-Quartilen festgestellt werden (s. Abb. 13). Der Log-Rang-Test ist nicht signifikant für die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung, bezogen auf die Höhe der logarithmierten MCP-1-Werte ($p=0,238$).

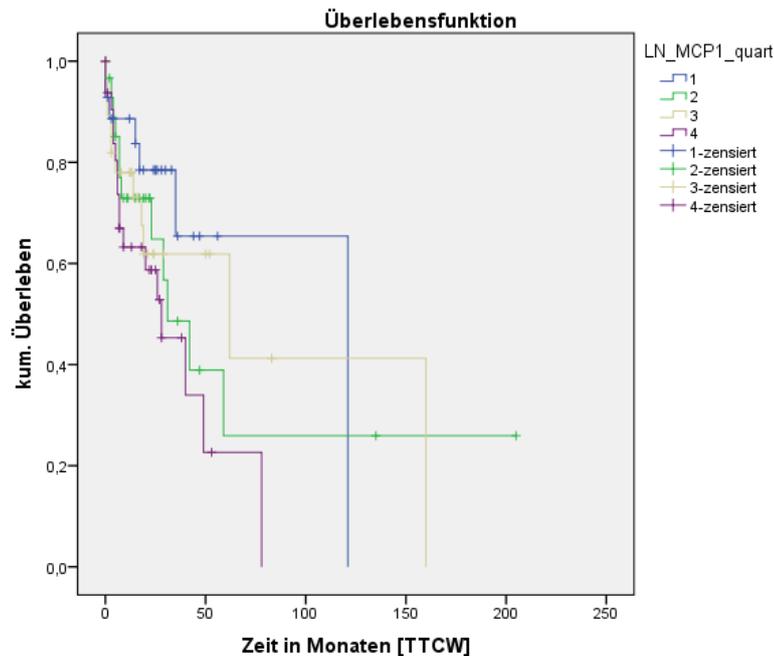


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für die log. MCP-1-Quartile

4.1.6 Cox-Regressionsanalyse aller PH-Patienten

Diese Analyse wird sowohl univariat, als auch multivariat durchgeführt. Als Einflussfaktoren für die multivariate Cox-Regression werden die hämodynamischen Parameter, sowie klinisch bereits genutzte Marker für die Überlebensprognose bei PH Patienten (6-MWT, NYHA-Stadien) gewählt. In der Cox-Regression für das gesamte MCP-1-Kollektiv stellt sich ein Hazard Ratio (HR) von 1,58 (95% CI 0,94-2,766; $p=0,085$) dar. Dementsprechend erhöht sich pro Anstieg LN-MCP-1 um eine Einheit das Risiko zu versterben um 58%. Für die LN-MCP-1-Quartile stellen sich mit einem HR von 0,344 (1. gegen 4. Quartil), 0,636 (2. gegen 4. Quartil) und 0,312 (3. gegen 4. Quartil) und jeweils nicht signifikanten p -Werten keine wesentlichen Unterschiede im Überleben zwischen den einzelnen Quartilen dar (s. Abb. 14). Auch hier sind die höchsten MCP-1-Plasmaspiegel mit der kürzesten Überlebenszeit assoziiert.

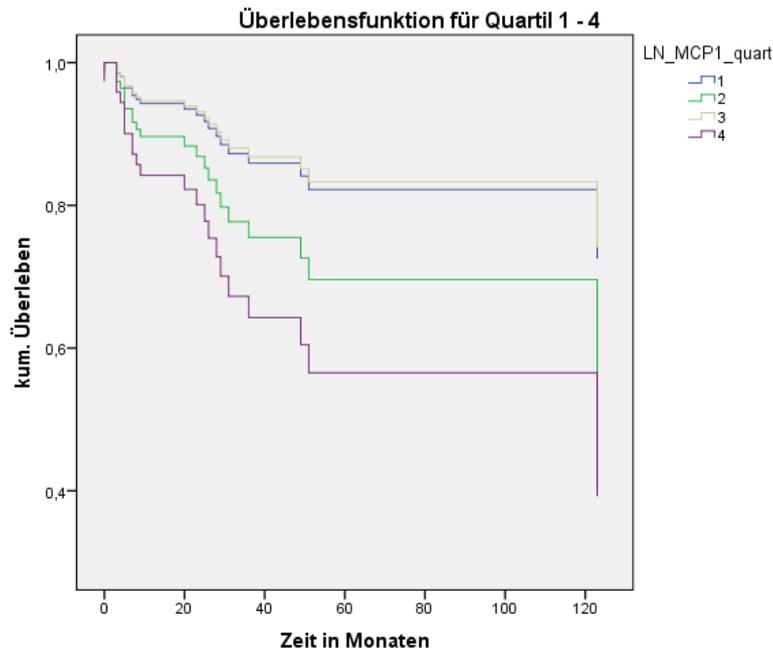


Abbildung 14: Cox-Regression - Überleben für die log. MCP-1-Quartile

4.1.6.1 Cox-Regressionsanalyse – *Time to clinical worsening*

Die Cox-Regression für die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung ergibt bei einem HR von 1,23 (95% CI 0,87-1,76; $p=0,244$), dass pro Anstieg LN-MCP-1 das Risiko eine klinische Verschlechterung zu erleiden um 25% zunimmt. Hierbei beträgt der p-Wert allerdings nur 0,244. Zwischen den Quartilen ergeben sich ein HR von 0,344 (95% CI 0,093-1,263) für das erste gegen das vierte Quartil, 0,636 (95% CI 0,225-1,797) für das zweite gegen das vierte Quartil und ein HR von 0,321 (95% CI 0,088-1,168) für das dritte gegen das vierte Quartil.

4.1.7 Uni-und multivariate Cox-Regressionsanalyse

Tabellen 6-8 stellt die uni-und-multivariate Cox-Regressionsanalyse dar.

Während der LN-MCP-1 in der univariaten Analyse nicht signifikant ist, zeigt er sich in der multivariaten Cox Regressionsanalyse als signifikanter Prädiktor für das Überleben ($p = 0,042$; 0,037; 0,027). Er ist nach dem 6-MWT der zweitstärkste Prädiktor für das Überleben. Der LN-MCP-1 korreliert in dieser Analyse stärker mit dem Überleben, als der PVR und die NYHA-Stadien.

Tabelle 6: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse (PVR, Geschlecht)

LN-MCP-1: Logarithmierter MCP-1 Wert, HR: Hazard Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Variable	Einzelanalyse		Multianalyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN-MCP-1	1,58 (0,94 - 2,66)	0,085	1,74 (1,02-2,97)	0,042
PVR			1,00 (1,00-1,002)	0,140
Geschlecht			2,03 (0,83 – 4,97)	0,120

Tabelle 7: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus 6-MWT

LN-MCP-1: Logarithmierter MCP-1 Wert, HR: Hazrad Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Variable	Einzelanalyse		Multianalyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN-MCP-1	1,58 (0,94 - 2,66)	0,085	1,997 (1,044 – 3,821)	0,037
PVR			1,001 (1,000 - 1,002)	0,143
Geschlecht			1,565 (0,525 - 4,669)	0,422
6-MWT			0,990 (0,985 – 0,996)	< 0,001

Tabelle 8: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus NYHA-Stadien

LN-MCP-1: Logarithmierter MCP-1 Wert, HR: Hazrad Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Variable	Einzelanalyse		Multianalyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN-MCP-1	1,58 (0,94 – 2,66)	0,085	2,179 (1,093 - 4,343)	0,027
PVR			1,001 (0,999 - 1,002)	0,395
Geschlecht			0,983 (0,287 - 3,363)	0,978
6-MWT			0,990 (0,985 - 0,996)	0,001
NYHA II			Referenz	0,060
NYHA III			0,672 (0,122 - 3,711)	0,649
NYHA IV			0,219 (0,057 - 0,847)	0,028

In den univariaten Cox-Regressionsanalysen für die Untergruppen der PH lassen sich nur in der IPAH-Gruppe signifikante p-Werte für den logarithmierten MCP-1-Plasmaspiegel als Überlebensprädiktor feststellen. Für alle anderen Untergruppen ergeben sich keine signifikanten Vorhersagen (s. Tab. 9).

Tabelle 9: Univariate Cox-Regression; Überleben LN-MCP1 für die einzelnen Ätiologien

LN-MCP-1: Logarithmierter MCP-1 Wert, HR: Hazrad Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Ätiologien	HR (95% CI)	Sig.
IPAH	3,421 (1,062 -11,026)	0,039
CVD	0,840 (0,368 - 1,918)	0,679
CTEPH	1,487 (0,434 - 5,094)	0,528
PVH		

4.1.8 Einzelgruppenanalyse

4.1.8.1 IPAH-Patientenkollektiv

Die IPAH-Gruppe umfasst insgesamt 35 Patienten, wobei 20 Patienten weiblich (57%) und 15 männlich (43%) sind. 11 Patienten (31%) sind im NYHA-Stadium II, 19 Patienten (54%) im Stadium III und 5 Patienten (15%) befinden sich im Stadium IV. Die hämodynamischen Daten des IPAH Kollektivs sind in Tabelle 3 abgebildet.

Die Konzentrationen der MCP-1-Plasmaspiegel reichen von 37,6 pg/ml bis 904,6 pg/ml. Der Median (IQR) beträgt 172,60 pg/ml (IQR 170,29 pg/ml). In der logarithmierten Darstellung beträgt der Mittelwert \pm SD 5,20 \pm 0,67. In der IPAH-Gruppe zeigen sich weder zwischen den funktionellen Klassen ($p=0,681$) noch zwischen den Geschlechtern ($p=0,254$) signifikante Unterschiede im MCP-1-Plasmaspiegel der Patienten. Die Pearson-Korrelation zeigt keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den hämodynamischen Parametern und den logarithmierten MCP-1-Konzentrationen. In die Mortalitätsanalyse werden alle 35 Patienten miteinbezogen. Von ihnen versterben 7 Patienten (20%) im Beobachtungszeitraum. Das 1-Jahresüberleben liegt bei 94,2%. Das 3- bzw. 5-Jahresüberleben beträgt 79,4%. Auch in der Subgruppenanalyse werden die MCP-1-Werte wieder in Quartile aufgeteilt. Das erste Quartil umfasst 12 Patienten, von denen 2 versterben (16,6%), das zweite Quartil beinhaltet 9 Patienten mit einem Todesfall (11,1%). Das dritte und vierte Quartil beinhalten jeweils 7 Patienten, im dritten Quartil verstirbt kein Patient, im Vierten versterben 4 Patienten (57,1%). Der Log-Rank-Test zeigt eine signifikante Differenz in der Überlebenszeit zwischen den einzelnen Quartilen an ($p=0,023$) (s. Abb. 15). In der Cox-Regression zeigt sich eine Hazard Ratio von 3,421 (95% CI 1,06-11,03; $p=0,039$). Dementsprechend steigt pro Anstieg des logarithmierten MCP-1-Wertes die Wahrscheinlichkeit zu versterben um das 3,4-fache. Im Interquartil-Vergleich zeigt sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied in der Cox-Regression ($p=0,046$) (s. Abb. 16).

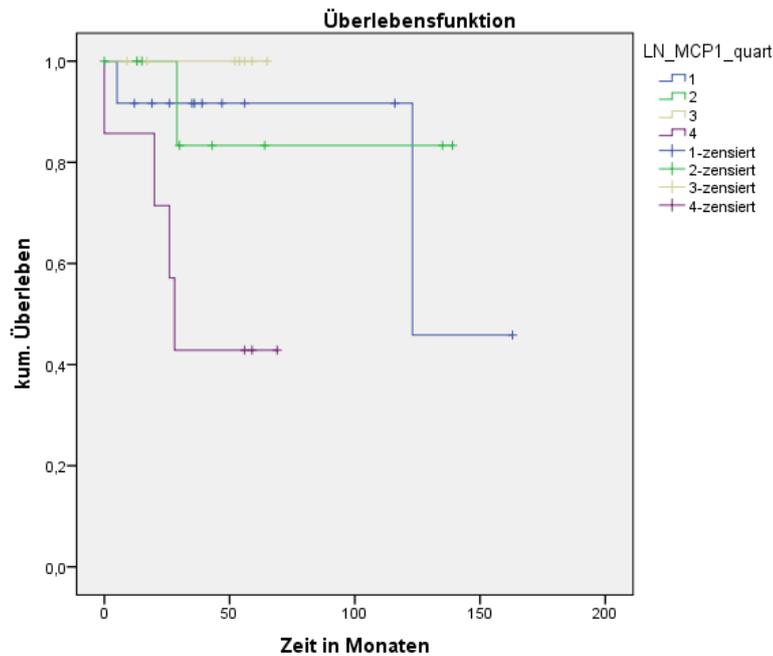


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die log. MCP-1-Quartile (nur IPAH)

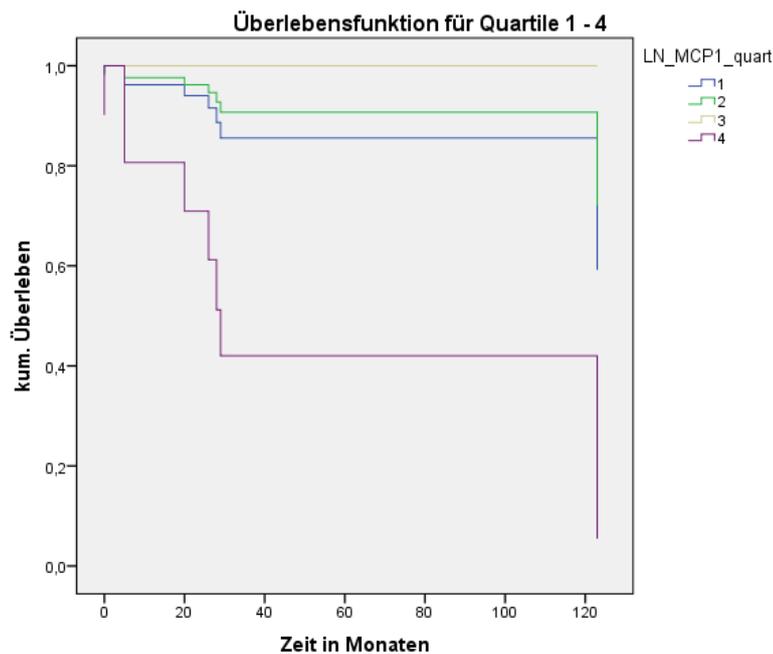


Abbildung 16: Cox-Regression - Überleben für die log. MCP-1-Quartile (IPAH)

4.1.8.2 CVD-Patientenkollektiv

Das CVD-Kollektiv umfasst eine Gruppe von 35 Patienten. Von ihnen sind 28 (82,3%) weiblich, 7 Patienten (20%) sind männlich. In NYHA-Stadium II befinden sich 6 Patienten (17,1%), im Stadium III sind 21 Patienten (60,7%) und im Stadium IV sind es 8 Patienten (22,8%). Die Verteilung der hämodynamischen Parameter des Kollektivs findet sich in Tabelle 3. Das gemessene Spektrum von MCP-1-Plasmaspiegeln reicht von 81,4 pg/ml bis 2000,0 pg/ml. Wobei 2000 pg/ml die maximale Grenze des zu

detektierenden Bereichs des ELISA's widerspiegelt. Der Median (IQR) beträgt 285,0 pg/ml (IQR 296,35 pg/ml). Nach Logarithmierung ergibt sich ein Mittelwert \pm SD von 5,73 \pm 0,75. Mittels Kruskal-Wallis-Test lassen sich keine signifikanten Unterschiede in den logarithmierten MCP-1-Plasmaspiegeln zwischen den funktionellen Klassen feststellen ($p=0,859$). Gleiches gilt für den Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p=0,949$). Die Korrelationsanalysen zeigen für keinen der genutzten hämodynamischen Parameter einen signifikanten Zusammenhang.

In die Mortalitätsanalyse fließen alle 35 Patienten mit ein. 11 der Patienten versterben im Beobachtungszeitraum (31,4%). Das 1-Jahresüberleben beträgt 83,9%, für das 3 – bzw. 5-Jahresüberleben ergeben sich Werte von 66,8% bzw. 54,6%. Der Log-Rank-Test zeigt keine signifikanten Differenzen für das Überleben zwischen den logarithmierten MCP-1-Plasmaspiegeln ($p=0,424$). Die Cox-Regressionsanalyse in Bezug auf das Überleben ist bei einem Hazard Ratio von 0,840 statistisch nicht signifikant (95% CI 0,368-1,918; $p=0,679$).

4.1.8.3 CTEPH-Patientenkollektiv

Dieses Kollektiv umfasst 37 Patienten. Davon sind 17 Patienten weiblich (45,9 %), 20 sind männlich (54%). Im NYHA-Stadium II befinden sich 11 Patienten (29,7%), im Stadium III sind 21 Patienten (56,7%) und im Stadium IV sind es 5 Patienten (13,5 %). Von einem Patienten ist kein NYHA-Stadium bekannt. Die hämodynamischen Werte des CTEPH-Kollektivs finden sich in Tabelle 3. Die Spanne der Ergebnisse der MCP-1-Plasmaspiegel reicht von 43,6 pg/ml bis 2000,0 pg/ml. Der Median (IQR) beträgt 225,62 pg/ml (IQR 192,14 pg/ml). Nach Logarithmierung der Ergebnisse zeigt sich ein arithmetisches Mittel \pm SD von 5,43 \pm 0,69. Statistisch kann zwischen den funktionellen Klassen kein Unterschied in den logarithmierten MCP-1-Konzentrationen festgestellt werden ($p=0,312$). Auch zwischen den Geschlechtern ist kein Unterschied darstellbar ($p=0,294$). Die Korrelationen der hämodynamischen Parameter mit den logarithmierten MCP-1-Plasmaspiegeln sind statistisch nicht signifikant. In die Mortalitätsanalyse fließen die Daten von 36 Patienten ein. Es versterben 4 von ihnen (11%) im Beobachtungszeitraum. Das 1-, 3-, und 5-Jahresüberleben beträgt jeweils 86,6%. Im Log-Rank-Test bestätigt sich kein Unterschied in der Überlebenszeit zwischen den einzelnen logarithmierten MCP-1-Quartilen ($p=0,997$). In der anschließenden Cox-Regressionsanalyse stellt sich das Hazard Ratio von 1,487 nicht statistisch signifikant dar (95% CI 0,434-5,094; $p=0,528$).

4.1.8.4 PVH-Patientenkollektiv

Das PVH-Kollektiv umfasst 24 Patienten, wovon 15 weiblich (62,5%) und 9 männlich (37,5 %) sind. Insgesamt gehören 9 Patienten dem NYHA-Stadium II an (37,5 %), 13

Patienten sind im Stadium III (54,2 %) und 2 Patienten im Stadium IV (8,3 %). Die Hämodynamik der Patientengruppe wird in Tabelle 3 aufgeführt. Die Spannweite der MCP-1-Messungen reicht im PVH-Kollektiv von 76,3 bis 529,7 pg/ml. Der Median (IQR) beträgt 230,54 pg/ml (IQR 146,71 pg/ml). Nach Logarithmierung stellt sich der Mittelwert \pm SD mit $5,40 \pm 0,46$ dar. Im Kruskal-Wallis-Test zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den logarithmierten MCP-1-Konzentrationen zwischen den funktionellen Klassen ($p=0,827$). Auch zwischen den Geschlechtern kann mittels Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied in den logarithmierten MCP-1-Werten festgestellt werden ($p=0,073$).

Die Pearson-Korrelationen mit den hämodynamischen Parametern ergeben wie bei den vorherigen Gruppen keine signifikanten Zusammenhänge mit den logarithmierten MCP-1-Plasmakonzentrationen. In der Mortalitätsanalyse werden alle 24 Patienten berücksichtigt. Es verstirbt kein Patient im Beobachtungszeitraum. Dementsprechend lassen sich keine Rückschlüsse mittels Kaplan-Meier-bzw. Cox-Regressionsanalyse ziehen.

4.2 Ergebnisse für TM

4.2.1 Charakterisierung des TM-Patientenkollektivs

Für die TM-Messungen werden insgesamt 180 Proben verwendet. Davon sind 113 Patienten weiblich (62,8%), 67 Patienten sind männlich (37,2%). Das Verhältnis weiblicher zu männlichen Patienten beträgt 1,6:1. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt $63,5 \pm 13,4$ Jahre. Insgesamt stammen 39 Proben von IPAH-Patienten (21,7%), 39 von CVD-Patienten (21,7%), 36 von CTEPH-Patienten (20%), 28 von PVH-Patienten (15,6%) und 38 Proben von Patienten mit einem Ausschluss einer PH (21,1%). 47 Patienten des TM-Kollektivs sind dem NYHA-Stadium II zugeordnet (26,1%), 96 Patienten dem Stadium III (53,3%) und 25 Patienten gehören dem NYHA-Stadium IV an (13,9%). Von 12 Patienten fehlen die Informationen über die funktionelle Klasse. Belastungsfähigkeit und pulmonale Hämodynamik des Patientenkollektivs werden in Tabelle 10 und 11 dargestellt. Die statistischen Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (bei Normalverteilung) oder als Median mit Interquartilabstand (bei nicht-normalverteilten Daten) aufgezeigt.

Tabelle 10: durchschnittliche Hämodynamik des gesamten TM-Patientenkollektivs

m: Meter, mmHg: Millimeter Quecksilbersäule, l/min: Liter pro Minute, ml/min/m²: Milliliter pro Minute pro Quadratmeter, dyn*sec*cm⁻⁵, N: Anzahl der Proben, SD: Standardabweichung, IQR: Interquartil range, Interquartilabstand.

Hämodynamik	6-MWT Mittelwert (\pm SD)	MPAP Mittelwert (\pm SD)	PAWP Mittelwert (\pm SD)	HZV Mittelwert (\pm SD)	CI Mittelwert (\pm SD)	PVR Median; IQR
Einheit	m	mmHg	mmHg	l/min.	ml/min/m ²	dyn*sec*cm- 5
N	148	180	180	180	180	180
	314,94 (\pm 122,19)	37,71 (\pm 14,77)	9,95 (\pm 5,45)	4,50 (\pm 1,26)	2,41 (\pm 0,62)	452; 547

Tabelle 11: Hämodynamik der einzelnen Entitäten des TM-Kollektivs

m: Meter, mmHg: Millimeter Quecksilbersäule, l/min: Liter pro Minute, ml/min/m²: Milliliter pro Minute pro Quadratmeter, dyn*sec*cm⁻⁵, N: Anzahl der Proben, SD: Standardabweichung, IQR: Interquartil range, Interquartilabstand.

	6-MWT Mittelwert (± SD)	MPAP Mittelwert (± SD)	PAWP Mittelwert (± SD)	HZV Mittelwert (± SD)	CI Mittelwert (± SD)	PVR Median (IQR)
Einheit	m	mmHg	mmHg	ml/min	l/min/m ²	dyn*sec*cm ⁻⁵
IPAH	353,47 (127,45)	47,74 (15,23)	7,95 (3,04)	4,02 (1,04)	2,20 (0,56)	750,00 (636)
CVD	292,71 (126,72)	43,64 (10,57)	7,61 (3,55)	4,12 (0,99)	2,31 (0,53)	670,00 (519)
CTEPH	295,94 (115,73)	39,89 (9,528)	9,65 (4,07)	4,46 (1,33)	2,30 (0,60)	482,00 (405)
PVH	312,95 (93,43)	38,89 (9,77)	18,25 (6,14)	4,84 (1,25)	2,60 (0,63)	331,50 (290)
Ausschl.	312,44 (130,15)	18,39 (3,82)	8,55 (3,72)	5,15 (1,34)	2,71 (0,64)	153,50 (107)

4.2.2 Charakterisierung des Ausschlusskollektivs

Das Ausschlusskollektiv beinhaltet 38 Patienten. Das Verhältnis männlicher zu weiblichen Patienten ist 1:2,1. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 66 ±10 Jahre. Der durchschnittliche BMI ist 27,82 ±7,31 kg/m². Die echokardiographisch gemessene linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigt sich im Durchschnitt mit 59 ±14 %. Insgesamt weisen 14 Patienten (36,8%) der Ausschluss-Gruppe eine diastolische Compliance-Störung des linken Ventrikels auf (echokardiographisch gemessen). Als Diagnose zeigen 16 Patienten (42,1%) eine kardiologische Erkrankung, 15 Patienten (39,5 %) sind pulmonal erkrankt, 3 Patienten (7,9 %) weisen ein begleitendes thrombembolisches Ereignis auf. Weiter 4 Patienten haben eine Kollagenose als Nebenbefund (10,5 %).

4.2.3 TM-Plasmaspiegel

Die Messungen aller TM-Plasmaswerte ergibt im Histogramm ebenfalls eine links-gipflige Verteilung, die eine Logarithmierung zum Erhalt eines normalverteilten Graphen notwendig macht. Es zeigt sich eine Messbreite von 0,2 bis 6,91 ng/ml. Der Median der linksverteilten Daten beträgt 2,34 ng/ml (IQR 2,07 ng/ml). Der arithmetische Mittelwert ±SD aller TM-Messungen beträgt 2,66 ±1,58 ng/ml (s. Abb. 17). In der logarithmierten normalverteilten Darstellung beträgt er 0,75 ±0,79 (s. Abb. 18).

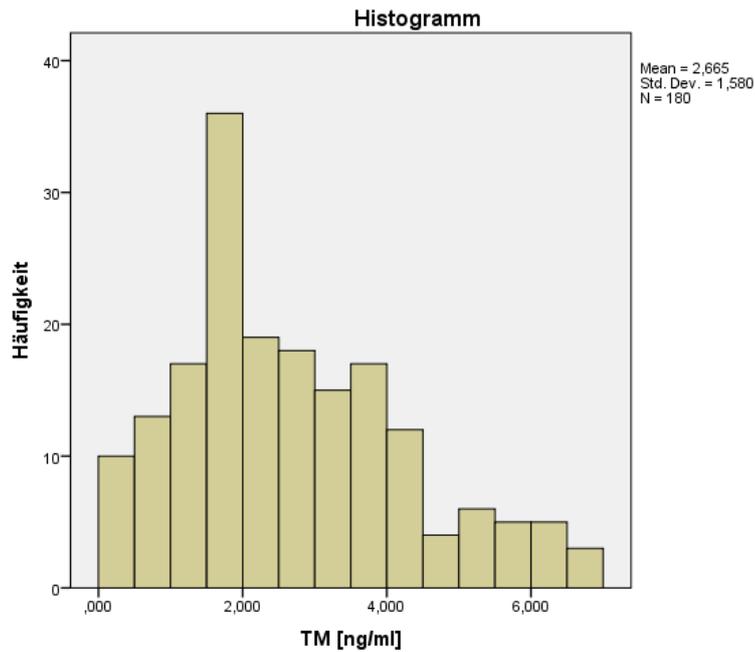


Abbildung 17: durchschnittliche TM-Plasmaspiegel aller Messungen

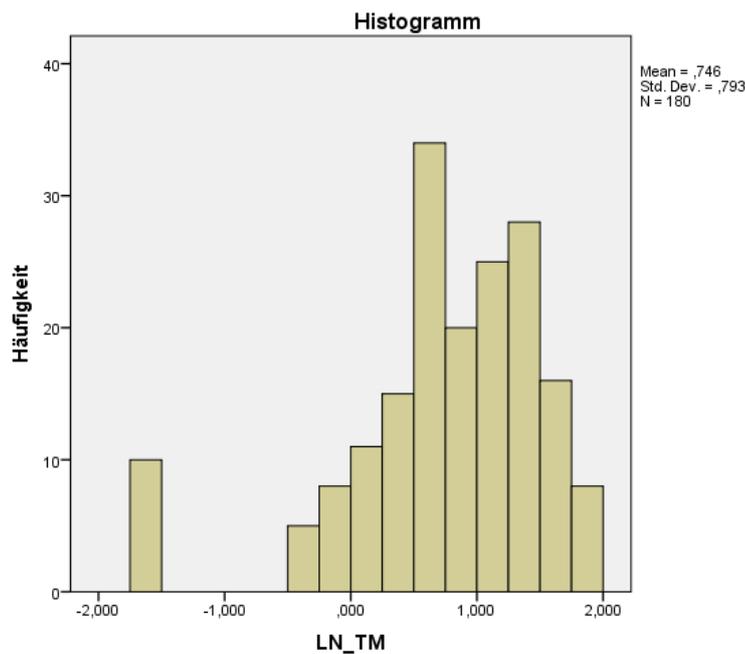


Abbildung 18: logarithmierte TM-Plasmaspiegel aller Messungen

4.2.3.1 TM-Plasmaspiegel der einzelnen Entitäten

Für die einzelnen Entitäten ergeben sich ein TM-Median von 2,29 ng/ml (IQR 1,81 ng/ml) für die IPAH-Gruppe, 2,11 ng/ml (IQR 2,00 ng/ml) in der CVD-Gruppe, 2,55 ng/ml (IQR 2,15 ng/ml) in der CTEPH-Entität, 2,91 ng/ml (IQR 2,15 ng/ml) für die PVH-Gruppe und 1,926 ng/ml (IQR 2,81 ng/ml) in der Ausschluss-Gruppe (s. Abb. 19). Die Varianzanalyse mittels ANOVA-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen logarithmierten Plasmakonzentrationen der PH-Entitäten auf ($p=0,748$).

Die gemessenen TM-Konzentrationen lassen weder eine Differenzierung zwischen den an PH-Erkrankten und dem Kontrollkollektiv, noch zwischen den unterschiedlichen Entitäten, zu.

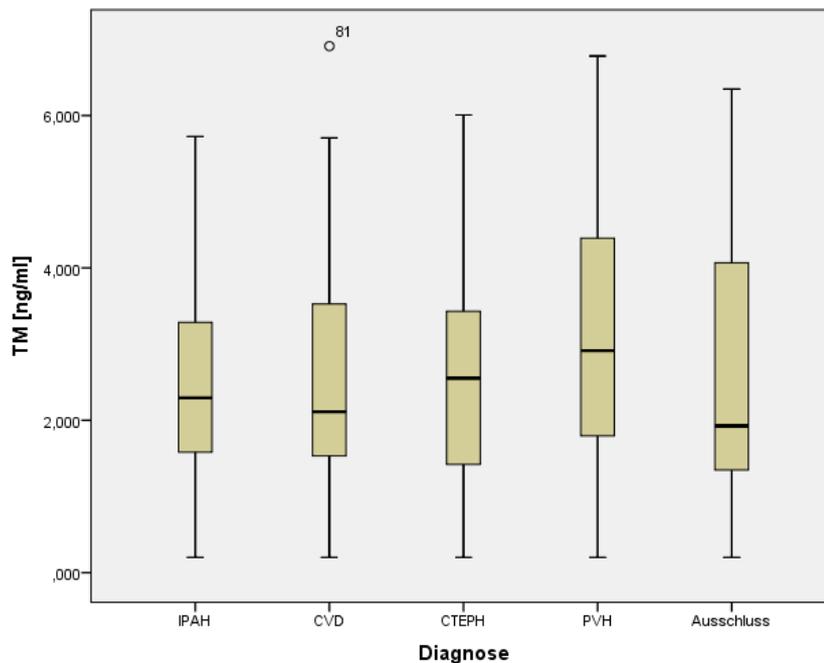


Abbildung 19: Boxplot-Darstellung für die TM-Plasmaspiegel der einzelnen Ätiologien

4.2.3.2 TM-Plasmaspiegel der NYHA-Stadien und der Geschlechter

Auch im TM-Kollektiv werden die Analysen der TM-Spiegel für die NYHA-Stadien und die Geschlechterverteilung unter Ausnahme der PH-Ausschlussgruppe durchgeführt. Tab. 12 fasst die TM-Plasmaspiegel der einzelnen NYHA-Stadien und der Geschlechter mittels Median und IQR zusammen. Die Varianzanalyse zwischen den funktionellen Klassen kann kein signifikanter Unterschied in den logarithmierten TM-Plasmaspiegeln nachweisen ($p=0,639$). Der TM-Spiegel korreliert nicht mit ansteigendem NYHA-Stadium. Auch zwischen den Geschlechtern ist keine signifikante Differenz in den logarithmierten TM-Spiegeln darzustellen ($p=0,222$).

Tabelle 12: TM-Plasmaspiegel als Median aufgelistet für NYHA-Stadien und Geschlecht

ng/ml: Nanogramm pro Milliliter, IQR: Interquartil range, Interquartilabstand

NYHA Stadium	TM-Plasmaspiegel	
	Median (ng/ml)	IQR (ng/ml)
II	2,03	2,46
III	2,51	1,91
IV	2,47	1,78
Geschlecht		
Männlich	2,10	1,88
Weiblich	2,38	1,97

4.2.3.3 Korrelation der TM-Plasmaspiegel mit der Hämodynamik

Tabelle 13 stellt die Zusammenhänge als Pearson-Korrelation zwischen logarithmiertem TM-Plasmaspiegel und Hämodynamik der Patienten dar. Die Korrelation ist signifikant ab einem p-Wert von 0,05. Zwischen dem PVR und dem logarithmierten TM-Plasmaspiegel kann eine signifikante Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,18 aufgewiesen werden ($p=0,032$) (s. Abb. 20). Je höher der PVR ist, desto niedriger sind die logarithmierten TM-Konzentrationen der Patienten.

Tabelle 13: Pearson-Korrelation LN-TM-Spiegel und Hämodynamik

LN-MCP-1: Logarithmierter MCP-1 Wert, Sig.: Signifikanz, N: Anzahl der Proben

	LN-TM		
	Pearson Korrelation r	Sig.	N
6-MWT	-0,099	0,277	132
MPAP	-0,124	0,142	142
PAWP	0,138	0,102	142
HZV	-0,011	0,900	142
CI	-0,028	0,738	142
PVR	-0,180	0,032	142

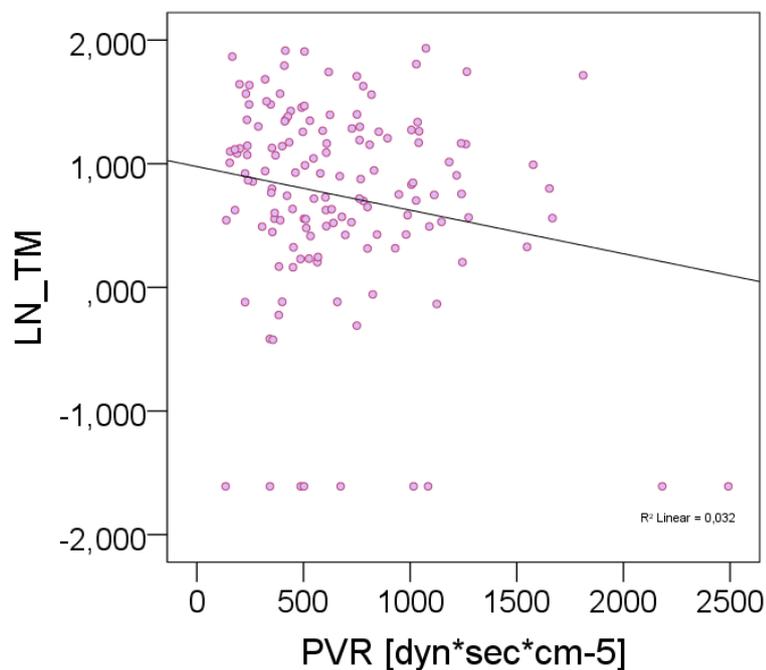


Abbildung 20: Korrelation zwischen den log. TM-Konzentrationen und dem PVR

4.2.4 Mortalitätsanalyse aller PH-Patienten

In die Mortalitätsanalyse werden 141 PH-Patienten miteinbezogen. Es verstarben 27 Patienten in Beobachtungszeitraum (19,1%). Von einem Patienten gibt es keine

Information über den Status des Überlebens. In der Kaplan-Meier-Darstellung zeigt sich für die Patienten in der TM-Gruppe ein 1-Jahres-Überleben von 90,1%, ein 3-Jahres-Überleben von 73,8% und ein 5-Jahresüberleben von 68,9% (s. Abb. 21). Die mittlere Überlebenszeit des TM-Patientenkollektivs sind 135 Monate (95% CI 109–160 Monate).

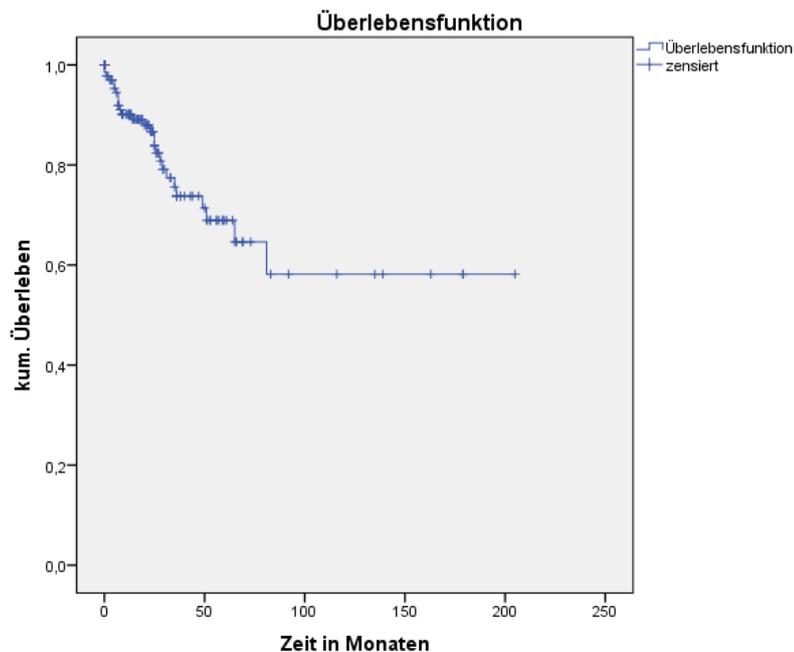


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Darstellung für das Überleben aller Patienten mit PH

4.2.4.1 Mortalitätsanalyse in Bezug auf die Höhe von TM

Das erste Quartil des TM-Kollektivs umfasst 35 Patienten, von denen 7 im Beobachtungszeitraum versterben (20%). Im zweiten Quartil versterben 8 von 35 Patienten (22,8%). Das dritte Quartil beinhaltet 36 Patienten. Es versterben 6 von ihnen (16,6%). Im vierten Quartil sind 35 Patienten vertreten, es versterben 7 im Beobachtungszeitraum (20%). Patienten im zweiten Quartil weisen demnach die kürzeste Überlebenszeit auf (s. Abb. 22). Der Log-Rank-Test weist zwischen den einzelnen TM-Quartilen jedoch keine signifikanten Unterschiede für das Überleben nach ($p=0,961$).

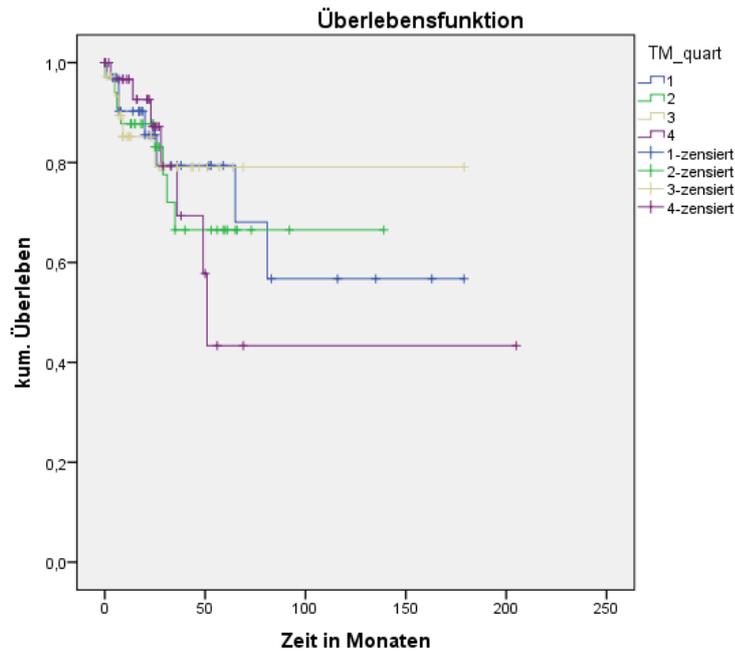


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Darstellung für das Überleben der TM-Quartile

4.2.5 Time to clinical worsening aller PH-Patienten

Im TM-Patientenkollektiv werden 135 Patienten in die TTCW-Analyse einbezogen. Von 7 Patienten liegt keine Information über die Therapieerweiterung vor. Bei insgesamt 58 von 135 Patienten (43%) ist eine Erweiterung der Therapiemaßnahmen notwendig. Die Wahrscheinlichkeit für eine Therapieeskalation liegt im TM-Kollektiv nach einem Jahr bei 30,4%, nach 3 Jahren bei 55,9% und nach 5 Jahren bei 65,2% (s. Abb. 23). Die durchschnittliche Dauer bis zum Erhalt einer Kombinationstherapie liegt bei 65 Monaten (95% CI 43 – 87 Monate).

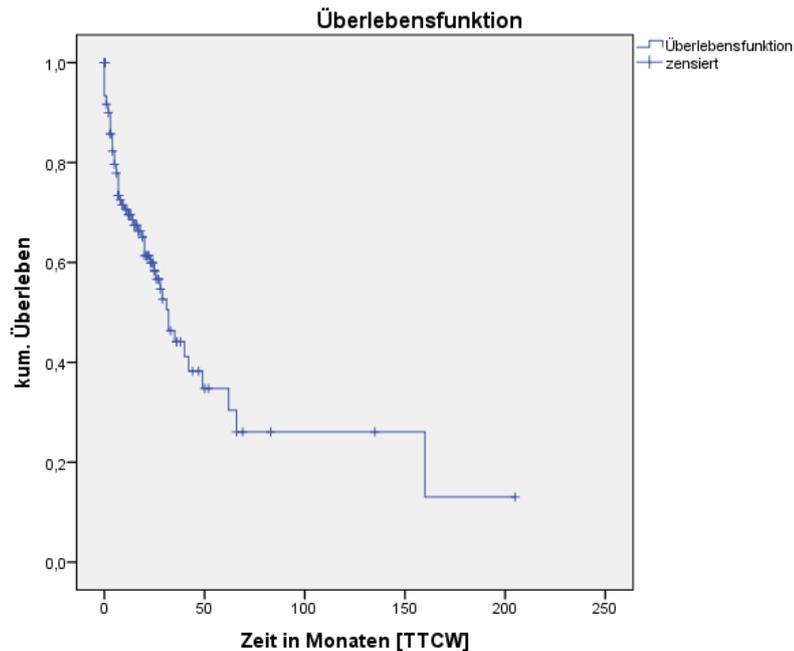


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für alle Patienten mit PH

4.2.5.1 *Time to clinical worsening* in Bezug auf die Höhe von TM

Auch im TM-Kollektiv werden die Patienten nach Höhe der Plasmaspiegel in vier Quartile aufgeteilt. Das erste Quartil beinhaltet 33 Patienten von denen 15 (45,5%) im Beobachtungszeitraum eine Kombinationstherapie benötigen. Die durchschnittliche Dauer bis zum Erhalt der Therapie beträgt 57 Monate (95% CI 30-83 Monate). Im zweiten Quartil erhalten 21 (63,6%) von 33 Patienten eine Therapieausweitung. Der Log-Rank-Test zeigt signifikante Unterschiede in der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung zwischen den TM-Quartilen ($p=0,016$). Das erste und zweite Quartil der TM-Plasmaspiegel gehen mit einer verkürzten Zeit bis zur klinischen Verschlechterung einher (s. Abb. 24). Die längste ereignisfreie Zeit ergibt sich für die Patientengruppe mit den höchsten TM-Plasmaspiegeln.

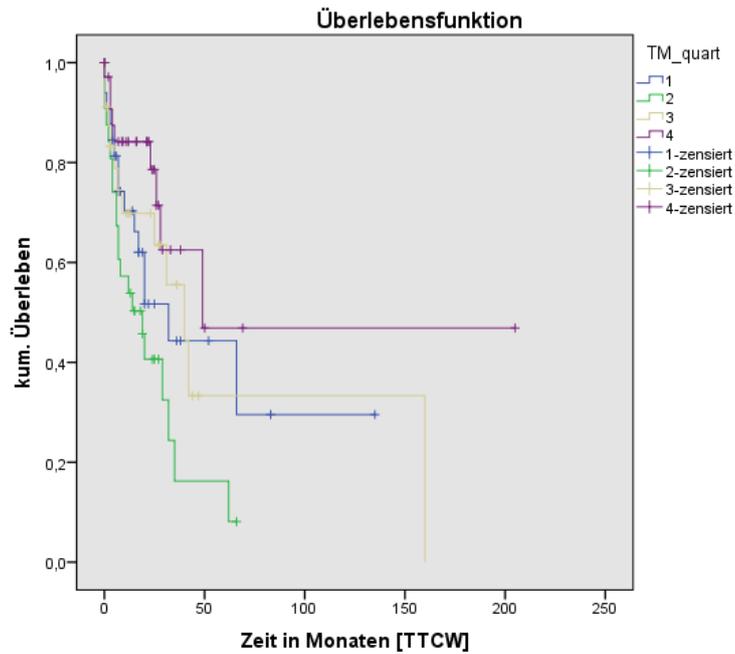


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung der TM-Quartile

4.2.6 Cox-Regressionsanalyse aller PH-Patienten

Die Cox Regression für die TM Messungen zeigt ein HR von 1,10 (95% CI 0,7-1,719; $p=0,686$). Pro Anstieg des logarithmierten TM-Wertes um eine Einheit steigt das Risiko zu versterben um 9,7% (s. Abb. 25). Im Interquartil-Vergleich zeigen sich HR von 0,791 (1. gegen 4. Quartil), 0,920 (2. gegen 4. Quartil) und 0,772 (3. gegen 4. Quartil) mit jeweils nicht signifikantem p . Es können keine wesentlichen Unterschiede im Überleben zwischen den einzelnen TM-Quartilen festgestellt werden ($p= 0,962$) (s. Abb. 26).

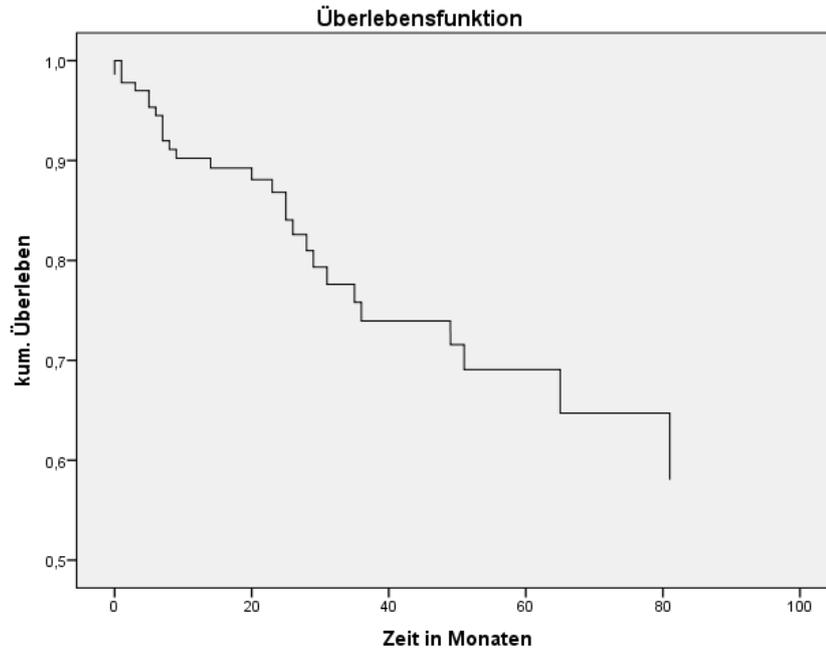


Abbildung 25: Cox-Regression - Überleben aller Patienten mit PH

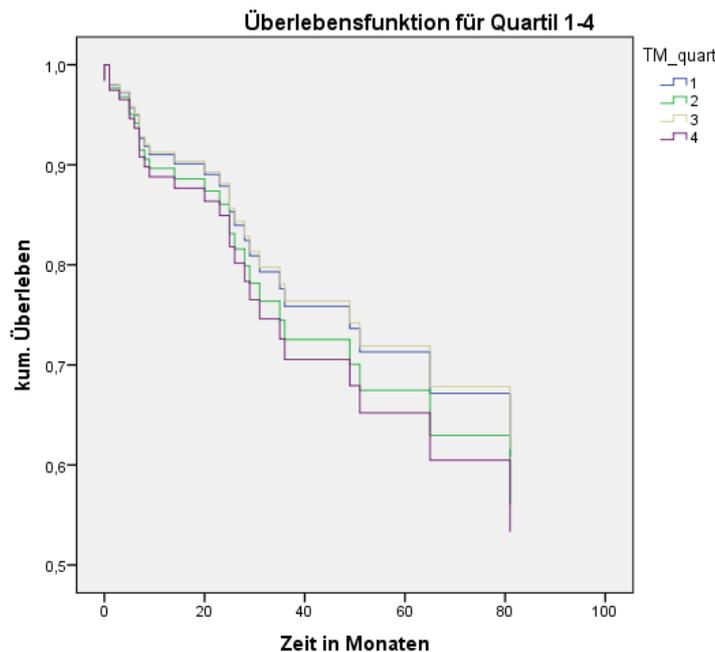


Abbildung 26: Cox-Regression - Überleben für die TM-Quartile

4.2.6.1 Cox-Regressionsanalyse – Time to clinical worsening

Für die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung zeigt sich mit einem HR von 0,806 (95% CI 0,608 - 1,070; $p=0,136$) keine Signifikanz. Pro Abfall des logarithmierten TM-Plasmaspiegels um eine Einheit, steigt das Risiko für eine klinische Verschlechterung um 19,4% (s. Abb.27). Im Vergleich gegeneinander zeigen die einzelnen Quartile ein HR von 1,81 für das erste gegen das vierte Quartil (95% CI 0,83-3,97, $p=0,14$), 2,69 für das zweite gegen das vierte Quartil (95% CI 1,26-5,74, $p=0,010$) und 2,032 (95% CI 0,9-4,59, $p=0,09$) für das dritte gegen das vierte Quartil. Es zeigt sich, dass zwischen

dem zweiten und dem vierten Quartil pro Anstieg des LN-TM die Wahrscheinlichkeit für eine klinische Verschlechterung mehr als doppelt so hoch ist (s. Abb. 28).

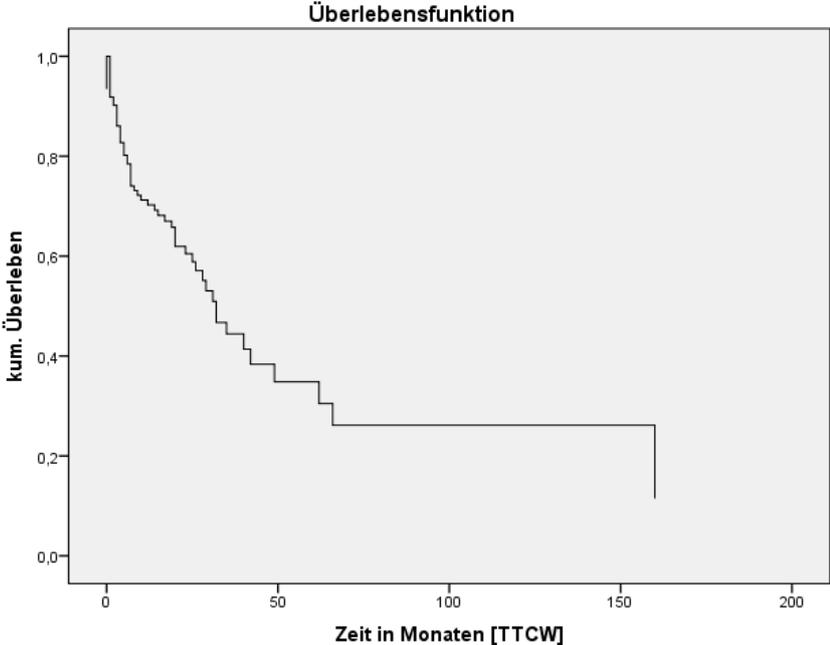


Abbildung 27: Cox-Regression für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung aller Patienten mit PH

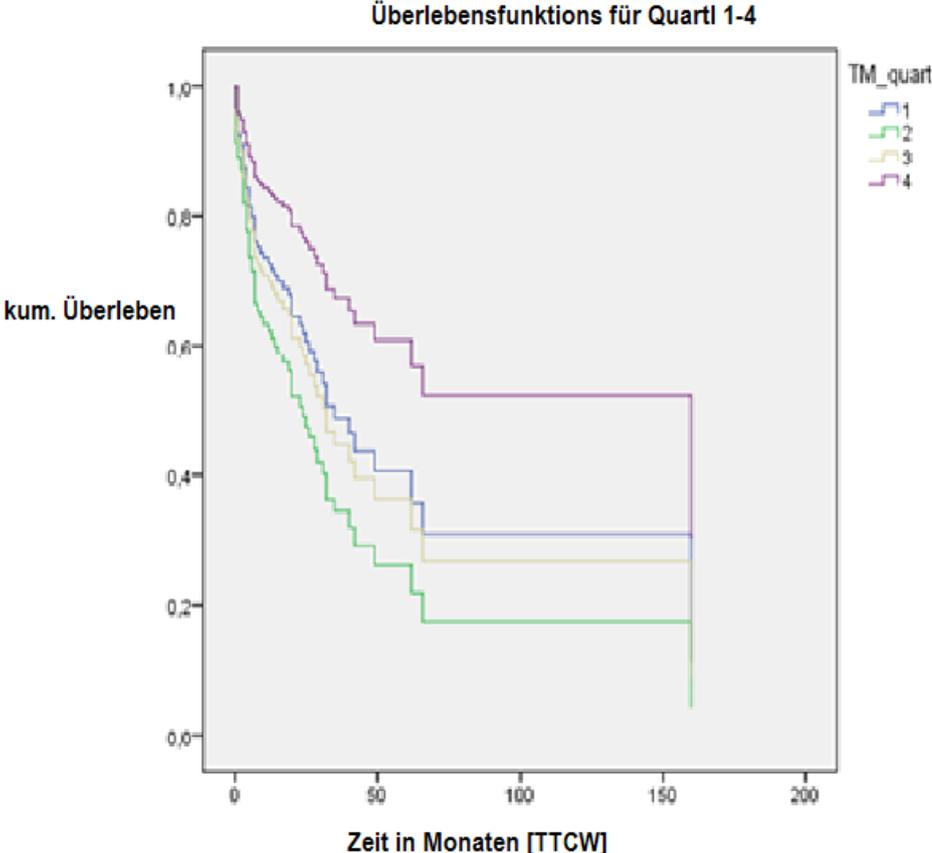


Abbildung 28: Cox-Regression für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für die TM-Quartile

4.2.7 Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse

Auch in der TM-Versuchsreihe wird durch die multivariaten Analysen die Aussagekraft des TM-Plasmaspiegels als Überlebensmarker mit bereits etablierten Parametern (PVR, 6-MWT, Geschlecht und NYHA-Stadien) verglichen. In der univariaten Cox-Regression zeigt sich der LN-TM als nicht signifikanter Marker für das Überleben. Auch in der multivariaten Analyse kann sich der LN-TM nicht als signifikanter Prädiktor festigen. Tabelle 14 – 16 stellt die uni-und-multivariate Cox-Regressionsanalyse dar.

Tabelle 14: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse (PVR, Geschlecht)

LN-TM: Logarithmierter TM-Wert, HR: Hazard Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Variable	Einzelanalyse		Multianalyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN-TM	1,09 (0,7-1,719)	0,686	1,232 (0,758-2,002)	0,399
PVR			1,001 (1,000-1,001)	0,161
Geschlecht			1,720 (0,768-3,852)	0,187

Tabelle 15: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus 6-MWT

LN-TM: Logarithmierter TM-Wert, HR: Hazard Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Variable	Einzelanalyse		Multianalyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN-TM	1,09 (0,7-1,719)	0,686	1,348 (0,789-2,304)	0,275
PVR			1,001 (1,000-1,002)	0,100
Geschlecht			1,337 (0,491-3,640)	0,569
6-MWT			0,991 (0,986- 0,996)	0,000

Tabelle 16: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus NYHA-Stadien

LN-TM: Logarithmierter TM-Wert, HR: Hazard Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Variable	Einzelanalyse		Multianalyse	
	HR (95% CI)	Sig.	HR (95% CI)	Sig.
LN-TM	1,09 (0,7-1,719)	0,686	1,248 (0,732-2,128)	0,415
PVR			1,001 (1,000-1,002)	0,294
Geschlecht			1,016 (0,339-3,051)	0,977
6-MWT			0,992 (0,987-0,997)	0,002
NYHA II			Referenz	0,038
NYHA III			0,559 (0,120-2,594)	0,457
NYHA IV			0,235 (0,074-0,746)	0,014

Für die einzelnen Ätiologien der PH lassen sich ebenfalls keine signifikanten p-Werte für den logarithmierten TM-Plasmaspiegel als Überlebensprädiktor feststellen (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Univariate Cox-Regression – Überleben LN-TM für die einzelnen Ätiologien

LN-TM: Logarithmierter TM-Wert, HR: Hazard Ratio, 95% CI: 95-%iges Konfidenzintervall, Sig.: Signifikanz

Ätiologien	HR (95% CI)	Sig.
IPAH	4,083 (0,653-25,529)	0,132
CVD	1,091 (0,624-1,908)	0,760
CTEPH	1,202 (0,292-4,951)	0,799
PVH	0,512 (0,116-2,260)	0,377

4.2.8 Einzelgruppenanalyse

4.2.8.1 IPAH-Patientenkollektiv

Das IPAH-Kollektiv umfasst 39 Patienten, wovon 26 weiblich (66,6%) und 13 männlich (33,3%) sind. 14 Patienten (35,9%) befinden sich im NYHA-Stadium II, 22 (56,4%) sind im Stadium III und dem Stadium IV sind 3 Patienten (7,7%) zugeordnet. Die hämodynamischen Parameter des Kollektivs sind in Tabelle 11 aufgeführt. In der IPAH-Gruppe reichen die TM-Plasmakonzentrationen von 0,2 bis 5,725 ng/ml. Der Median beträgt 2,29 ng/ml (IQR 1,81 ng/ml). Nach Logarithmierung beträgt der Mittelwert \pm SD 0,689 \pm 0,806 ng/ml. Die Varianzanalysen zeigen weder zwischen den einzelnen funktionellen Klassen ($p=0,677$), noch zwischen den Geschlechtern ($p=0,670$) signifikante Differenzen in den logarithmierten TM-Konzentrationen. In den Korrelationen mit den hämodynamischen Parametern zeigen sich für den mPAP mit einem Koeffizienten von -0,363 ($p=0,023$), für den PVR mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,559 ($p=0,0002$) als auch für das HZV mit einem Koeffizienten von 0,334 ($p=0,038$) signifikante Zusammenhänge (s. Abb. 29-31). Die Mortalitätsanalyse wird mit allen 39 Patienten durchgeführt. 6 Patienten (15,4%) versterben im Beobachtungszeitraum. Das 1-,3- und 5-Jahresüberleben liegt bei 94,8%, 81,9% und 81,9%. Das durchschnittliche Überleben im IPAH-Kollektiv liegt bei 150 Monaten (95% CI 129-171 Monate). Im Log-Rank-Test zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Mortalität zwischen den TM-Quartilen ($p=0,547$). In der Cox-Regression zeigt sich ein nicht signifikantes Hazard Ratio von 4,084 (95% CI 0,653-25,529; $p=0,132$).

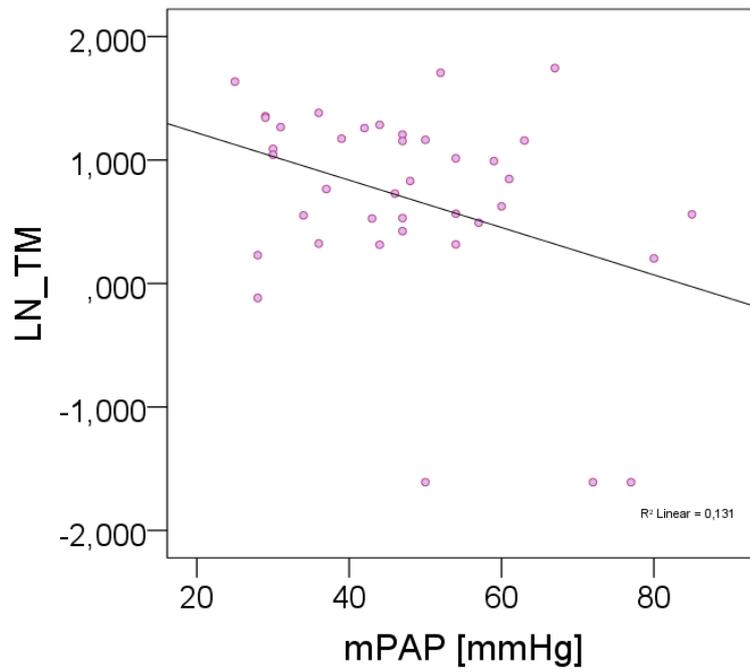


Abbildung 29: Korrelation zwischen log. TM-Konzentrationen und mPAP (nur IPAH)

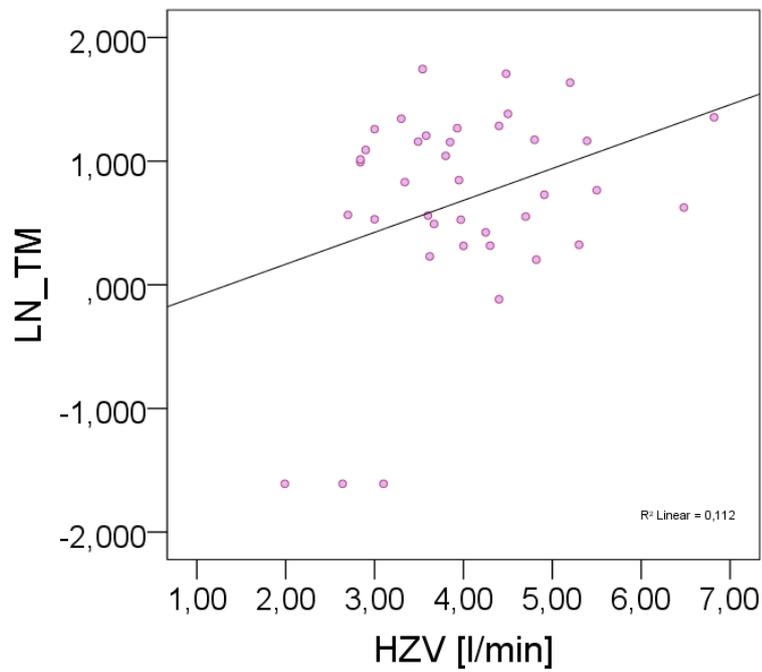


Abbildung 30: Korrelation zwischen log. TM-Konzentrationen und HZV (nur IPAH)

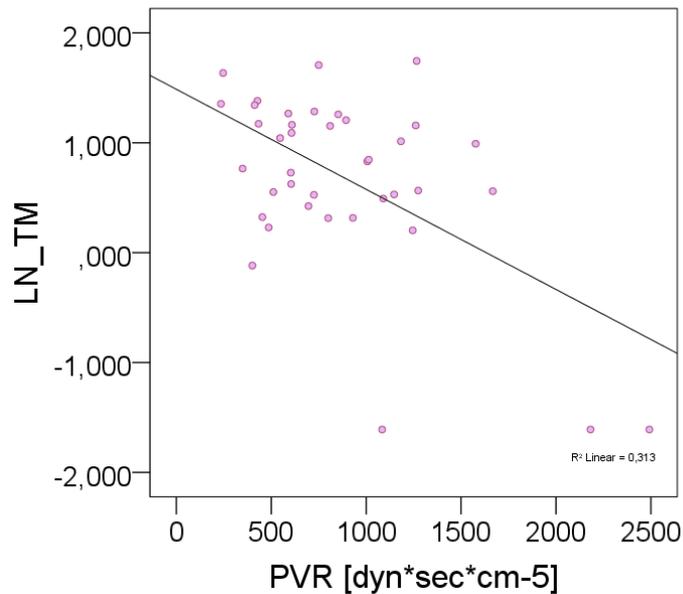


Abbildung 31: Korrelationen zwischen log. TM-Konzentrationen und PVR (nur IPAH)

4.2.8.2 CVD-Patientenkollektiv

Das CVD-Kollektiv enthält 39 Patienten. Davon sind 31 weiblichen (79,5%) und 8 männlichen Geschlechts (20,5%). 7 Patienten (17,9%) sind der NYHA-Klasse II zugeordnet, 19 Patienten (48,7%) der Klasse III und weitere 13 Patienten (33,3%) werden der Klasse IV nach NYHA zugeteilt. Alle hämodynamischen Parameter des Kollektivs sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Spannweite der TM Konzentrationen reicht im CVD-Kollektiv von 0,2 bis 6,911 ng/ml. Der Median beträgt 2,11 ng/ml (IQR 2,00 ng/ml). Nach Logarithmierung zum Erhalt einer Normalverteilung ergibt sich für den Mittelwert \pm SD ein Wert von $0,666 \pm 0,831$. In Varianzanalyse mit den logarithmierten TM-Plasmaspiegel lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den funktionellen Klassen darstellen ($p=0,416$). Auch zwischen den Geschlechtern ist kein Unterschied feststellbar ($p=0,328$). Die Korrelationen zwischen logarithmiertem TM-Plasmaspiegel und den hämodynamischen Parametern stellt sich für keinen der Werte signifikant dar. In die Mortalitätsanalyse werden 39 Patienten miteinbezogen. Es versterben 16 (41%) von ihnen im festgelegten Beobachtungszeitraum. Das 1-Jahresüberleben in der CVD-Gruppe beträgt 82,9%, die 3- bzw. 5-Jahresüberlebensrate ist 59,2% und 47,4%. Die durchschnittliche Überlebensdauer in der CVD-Gruppe sind 78 Monate (95% CI 47-110 Monate). Im Log-Rank-Test zeigen sich in der CVD-Gruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Überlebens bezogen auf die TM-Quartile ($p=0,378$). Die sich anschließende Cox-Regression ist ebenfalls mit einem Hazard Ratio von 1,091 nicht signifikant (95% CI 0,624-1,908; $p=0,760$).

4.2.8.3 CTEPH-Patientenkollektiv

Die CTEPH-Gruppe besteht aus 36 Patienten, von denen 15 weiblich (41,7%) und 21 männlich (58,3%) sind. 11 Patienten (30,5%) befinden sich im NYHA-Stadium II, 21 Patienten (58,3%) im Stadium III und 4 Patienten (11,1%) sind im NYHA-Stadium IV. Die Hämodynamik des CTEPH-Kollektivs findet sich in Tabelle 11. Die Plasmakonzentrationen von TM reichen von 0,2 bis 6,007 ng/ml. Der Median beträgt in diesem Kollektiv 2,55 ng/ml (IQR 2,15 ng/ml). In der logarithmierten Verteilung beträgt der Mittelwert $0,74 \pm 0,72$. In der durchgeführten Varianzanalyse zeigen sich keine Unterschiede in den logarithmierten TM-Konzentrationen zwischen den funktionellen Klassen ($p=0,797$). Allerdings zeigt sich zwischen den Geschlechtern eine signifikant unterschiedliche Plasmakonzentration von TM ($p=0,03$) (s. Abb. 32). In den Pearson-Korrelationen lassen sich zwischen den logarithmierten TM-Konzentrationen und den hämodynamischen Parametern keine signifikanten Zusammenhänge darstellen. In die Mortalitätsanalyse gehen in dieser Subgruppe 35 Patienten ein. Von diesen versterben 4 Patienten (11,4%). Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben stellt sich mit 89,8%, 67,3% und 67,3% dar. Das mittlere Überleben beträgt 146 Monate (95% CI 79-213 Monate). Der Interquartil-Vergleich mittels Log-Rank-Test für die Mortalität bezogen auf die logarithmierten TM-Plasmaspiegel ist nicht signifikant ($p=0,108$). Die Cox-Regression ist mit einem Hazard Ratio von 1,202 ist ebenfalls nicht signifikant (95% CI 0,292-4,951; $p=0,799$). Die Vergleiche der Quartile untereinander zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Überlebens in der Cox-Regressionsanalyse.

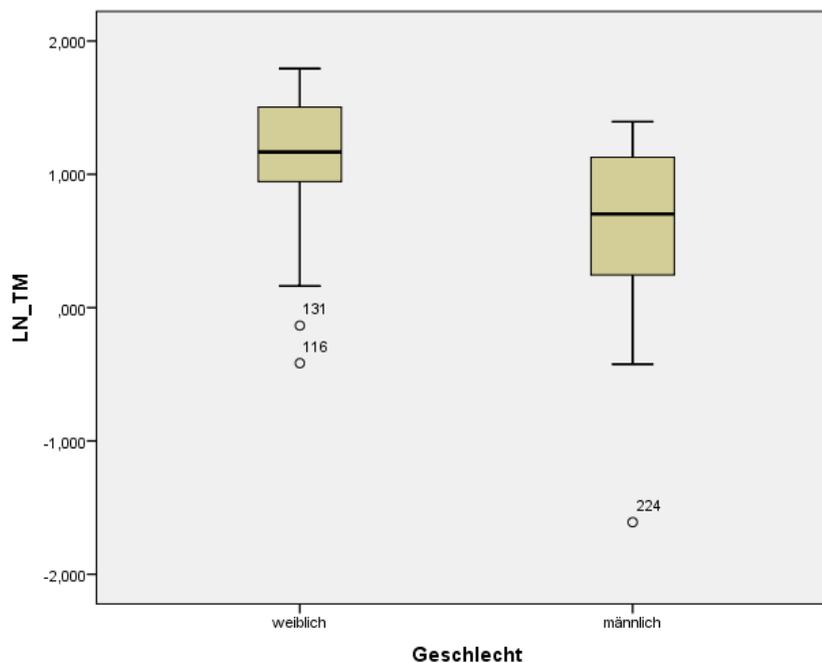


Abbildung 32: Boxplot-Darstellung der log. TM-Plasmaspiegel für die Geschlechter (CTEPH)

4.2.8.4 PVH-Patientenkollektiv

Die PVH-Gruppe besteht aus 28 Patienten. Von ihnen sind 17 weiblich (60,7%), 11 sind männlich (39,3%). 12 der Patienten (42,8%) gehören in die NYHA-Klasse II, 13 Patienten (46,4%) sind in Klasse III und 3 Patienten (10,8%) gehören dem Stadium IV an. Alle relevanten hämodynamischen Parameter finden sich in Tabelle 11. Die Spannweite der TM-Werte reicht von 0,2 bis 6,78 ng/ml. Der Median beträgt 2,91 ng/ml (IQR 2,63 ng/ml). Nach Logarithmierung beträgt er $0,92 \pm 0,87$. Die Varianzanalyse ergibt im PVH-Kollektiv keine signifikanten Unterschiede in den logarithmierten TM-Konzentrationen zwischen den funktionellen Klassen ($p=0,344$). Gleiche Aussage gilt für einen Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p=1,0$). Allerdings kann in der Korrelationsanalyse zwischen dem 6-MWT und dem logarithmierten TM-Plasmaspiegel mit einem Koeffizienten von $-0,50$ ($p=0,027$) ein signifikanter Zusammenhang dargestellt werden (s. Abb. 33). In der Mortalitätsanalyse werden 28 Patienten betrachtet. Ein Patient (3,5%) verstirbt im Beobachtungszeitraum. Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben beträgt 94,7%. Die mittlere Überlebenszeit in diesem Kollektiv beträgt 47 Monate (95% CI 42-52 Monate). Im Vergleich zeigen sich keine signifikanten Differenzen im Überleben zwischen den einzelnen TM-Quartilen ($p=0,149$). In der anschließenden Cox-Regression stellt sich ein nicht signifikantes HR von 0,512 dar (95% CI 0,116-2,260; $p=0,377$).

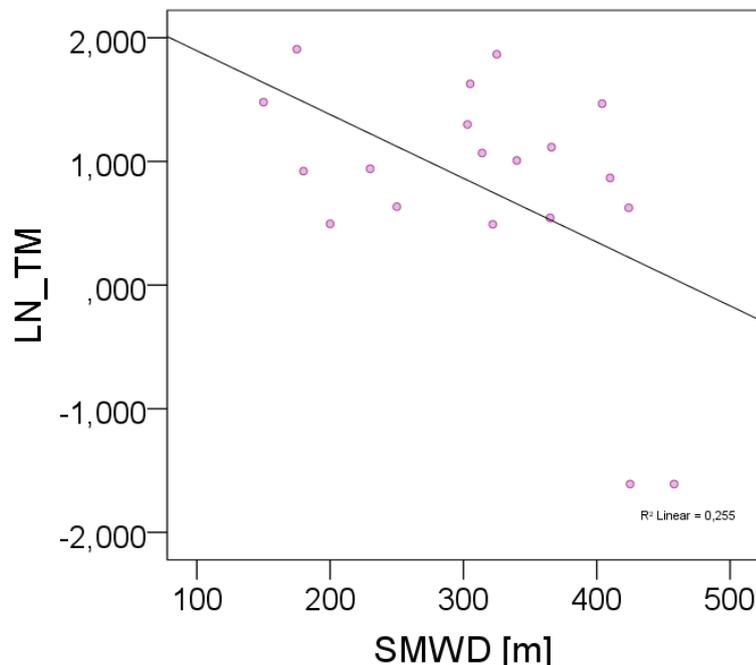


Abbildung 33: Korrelation zwischen den log. TM-Konzentrationen und 6-MWT (nur PVH)

5 Diskussion

In dieser Arbeit wird die Fragestellung untersucht, ob MCP-1 und TM als diagnostischer bzw. prognostischer Marker in der Diagnostik bzw. im klinischen Verlauf der PH eine Rolle spielen könnten. Beide Marker sind in der Literatur bereits bei Patienten mit PH als beschrieben worden [117][120][124]. MCP-1 und TM werden hinsichtlich ihrer Konzentration im Blutplasma und Korrelation zur Hämodynamik sowie ihres Potentials als Mortalitätsprädiktor und diagnostischer Marker untersucht. Mittels MCP-1 konnten wir weder diagnostische Aussagen, noch Diskriminierung zwischen den Schweregraden der PH-Erkrankung machen. Auch als prognostischer Marker für Mortalität bzw. die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung zeigt sich in der univariaten Analyse keine richtungsweisende Aussagekraft. Allerdings korreliert in der multivariaten Cox-Regression der LN-MCP-1 als zweitstärkster Faktor (nach dem 6-MWT) mit dem Überleben und zeigt prognostischen Wert. Auch in der Einzelgruppenanalyse stellt sich in der IPA-H-Gruppe der LN-MCP-1 als signifikanter Überlebensmarker heraus.

Für TM lassen sich in unseren Analysen keine diagnostischen Eigenschaften darstellen. Eine Korrelation mit dem Schweregrad der PH ist ebenfalls nicht nachweisbar. Allerdings kann TM als prognostischer Marker für die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung herangezogen werden, wobei Patienten mit hohen TM-Spiegeln, die längste ereignisfreie Zeit aufweisen. Es zeigen sich auch im IPA-H-Kollektiv relevante Zusammenhänge zwischen der Höhe des TM-Spiegels und den etablierten hämodynamischen Faktoren wie PVR, HZV und mPAP.

5.1 Diskussion der MCP-1-Datenauswertung

Für MCP-1 konnte zwischen den Gruppen „an PH erkrankt“ und „nicht an PH erkrankt“ keine signifikante Differenz im Plasmaspiegel festgestellt werden. Zwischen der CVD- und IPA-H-Gruppe zeigten sich allerdings signifikant unterschiedliche MCP-1-Plasmaspiegel ($p=0,005$). Im Vergleich zu den bis jetzt veröffentlichten Daten zu MCP-1 als Marker in PH, wurden in unseren Analysen als Kontrollgruppe absichtlich kein vollkommen gesundes Patientenkollektiv genutzt. In den Arbeiten von Itoh et al., Hashimoto et al., Bakouboula et al. sowie Cella et al. wurden jeweils die MCP-1-Plasmaspiegel von PH-Patienten mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen [124][125][126][120]. Hier zeigten Itoh et al. in der Gegenüberstellung zwischen einem vollkommen gesunden Kontrollkollektiv (13 Kontrollen) mit IPA-H-Patienten (28 Patienten) und CVD-Patienten (7 Patienten), dass eine Differenzierung mittels MCP-1-Plasmaspiegeln, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung möglich ist. Die höchsten

MCP-1-Spiegel zeigten sich in ihren Analysen bei Patienten mit PH aufgrund von CVD [124]. Diese Ergebnisse decken sich mit unserer Datenauswertung. Bei uns wiesen die Patienten in der CVD-Gruppe ebenfalls die höchsten MCP-1-Spiegel auf, wobei nur zum IPAH-Kollektiv eine statistisch signifikante Differenz nachgewiesen werden konnte. Auch Hashimoto et al. konnten zwischen Patienten mit IPAH (16 Patienten) und einem gesunden Kontrollkollektiv (16 Patienten) signifikante Unterschiede in dem MCP-1-Level feststellen, wobei die Höhe des MCP-1-Spiegels auch mit steigendem NYHA-Stadium korrelierte. Eine Therapie mit Epoprostenol konnte die Spiegel von MCP-1 in der PH-Gruppe signifikant reduzieren [125]. Mit den Daten von Cella et al. konnten ebenfalls signifikant unterschiedliche MCP-1-Plasmakonzentrationen zwischen einer gesunden Kontrollgruppe (18 Kontrollen) und Patienten mit PH aufgrund von Kollagenosen (18 Patienten) festgestellt werden [120]. Dass in unsere Arbeit keine signifikant erhöhten MCP-1-Level der PH-Gruppen (111 Patienten) zu dem Ausschlusskollektiv (36 Patienten) festgestellt wurden, mag vor allem daran liegen, dass die Patienten mit Ausschluss einer PH in unserem Kollektiv andere Erkrankungen aufweisen. Von den 36 Patienten der MCP-1-Ausschlussgruppe sind 47,2% anderweitig pulmonal, 36,1% kardiologisch sowie 8,3% an einem thrombembolischen Ereignis bzw. 8,3% an einer Kollagenose vorerkrankt. Da erhöhte MCP-1-Konzentrationen ein generelles Indiz für chronische Gefäßentzündung und Umbauprozesse sind, könnte dies ein Grund für die fehlenden Unterschiede in den Plasmaspiegeln der PH- und Nicht-PH-Gruppe sein [106]. In unsere Arbeit wurden neben der IPAH- und CVD-Gruppe auch Patienten mit CTEPH bzw. PVH miteinbezogen. Jedoch konnte nur für die CVD-Gruppe verglichen mit der IPAH-Gruppe ein signifikanter Unterschied dargestellt werden. Auch bei Patienten mit systemischer Sklerose ohne PH, sowie Patienten mit SLE konnten signifikant erhöhte MCP-1-Spiegel nachgewiesen werden [127][128]. Dementsprechend scheint MCP-1 besonders in der Pathogenese von Kollagenosen ein wichtiger Marker zu sein. Daraus resultierend könnte MCP-1 vor allem in der Diagnostik von PH aufgrund von CVD eine Rolle spielen. Allerdings wurde in der CVD-Gruppe kein Hinweis auf einen Nutzen von MCP-1 als Prognose- bzw. klinischer Verlaufsmarker gefunden. Weder zwischen den NYHA-Stadien noch in der Analyse für die TTCW und das Überleben konnten Unterschiede zwischen den MCP-1-Quartilen nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen, in Hinblick darauf, ob sich die MCP-1-Spiegel im Krankheitsverlauf oder im Rahmen einer Therapie in einer CVD-Gruppe verändern, könnten weiteren Aufschluss über die Wertigkeit von MCP-1 auch als prognostischen Marker in dieser Unterform der PH bieten. Cella et al. konnten in ihrer CVD-Patientengruppe durch eine *Bosentan*-Therapie jedoch keine signifikanten Veränderungen in den MCP-1-

Plasmakonzentrationen nachweisen [120]. Eine generelle Differenzierung zwischen dem CVD-Kollektiv und den restlichen PH-Entitäten ist mit unseren Ergebnissen nicht reproduzierbar. Auch zwischen weiblichen und männlichen Patienten oder zwischen den einzelnen NYHA-Klassen konnten keine Unterschiede im MCP-1-Plasmaspiegel aufgewiesen werden. Zur Subspezifizierung zwischen anderweitig vorkranken Patienten und PH-Patienten ist MCP-1 in unseren Analysen also nicht anwendbar. Unter anderem mag dies auch daran liegen, dass die Patienten in unserem Kollektiv durchschnittlich $63,8 \pm 13,9$ Jahre alt waren, wohingegen die Patienten bei Hashimoto et al. ein Durchschnittsalter von 32 ± 3 Jahre aufwiesen. Im Patientenkollektiv von Itoh et al. betrug das Durchschnittsalter 35 bzw. 42 Jahre. Das erhöhte Durchschnittsalter (und folgende Komorbiditäten) in unserem Patientenkollektiv könnte ein weiterer Grund für die auch im Ausschlusskollektiv erhöhten MCP-1-Werte sein. Insgesamt scheint die Spannweite der MCP-1-Plasmaspiegel auch in gesunden Probanden relativ breit zu sein. Während Hashimoto et al. im gesunden Kontrollkollektiv einen durchschnittlichen MCP-1-Spiegel von $119,6 \pm 6,9$ pg/ml und Itoh et al. von 91 ± 5 pg/ml nachwies, zeigt sich bei Bakouboula et al. ein Mittelwert von $209,6 \pm 228$ pg/ml (vergl. Tab. 18) [124][125][126]. Der höchste Mittelwert von $239,04 \pm 142,00$ pg/ml (Median 193,33 pg/ml) stellt sich allerdings in unserem Ausschlusskollektiv dar. Während MCP-1 als diagnostischer Marker zwischen gesunden Kontrollen und IPAH-Patienten genutzt werden konnte, scheint die Sensitivität von MCP-1 zur Differenzierung zwischen PH-Patienten und nicht vollkommen gesunden Patienten gering zu sein. Auffällig ist hierbei auch, dass die durchschnittlichen MCP-1-Plasmaspiegel unseres Ausschlusskollektives höher sind, als die der IPAH-Gruppe (vergl. Tab. 18). Dies ist wohl vor allem darauf zurückzuführen, dass die Patienten der Ausschlussgruppe in ihrem hämodynamischen Profil gegenüber den IPAH-Patienten kaum weniger eingeschränkt sind. Im 6-MWT zeigt das Ausschlusskollektiv kürzere Gehstrecken als das IPAH-Kollektiv, auch der PAWP war im Ausschlusskollektiv höher als in der IPAH-Gruppe (vergl. Tab. 18). Festzuhalten ist, dass MCP-1 in unserem Kollektiv auch in der Ausschlussgruppe stark erhöht ist und dementsprechend kein sensitiver Marker zur Unterscheidung der PH-Patienten gegenüber anderweitig pulmonal, kardial oder thrombembolisch vorerkrankter Patienten ist.

Tabelle 18: Vergleich der Absolut-Werte der MCP-1-Messungen

Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung in pg/ml, (Median; Interquartilabstand in pg/ml)

Autoren	Probenmaterial	Gesundes Ausschlusskollektiv	Krankes Ausschlusskollektiv	PAH/IPAH Gruppe	CVD-Gruppe
Hashimoto et al.	Serum	119,6 \pm 6,9		265.6 \pm 29.5	
Itoh et al.	Plasma	91 \pm 5		253 \pm 24	536 \pm 90
Cella et al.	Plasma	141.5 \pm 31.2			243.16 \pm 140.2
Bakouboula et al.	Plasma	209,6 \pm 142		413,6 \pm 237	
Unsere Daten	Plasma		239,04 \pm 142 (193,33)	223,9 \pm 166 (172,6; 867)	425,12 \pm 445 (285; 296)

Im Pearson-Test zeigte sich in der Analyse des Gesamtkollektivs für MCP-1 zu keinem der hämodynamischen Parameter (6-MWT, mPAP, PVR, PAWP, HZV, CI) eine Korrelation. Auch in der Subgruppenanalyse finden sich zwischen MCP-1 und den hämodynamischen Parametern keine Zusammenhänge. Itoh et al. hingegen konnten zwischen den NYHA-Stadien und MCP-1-Spiegeln eine schwache Korrelation festmachen ($r=0.39$, $p=0.05$), wobei bei der geringen Anzahl der Patienten (5 in Stadium II, 7 in Stadium III, 4 in Stadium IV) die Beurteilbarkeit sicherlich eingeschränkt ist [124].

In der Kaplan-Meier-Analyse in Hinsicht auf die Biomarker-Konzentration von MCP-1 kann im Gesamtkollektiv kein Unterschied im Überleben zwischen den einzelnen Quartilen festgestellt werden ($p=0,179$). Allein im IPAH-Kollektiv zeigt sich ein signifikanter Überlebensunterschied zwischen den logarithmierten MCP-1-Quartilen ($p=0,023$). Hier geht mit hohen MCP-1-Spiegeln die kürzeste Überlebenszeit der Patienten einher. Auch bei Sepsispatienten präsentiert sich MCP-1 als signifikanter Überlebensmarker. Der MCP-1-Plasmaspiegel konnte sogar zwischen mittellangem- und Langzeit-Überleben bei Patienten mit Sepsis differenzieren [129]. Am Beispiel des Herzversagens zeigte sich MCP-1 allerdings nicht als ein klinisch verwertbarer Biomarker. Mittels MCP-1 ließ sich keine suffiziente Prognoseabschätzung erlangen [130]. Unser Ergebnis ist aufgrund der kleinen Fallzahlen pro Quartil (7 bis maximal 12 Patienten) und auch aufgrund der starken Diskrimination hinsichtlich Krankheitsentitäten zur Sepsis kritisch zu betrachten. Insgesamt wäre zu überlegen,

MCP-1-Plasmalevel zumindest bei IPAH-Patienten als Mortalitätsmarker weiter zu verfolgen.

Der Vergleich der logarithmierten MCP-1-Konzentrationen in Hinsicht auf die Zeit bis zur Therapieausweitung zeigte keine Zeitdifferenzen ($p=0,238$). Die Literaturrecherche ergibt hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen MCP-1 und der Zeit bis zur klinischen Verschlechterung wenig vergleichbare Daten. Fontes et al. verglichen 2013 Marker für CVD, darunter MCP-1, mit dem klinischen Verlauf ihrer Patienten. Insgesamt zeigte sich MCP-1 in dieser Studie als relativ schwacher Marker für den klinischen Zustand. MCP-1 korrelierte neben vielen getesteten Werten, nur mit einem erhöhten BMI-Wert [131]. Auch in unsere Ergebnisse kann MCP-1 nicht als geeigneter Marker für die Schwere der PH-Erkrankung bzw. deren Therapieeskalationsrisiko genutzt werden.

Die univariaten Cox-Regressionsanalyse für MCP-1 ergibt, dass pro Anstieg des logarithmierten MCP-1-Wertes um eine Einheit das Risiko zu versterben um 58% steigt. Mit einem nicht signifikanten p-Wert eignet sich der logarithmierte Wert der MCP-1-Konzentration allerdings nur begrenzt als relevanter Prädiktor für das Überleben. Auch im Interquartil-Vergleich lassen sich keine Unterschiede in der Überlebenszeit feststellen. Das Überleben im vierten Quartil ist zwar kürzer als das der ersten drei Quartile, allerdings nicht so markant, dass es sich als Überlebensprädiktor eignen würde. In der multivariaten Analyse hingegen zeigt sich der LN-MCP-1 als signifikanter Marker für das Überleben ($p=0,042$; $0,037$; $0,027$). Nur der 6-MWT ist als Vorhersagewert für das Überleben noch aussagekräftiger. Auch in der IPAH-Gruppe zeigt die Cox Regressions-Analyse für die Quartile signifikante Unterschiede im Überleben ($p= 0,023$). Daten zur Mortalitätsprognose mittels MCP-1 für die PH liegen nach aktuellen Recherchen nicht vor. In Studien bezüglich der Risiko- und Mortalitätsvorhersage für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen mittels MCP-1 gibt es unterschiedliche Daten. Hoogeveen et al. fanden bei Patienten mit pAVK (209 Patienten) erhöhte MCP-1-Spiegel verglichen mit einem Kontrollkollektiv (733 Kontrollen). Allerdings konnte mittels MCP-1 für die pAVK keine relevante Mortalitätsprognose vorgenommen werden [132]. Für Patienten mit akutem Koronarsyndrom (2270 Patienten) konnten de Lemos et al. signifikant veränderte MCP-1-Spiegel im Vergleich mit einem Kontrollkollektiv (279 Kontrollen) nachweisen. Außerdem konnten mittels MCP-1 eine signifikante Risikoabschätzung bezüglich des Mortalitätsrisikos getroffen werden. Patienten mit den höchsten MCP-1-Werten zeigten das höchste Risiko zu versterben (HR, 1.43; 95% CI, 0.89 - 2.31; $P=0.13$) [133]. In unseren Analysen hält der Vorhersagewert durch MCP-1 der multivariaten Analyse

Stand und scheint somit auch für die PH als Mortalitätsprädiktor in Frage zu kommen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse der Einzelgruppenanalyse. Im IPAH-Kollektiv zeigt die Cox-Regression mit einem HR von 3,421 (95% CI 1,06-11,03; $p=0,039$), dass pro Anstieg des logarithmierten MCP-1-Wertes die Wahrscheinlichkeit zu versterben um das 3,4-fache steigt. Hier kann auch im Interquartil-Vergleich ein signifikanter Unterschied in der Cox-Regression ($p=0,046$) nachgewiesen werden. Im IPAH-Kollektiv zeigt sich also der Trend, dass erhöhte MCP-1-Plasmaspiegel mit einer verkürzten Überlebenszeit einhergehen. Ob Patienten mit erhöhtem MCP-1-Spiegel unter Umständen ein höheres Mortalitätsrisiko aufweisen, müsste vor allem für IPAH-Patienten in einer größeren Studienpopulation überprüft werden. Auch die Inhibierung des MCP-1-Signalweges könnte ein nächster analytischer Schritt zur Verifizierung unserer Ergebnisse sein. Veränderungen im MCP-1-Spiegel könnten im Krankheitsverlauf ein Hinweis auf die Verschlechterung, vor allem der IPAH-Patienten sein. Mittels dieses Prognosemarkers wäre es dann ggf. möglich, die Therapie frühzeitig und effektiv umzustellen.

Die Cox-Regression für die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung ergibt im MCP-1-Kollektiv ein HR von 1,23 (95% CI 0,866-1,762; $p=0,244$). Dementsprechend steigt pro Anstieg des logarithmierten MCP-1-Wertes das Risiko eine klinische Verschlechterung zu erleiden um 23%. Auch in einer Studie von Cheng et al. korrelieren bei KHK-Patienten erhöhte MCP-1-Plasmaspiegel mit stärkerer Koronarskleroselast und gehen dementsprechend auch mit einer kürzeren ereignisfreien Zeit einher [134]. Unter der Annahme, dass hohe MCP-1-Plasmaspiegel mit gesteigertem Einbau von glatten Muskelzellen in die Neointima von Pulmonalgefäßen und somit einem fortgeschrittenen Stadium der PH einhergehen, könnte MCP-1 auch als zusätzlicher Marker für den klinischen Verlauf in Erwägung gezogen werden [95].

5.2 Diskussion der TM-Datenauswertung

Für die TM-Messungen stellt sich ein ähnliches Bild wie bei den MCP-1-Messungen dar. Es konnte weder zwischen den PH-erkrankten und den nicht an PH-erkrankten Patienten eine Differenz in den Plasmakonzentrationen noch zwischen den einzelnen PH-Ätiologien festgestellt werden. Unsere Ergebnisse decken sich mit der Veröffentlichung von Cella et al., die ebenfalls keinen Unterschied in den TM-Plasmaspiegeln zwischen einer CVD-Gruppe (18 Patienten) und einem gesunden Kontrollkollektiv (18 Kontrollen) feststellen konnten [120]. Insgesamt gibt es aber einige Studien, in denen erniedrigte TM-Spiegel bei Patienten mit PH verschiedener Ätiologien nachgewiesen werden konnten. Tournier et al. stellten bei Patienten mit

IPAH (16 Patienten) signifikant niedrigere TM-Plasmaspiegel fest als in einem gesunden Kontrollkollektiv (26 Kontrollen). Ebenso konnten Sakamaki et al. niedrigere TM-Plasmaspiegel bei einer IPAH-Gruppe (32 Patienten), PVH-Gruppe (31 Patienten) und bei Patienten mit sekundärer PH (25 Patienten) verglichen mit gesunden Kontrollen (17 Kontrollen) nachweisen. Sakamaki et al. zeigten auch, dass sich der Plasma-TM-Spiegel unter der Therapie mit *Prostazyklin* signifikant erhöhen ließ [135] [117]. Welsh et al. dokumentierten für eine IPAH-Gruppe (12 Patienten) signifikant niedrigere TM-Spiegel als in einer Kontrollgruppe (14 Kontrollen) und einer Gruppe von Patienten mit sekundärer PH (25 Patienten) [136]. Tabelle 19 fasst die Werte der TM-Messungen dieser Veröffentlichungen zusammen. Auch hier ist die Spannweite der TM-Plasmaspiegel relativ breit. Insgesamt scheint auch in diesem Kollektiv ein Grund für die fehlende Diskrimination zwischen den PH-Gruppen und der Ausschlussgruppe mittels TM, die Vorerkrankungen des Ausschlusskollektivs zu sein. Als Diagnose zeigen von den 38 Patienten des Ausschluss-Kollektivs 16 Patienten (42,1%) eine kardiologische Erkrankung, 15 Patienten (39,5 %) sind pulmonal erkrankt, 3 Patienten (7,9 %) weisen ein begleitendes thrombembolisches Ereignis auf. Weiter 4 Patienten haben eine Kollagenose als Nebenbefund (10,5%).

Tabelle 19: Vergleich der Absolut-Werte der TM-Messungen

Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung in ng/ml bzw. nmol/ml, (Median; Interquartilabstand in ng/ml)

Autoren	Material	Gesundes Ausschlusskollektiv	Unser Ausschlusskollektiv	CVD/sek. PH	IPAH
Cella et al.	Plasma (nmol/ml)	13.57 \pm 2.8 l		24.05 \pm 6.04 nmol/ml	
Tourniere et al.	Plasma (ng/ml)	40,6			28,4
Cacoub et al.	Plasma (ng/ml)	44 \pm 2			29 \pm 3
Sakamaki et al.	Plasma (ng/ml)	4,0 \pm 0,6			2,0 \pm 0,7
Welsh et al.	Plasma (ng/ml)	56 \pm 6		49 \pm 5	29 \pm 7
Unsere Daten	Plasma (ng/ml)		(1,92; 2,81)	(2,11; 2,00)	(2,29; 1,81)

In unseren Analysen sind auch zwischen den Geschlechtern und den NYHA-Klassen die Plasmaspiegel von TM nicht signifikant unterschiedlich. Allein in der CTEPH-Untergruppe konnte zwischen weiblichen und männlichen Patienten ein signifikanter Unterschied in den TM-Plasmaspiegeln festgestellt werden ($p=0,03$). Die klinische Relevanz ist bei diesem Ergebnis allerdings untergeordnet. Es kann keine generelle Unterscheidung zwischen weiblichem und männlichem Geschlecht mittels der TM-

Messungen gemacht werden, da nur eine Subgruppe signifikante Differenzen im TM-Plasmaspiegel aufweist.

Für das Gesamtkollektiv TM zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Plasmaspiegelwerten und dem PVR (Korrelationskoeffizient $-0,180$, $p=0,032$). Hohe pulmonal-vaskuläre Widerstände korrelieren mit niedrigen TM-Spiegeln. Auch Sakamaki et al. fanden in der Gruppe von PAH-Patienten negative Korrelationen zwischen dem TM-Spiegel und dem PVR ($r= 0,43$, $p < 0,05$), sowie dem TPR ($r= 0,41$, $p < 0,05$) [117]. Erhöhte pulmonal-vaskuläre Widerstände mit konsekutivem Scherstress und Verletzungen der Gefäßwände sind unter anderem eine Auswirkung der PH und zeigen ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung an [137]. Dementsprechend könnte ein erniedrigter TM-Plasmaspiegel ein Hinweis auf starke Umbauprozesse in den Gefäßwänden mit sekundärer Veränderung der Gerinnung von PH-Patienten und damit ein zusätzlicher Marker in Hinblick auf den Fortschritt der Erkrankung sein. Unterstrichen wird die Bedeutung des TM-Spiegels im Hinblick auf die Hämodynamik durch die Einzelgruppenanalyse. In der IPAH-Gruppe wurde ein signifikanter Zusammenhang mit einem Koeffizienten von $r= -0,363$ ($p=0,023$) zwischen TM-Konzentrationen und dem mPAP gefunden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in den Analysen von Welsh et al. Auch in ihren Daten korrelierten höhere mPAP-Werte ebenfalls mit niedrigen TM-Spiegeln ($r= -0,2669$, $p= 0,06$) [136].

In der IPAH-Gruppe korrelieren ebenfalls der PVR und TM-Plasmaspiegel mit einem Koeffizienten von $-0,559$ ($p=0,0002$). Zusätzliche Korrelation zeigen sich zum HZV mit einem Koeffizienten von $0,334$ ($p=0,038$). Es lässt sich also sagen, dass je höher der mPAP bzw. der PVR umso niedriger sind die TM-Konzentrationen. Auch hier zeigt sich, dass ein fortgeschrittener Krankheitsverlauf bzw. eine starke Ausprägung der PH mit erniedrigten TM-Spiegeln einhergehen. In Hinblick auf das HZV geht ein hohes HZV auch mit höheren TM-Konzentrationen im IPAH-Kollektiv einher. Dieses Ergebnis passt ebenfalls in das Konzept, dass hohe TM-Werte ein Marker für weniger weit vorangeschrittene PH-Stadien sind, da die weniger weit fortgeschrittene PH mit einem normalem oder nur leicht reduziertem HZV einhergeht [57]. Im PVH-Kollektiv konnte eine signifikante Korrelation mit einem Pearson- Koeffizienten von $-0,50$ zwischen TM-Konzentrationen und der 6-MWT festgestellt werden ($p=0,027$). PVH-Patienten mit kurzen Gehstrecken im 6-MWT weisen hohe TM-Plasmaspiegel auf. Auch dieses Ergebnis passt nicht in das Konzept, in dem erniedrigte TM-Werte mit einem fortgeschrittenen Stadium der PH korrelieren. Eine Erklärung für die umgekehrte Datenlage im PVH-Kollektiv zu finden ist schwierig. Patienten mit PVH entwickeln ihren Lungenhochdruck aufgrund einer Linksherzpathologie [31]. Vorbeschrieben ist für

Patienten mit Mitralklappenstenose, dass diese nach einer Ballon-Valvuloplastik erhöhte-TM-Plasmaspiegel aufwiesen [138]. Ebenso zeigen Patienten, die einen aortokoronaren Bypass erhielten, signifikant erhöhte TM-Plasmaspiegel verglichen mit einem Kollektiv, das einen weniger invasiven Aortenklappenersatz bekam. Die Rolle von TM als Marker für endothelialen Schäden, vor allem im kardiovaskulären System, scheint gesichert [139]. Eine generelle Aussage darüber, dass Patienten mit PVH erhöhte TM-Plasmaspiegel aufweisen, kann jedoch nicht getroffen werden (s. Abschnitt 5.1) [114]. Letztendlich bleibt die Frage, warum im PVH-Kollektiv erhöhte TM-Plasmaspiegel mit kurzen Gehstrecken im 6-MWT einhergehen, ungeklärt. Insgesamt ist festzuhalten, dass es zwar signifikante Zusammenhänge zwischen den hämodynamischen Parametern und dem TM-Plasmaspiegel gibt, diese aber gegensätzliche Schlüsse zulassen. Die meisten statistischen Zusammenhänge zwischen schlechten hämodynamischen Parametern und einem erniedrigten TM-Plasmaspiegel können für das IPAH-Kollektiv festgestellt werden. Dies mag damit zusammenhängen, dass TM ein gerinnungsbeeinflussender Faktor und vor allem für das IPAH-Kollektiv von Bedeutung ist. Tournier et al. stellten bei IPAH-Patienten eine Hyperkoagulation mit vermindertem TM- und erhöhten vWF-Plasmaspiegeln fest [135]. Dem folgend, konnte gezeigt werden, dass allein IPAH-Patienten aus der PAH-Gruppe von oraler Antikoagulation profitieren und ein längeres Überleben in der Mortalitätsanalyse aufweisen als nicht-antikoagulierte IPAH-Patienten [60]. Interessanterweise zeigten Chong et al., dass weder die Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern noch die mit Vitamin-K-Antagonisten eine Veränderung im TM-Spiegel hervorrufen [140]. Aufgrund dieser Tatsache, wäre die Wertigkeit des TM-Plasmaspiegels als Marker für die Therapie mit oralen Antikoagulanzen wenigstens bei IPAH-Patienten stark eingeschränkt. Die alleinige Aussage, dass schlechte Werte in der Hämodynamik aller PH-Patienten mit einem erniedrigten TM-Spiegel einhergehen, kann allerdings nicht getroffen werden.

Für die TM-Patientengruppe konnte ein 1-, 3- und 5 Jahresüberleben von 90,1%, 73,8% und 68,9% festgestellt werden. Die durchschnittliche Überlebenszeit ist mit 135 Monaten (109–160 Monate) etwas niedriger als die des MCP-1-Kollektivs. Der Quartilen-Vergleich erbringt mittels Log-Rank-Test keine signifikanten Unterschiede im Überleben zwischen den unterschiedlichen TM-Konzentrationen ($p=0,961$). Die Raten des durchschnittlichen Überlebens von PH-Patienten in diesem gemischt-ätiologischen Kollektiv sind im Vergleich mit der ASPIRE-Studie (2001-2010) ähnlich [141]. Die durchschnittlich beste Überlebenszeit kann für Patienten mit CTEPH festgelegt werden. Dies mag vor allem an der zielführenden Therapie mittels PEA liegen [142].

Im TM-Kollektiv ergibt sich eine durchschnittliche Dauer bis zur Therapieeskalation von 65 Monaten (95% CI 43–87 Monate). Nach einem Jahr ist eine Ausweitung der Therapie bei 30,4% notwendig, nach drei Jahren bzw. fünf sind es 55,9% und 65,2%. Für das erste Quartil ergibt sich eine durchschnittliche Zeit bis zur Therapieausweitung von 57 Monaten (95% CI 30-83 Monate), für das zweite Quartil sind es 23 Monate (14-32 Monate). Im dritten Quartil dauert es durchschnittlich 68 Monate (30-105 Monate) bis die Therapie erweitert werden muss und im vierten Quartil beträgt die Dauer 110 Monate (54-164 Monate). Der Log-Rank-Test beweist einen signifikanten Unterschied in der Dauer bis zur Therapieeskalation zwischen den einzelnen Quartilen ($p=0,016$). Die kürzeste ereignisfreie Zeit ergibt sich für Patienten mit niedrigen TM-Spiegeln. Dies mag vor allem daran liegen, dass PH-Patienten insgesamt, vor allem aber die IPAH und CTEPH-Ätiologien, eine Hyperkoagulation und dementsprechend ein höheres Risiko für Thrombosen bzw. behandlungsbedürftige Komplikationen aufweisen [135]. Auch Cacoub et al. fanden die niedrigsten TM-Spiegel bei der schweren, präkapillaren Form der PH [119]. Unsere Ergebnisse unterstreichen, dass niedrige TM-Plasmaspiegel bei PH-Patienten mit einem schnellen Progress der Erkrankung einhergehen. Niedrige TM-Plasmaspiegel könnten bei Patienten mit PH einen Hinweis darauf geben, ob die baldige Notwendigkeit zur Therapieeskalation besteht. Hohe TM-Konzentrationen könnten hingegen einen protektiven Faktor darstellen.

In der Cox-Regressionsanalyse zeigt sich, dass pro Anstieg des logarithmierten TM-Wertes um eine Einheit sich das Risiko zu versterben um 9,7% erhöht. Im Interquartil-Vergleich ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Cox-Regression für die Mortalität ($p=0,961$). TM konnte von Van Dreden et al. als prognostischer Marker bei septischen Patienten verifiziert werden. In einer retrospektiven Analyse zeigte sich, dass niedrigere TM-Plasmaspiegel mit einer signifikant besseren Überlebens-Chance einhergehen [143]. Genau gegenteilige Ergebnisse lieferte die Arbeit von Mihajlovic et al. In ihre Analysen zeigten sich signifikant höhere TM-Plasmaspiegel bei Patienten, die ein Multiorganversagen entwickelten, im Gegensatz zu den Patienten die keines entwickelten. Hohe TM-Werte waren hier ein Marker für die Schwere der Sepsis [144]. Allerdings lassen sich für die Mortalitätsprognose bei PH-Patienten mittels TM diese Ergebnisse, weder in die eine noch in die andere Richtung, reproduzieren. Auch durch Hinzunahme der hämodynamischen Faktoren in der multivariaten Analyse zeichnet sich keine Zunahme im Signifikanzniveau ab ($p=0,399$; $0,275$; $0,415$). Die TM-Plasmakonzentration scheint keine signifikante Rolle als Marker für das Überleben bei PH-Patienten zu spielen.

Für die Cox-Regressionsanalyse bezüglich der TTCW ergibt sich im TM-Kollektiv ein Hazard Ratio von 0,806 (95% CI 0,608-1,070; $p=0,136$). Damit sinkt das Risiko für eine klinische Verschlechterung mit dem Anstieg des logarithmierten TM-Wertes um Eins um 19,4%. Im Interquartil-Vergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Cox-Regression zwischen dem zweiten und dem vierten LN-TM Quartil ($p=0,01$). Diese Ergebnisse passen zu der Annahme, dass niedrige TM-Plasmaspiegel bei Patienten mit fortgeschrittener PH und bald notwendiger Therapieeskalation vorzufinden sind. Dass TM in der Pathogenese von pulmonalen Gefäßumbauprozessen, Sklerose und auch Sepsis beteiligt sind, gilt als gesichert [121][120][143]. Durch Mihajlovic et al. wurden TM als hochsignifikanter Marker für den klinischen Verlauf bei Sepsispatienten identifiziert. Hohe TM-Plasmaspiegel waren hier ein Prädiktor für das Eintreten eines Multiorganversagen bei Sepsispatienten [144]. Van Dreden et al. wiesen hohe TM-Plasmaspiegel bei Myokardinfarkt-Patienten mit ungünstigerem klinischen Verlauf nach [145]. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse jedoch signifikante Hinweise auf den Vorteil von hohen TM-Konzentrationen in Bezug auf die ereignisfreie Zeit bei Patienten mit PH. Die Diskriminanz dieser Ergebnisse, sollten vor allem in Hinblick auf die sich überschneidende Pathogenese zwischen PH und Myokardinfarkt in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

5.3 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, den prognostischen sowie den diagnostischen Wert von MCP-1 und TM als Marker bei PH und deren Unterformen zu bewerten. Dass die Messungen der Marker retrospektiv und nicht als Fall-Kontroll-Studie durchgeführt wurden, stellt eine Schwäche der vorliegenden Analyse dar. Zudem sollte die Anzahl Patienten pro PH-Ätiologie bzw. die Ausschlussgruppe in etwaigen folgenden Analysen größer gewählt werden. Obwohl die Messungen mittels ELISA den Goldstandard darstellen und unter kontrollierten Bedingungen in einem S2-Labor durchgeführt wurden, muss dennoch immer mit Messungenauigkeiten gerechnet werden, die unserer Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Es können in unseren Untersuchungen mittels ELISA keine Unterschiede in den MCP-1 und TM Plasmaspiegeln der an PH-Erkrankten und nicht an PH-Erkrankten gezeigt werden. Dies mag vor allem daran liegen, dass unser gewähltes Ausschlusskollektiv nicht vollkommen gesund war und aus diesem Grund ebenfalls Veränderungen in den Konzentrationen von MCP-1 bzw. TM aufweisen könnten. Hinsichtlich der Prognose der einzelnen PH-Entitäten zeigen sich jedoch statistische Unterschiede. Hier zeigte sich MCP-1 in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse als hochsignifikanter positiver Serummarker für die Mortalität. Ein nächster Schritt könnte die Reevaluierung dieser Ergebnisse in einer prospektiven, multizentrischen Studie sein [146]. In der Kaplan-Meier-Analyse für die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung zeigen Patienten mit hohem TM-Spiegeln eine signifikant längere Zeitspanne ohne Notwendigkeit einer Therapieeskalation als Patienten mit niedrigen TM-Plasmaspiegeln. In Hinblick darauf, dass hohe TM-Plasmaspiegel für Patienten mit Sepsis als auch nach Myokardinfarkt mit einer schlechteren Prognose behaftet waren, sollte die von uns nachgewiesene protektive Eigenschaft von TM bei PH-Patienten in zukünftigen Studien in einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden. Da die Ursachen der PH vielfältig sind, sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass es für die unterschiedlichen Entitäten auch unterschiedliche Plasmamarker geben könnte. In unserem Kollektiv zeigen sich vor allem in der IPAH-Gruppe relevante Korrelationen zwischen der Serumhöhe von TM und den gemessenen hämodynamischen Parametern. Bei beiden Marker gilt zu beachten, dass diese wie auch die bis jetzt genutzten Marker nicht PH-spezifisch sind. Weitere Untersuchungen mit TM und MCP-1 in einer größeren Patientenzahl könnte zukünftig die Chance bieten, Patienten mit PH klinisch besser zu überwachen und auf klinische Verschlechterung rechtzeitig zu reagieren.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die pulmonale Hypertonie ist eine seltene, doch potentiell lebensbedrohliche Erkrankung der Lungengefäße. Bis heute gibt es keinen PH-spezifischen prognostischen bzw. diagnostischen Biomarker. Die Plasmaspiegel von TM und MCP-1 wurden bei PH-Patienten verglichen mit einem gesunden Kontrollkollektiv als verändert vorbeschrieben. In dieser Arbeit wurde ein Vergleich der Marker-Konzentrationen zwischen den verschiedenen PH-Entitäten bzw. deren Korrelation, mit relevanten hämodynamischen Parametern durchgeführt. Ebenso wurden erstmals Mortalität und klinischer Verlauf in Hinblick auf die Höhe von MCP-1 und TM berücksichtigt.

Methoden: Mittels ELISA werden 167 Plasmaproben auf ihrer MCP-1-Plasmaspiegel, 180 Proben auf die Plasmaspiegel von TM untersucht. Berücksichtigt werden dabei vier wichtige PH-Entitäten (IPAH, CVD, PVH und CTEPH) und eine Ausschlussgruppe. Es werden auch die NYHA-Stadien und das Geschlecht berücksichtigt. Zudem erfolgte eine Mortalitäts- und Cox-Regressions-Analyse in Hinblick auf die Biomarker-Konzentrationen.

Ergebnisse: Weder für MCP-1, noch für TM konnte in unseren Analysen eine diagnostische Aussagekraft bezüglich der Schwere der PH oder den unterschiedlichen Entitäten gefunden werden. Allein zwischen dem CVD- und dem IPAH-Kollektiv konnten signifikant unterschiedliche MCP-1-Konzentrationen nachgewiesen werden. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse stellt sich MCP-1 als signifikanter Überlebensprädiktor dar und zeigt somit prognostischen Wert. Nur die Sechs-Minuten-Gehstrecke ist ein noch aussagekräftigerer Vorhersagewert. In der IPAH-Einzelanalyse gehen hohe MCP-1-Konzentrationen mit einem signifikant schlechteren Überleben einher. Auch in der Cox-Regressions-Analyse stellte sich ein signifikantes HR von 3,42 (95% CI 1,06-11,03) in der IPAH-Gruppe dar. Im TM-Kollektiv korrelieren niedrige TM-Plasmaspiegel signifikant mit hohen PVR-Werten. In der IPAH-Einzelgruppenanalyse zeigen sich weitere signifikante Korrelationen mit dem mPAP, HZV und 6-MWT. In der Kaplan-Meier-Analyse zeigt sich bei niedrigen TM-Werten eine deutlich kürzer Zeit bis zur klinischen Verschlechterung.

Zusammenfassung: In dieser Arbeit werden MCP-1- und TM-Konzentrationen erstmals für die vier wichtigsten Ätiologien der PH mit einer Ausschlussgruppe verglichen. Zusätzlich wurde eine Mortalitäts- und Cox-Regressionsanalyse unter Einbeziehung der Biomarker-Konzentrationen durchgeführt. Einen diagnostischen Wert konnten wir für keinen der beiden Marker darstellen. MCP-1 zeigt in der multivariaten

Analyse relevanten prognostischen Wert in der Überlebensanalyse. Niedrige TM-Spiegel korrelieren mit verkürzter Zeit bis zur klinischen Verschlechterung.

7 Abstract

Background: Pulmonary hypertension is a rare, but potentially lethal disease of the pulmonary vessels. Until today there are no specific plasma markers for the diagnosis or prognostic prediction of pulmonary hypertension. Plasma levels of TM and MCP-1 have been described as altered in PH patients compared to healthy control collectives. In this study we compared plasma levels of TM and MCP-1 in different PH entities and their correlation with relevant hemodynamic parameters. We also considered mortality and time to clinical worsening in the light of the MCP-1 and TM levels for the first time.

Methods: Via ELISA test a total of 167 MCP-1 and 180 TM samples were measured. We considered the four most frequent entities of PH (IPAH, CVD, PVH, CTEPH) and a control group. Additionally we matched the NYHA classes and sex with the specific levels of the markers. Mortality- and a Cox regression analysis were performed with a view to the concentrations of both markers.

Results: Neither for MCP-1 nor for TM we could find a diagnostic value regarding the severity of PH or its different entities. Only between the CVD and the IPAH group we registered a significant difference in MCP-1 plasma concentrations. In the multivariate cox regression analysis MCP-1 was a significant predictor of survival, despite the six minute walking distance, which is even a stronger predictor of survival. In the subgroup analysis of IPAH high MCP-1 concentrations correlated with a significant shorter survival. There is also a significant HR of 3,42 (95% CI 1,06-11,03) in the Cox regression analysis in the IPAH group. In the TM group we observed that low TM plasma levels correlate significant with high PVR levels. In the IPAH subgroup a significant correlation between the TM level with mPAP, HZV and 6-MWT was observed. In the Kaplan Meier analysis low TM level correlated with reduced time to clinical worsening.

Conclusion: In this report we compared the levels of MCP-1 and TM between the different entities of PH and a control group for the first time. Additionally we performed a mortality- and a Cox regression analysis considering the biomarkers concentrations. We could conclude that TM and MCP-1 plasma levels do not show general diagnostic relevance in our cohort. MCP-1 was a significant predictor of survival in the multivariate analysis. Low TM levels show significant correlation with reduced time to clinical worsening.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gefäßveränderungen bei PAH _____	7
Abbildung 2: Pathogenese bei PAH _____	10
Abbildung 3: Signalwege bei der pulmonalarteriellen Hypertonie und Therapieoptionen ____	12
Abbildung 4: Thrombomodulin im Protein-C-System _____	18
Abbildung 5: Gerinnungskaskade und der antithrombotische Weg (gestrichelte Pfeile) ____	18
Abbildung 6: schematische Darstellung des ELISA Prinzips nach [122] _____	22
Abbildung 7: Boxplot MCP-1-Plasmaspiegel aller Messungen _____	26
Abbildung 8: Boxplot logarithmierte MCP-1-Plasmaspiegel aller Messungen _____	26
Abbildung 9: Boxplot: MCP-1-Plasmaspiegel geordnet nach Diagnose _____	27
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurve aller Patienten mit PH _____	29
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die log. MCP-1-Quartile _____	30
Abbildung 12: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für alle Patienten mit PH _____	31
Abbildung 13: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für die log. MCP-1-Quartile _____	32
Abbildung 14: Cox-Regression - Überleben für die log. MCP-1-Quartile _____	33
Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die log. MCP-1-Quartile (nur IPAH) _____	36
Abbildung 16: Cox-Regression - Überleben für die log. MCP-1-Quartile (IPAH) _____	36
Abbildung 17: durchschnittliche TM-Plasmaspiegel aller Messungen _____	41
Abbildung 18: logarithmierte TM-Plasmaspiegel aller Messungen _____	41
Abbildung 19: Boxplot-Darstellung für die TM-Plasmaspiegel der einzelnen Ätiologien ____	42
Abbildung 20: Korrelation zwischen den log. TM-Konzentrationen und dem PVR _____	43
Abbildung 21: Kaplan-Meier-Darstellung für das Überleben aller Patienten mit PH _____	44
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Darstellung für das Überleben der TM-Quartile _____	45
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für alle Patienten mit PH _____	46
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Darstellung für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung der TM-Quartile _____	47
Abbildung 25: Cox-Regression - Überleben aller Patienten mit PH _____	48
Abbildung 26: Cox-Regression - Überleben für die TM-Quartile _____	48
Abbildung 27: Cox-Regression für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung aller Patienten mit PH _____	49
Abbildung 28: Cox-Regression für die Zeit bis zur klin. Verschlechterung für die TM-Quartile _____	49
Abbildung 29: Korrelation zwischen log. TM-Konzentrationen und mPAP (nur IPAH) _____	52
Abbildung 30: Korrelation zwischen log. TM-Konzentrationen und HZV (nur IPAH) _____	52
Abbildung 31: Korrelationen zwischen log. TM-Konzentrationen und PVR (nur IPAH) _____	53
Abbildung 32: Boxplot-Darstellung der log. TM-Plasmaspiegel für die Geschlechter (CTEPH) _____	54

Abbildung 33: Korrelation zwischen den log. TM-Konzentrationen und 6-MWT (nur PVH) _____	55
Abbildung 34: Platten-Schema einer 96-Well-Platte im TM-ELISA_____	75

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: überarbeitete Klassifikation der PH nach dem fünften Welt-Symposium 2013 [7].....	2
Tabelle 2: durchschnittliche Hämodynamik des gesamten MCP-1-Patientenkollektivs	24
Tabelle 3: Hämodynamik der einzelnen Entitäten des MCP-1-Patientenkollektivs	24
Tabelle 4: MCP-1-Plasmaspiegel aufgelistet für NYHA-Stadien und Geschlecht	28
Tabelle 5: Pearson-Korrelation LN-MCP-1 und Hämodynamik	28
Tabelle 6: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse (PVR, Geschlecht)	34
Tabelle 7: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus 6-MWT.....	34
Tabelle 8: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus NYHA-Stadien.....	34
Tabelle 9: Univariate Cox-Regression; Überleben LN-MCP1 für die einzelnen Ätiologien	34
Tabelle 10: durchschnittliche Hämodynamik des gesamten TM-Patientenkollektivs	39
Tabelle 11: Hämodynamik der einzelnen Entitäten des TM-Kollektivs	40
Tabelle 12: TM-Plasmaspiegel als Median aufgelistet für NYHA-Stadien und Geschlecht.....	42
Tabelle 13: Pearson-Korrelation LN-TM-Spiegel und Hämodynamik	43
Tabelle 14: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse (PVR, Geschlecht)	50
Tabelle 15: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus 6-MWT.....	50
Tabelle 16: Multivariate Cox-Regressionsanalyse plus NYHA-Stadien.....	50
Tabelle 17: Univariate Cox-Regression – Überleben LN-TM für die einzelnen Ätiologien	51
Tabelle 18: Vergleich der Absolut-Werte der MCP-1-Messungen	59
Tabelle 19: Vergleich der Absolut-Werte der TM-Messungen	62
Tabelle 20: Kontrollmessung der TM-ELISA.....	75

8.3 Verwendete Geräte/ Hersteller

Photometer <i>Infinite M200pro</i>	Tecan; Männendorf, Schweiz
Zentrifuge <i>Mikro 200R</i>	Hettich; Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 46 RS	Hettich; Tuttlingen, Deutschland
Wipptisch <i>Mini Rocker Shaker MR-1</i>	Biosan; Riga, Lettland

8.4 Verwendete Substanzen und Chemikalien

	Name des ELISA's	Bestellnummer	Firma
TM	Thrombomodulin Human ELISA Kit	ab46508	abcam®; Cambridge, UK
MCP-1	Human MCP-1 ELISA Kit	EH2MCP1	Thermo Scientific, Rockford, USA

8.5 MCP-1 ELISA-Protokoll

Für die Messungen der MCP-1-Plasmakonzentrationen werden *Human MCP-1-ELISA* der Firma Thermo Scientific benutzt. Vor Verwendung werden sie bei -20 ° C im Gefrierschrank aufbewahrt. Alle ELISA-Kits entsprechen derselben Lot-Nummer, um Fehlerquellen durch minimal veränderte Zusammensetzungen im Kit zu vermeiden. In einer Vorab-Messung wird die beste Verdünnungsstufe für die Plasmaproben ausgetestet, da die unverdünnten Proben den höchsten Punkt der Standardkurve (1,0 pg/ml) und damit die maximal bestimmbare Konzentration übersteigen. Dabei erweist sich, eine zweifache Verdünnung (50 µl Probe und 50 µl Verdünnungsmittel) als ideal.

Protokoll

1. Mischen aller benötigten Reagenzien:

Waschpuffer: 50 ml Waschpuffer werden mit 1,5 l ultrapurem Wasser gemischt

Standard-Lösung: 1 Flasche Trockensubstanz wird mit der, auf der Flasche angegeben Menge, ultrapurem Wasser aufgelöst.

Der Standard-Puffer ist eine Fertiglösung.

2. Für jede Messreihe wird eine Standard-Verdünnungsreihe durchgeführt. Dafür werden sechs Reaktionsgefäße von 1-6 nummeriert. In das erste Gefäß werden 330 µl des Standardpuffers und 82,5 µl der Standardlösung gegeben. In jedes weitere Gefäß nun werden 240 µl des Standardpuffers gefüllt. Es werden 160 µl aus dem ersten Eppendorfergefäß in das zweite gegeben, dann 160 µl aus dem zweiten in das dritte usw. bis zum 5. Reaktionsgefäß. Im letzten Gefäß befindet sich nur Puffer. So erzeugt man eine Verdünnungsreihe von 1,0 pg/ml – 0 pg/ml MCP-1-Konzentration.
3. In jedes *Well* werden 50 µl Standardpuffer gegeben.
4. Es werden jeweils 50 µl aus der Verdünnungsreihe bzw. verdünnte Probe in ein *Well* hinzu gegeben und vermischt.

5. Dann wird die Platte mit einer Folie abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert.
6. Die Platte wird ausgewaschen: der Inhalt der Wells wird ausgeschüttet und die Wells werden insgesamt 3 Mal mit 300 µl Waschpuffer gespült.
7. 100 µl des Antikörpers werden in jedes Well gegeben und vermischt.
8. Die gesamte Platte wird wieder mit einer Folie verschlossen und für eine Stunde auf dem Wipptisch inkubiert.
9. Der Waschvorgang aus Punkt 6 wird wiederholt.
10. Kurz vor Benutzung wird die Streptavidin-HRP-Lösung angesetzt: für eine 96-Well-Platte werden 30µl HRP-Konzentrat mit 12 ml HRP-Verdünnung vermischt. Davon werden je 100 µl in jedes Well gegeben.
11. Es wird ein weiteres Mal für 30 min. inkubiert.
12. Es werden 100 µl der TMB-Lösung in jedes Well gegeben.
13. Die Farbreaktion entwickelt sich innerhalb von 20 min. im Dunkeln.
14. Dann wird die Reaktion mittels Stopp-Lösung beendet.
15. Direkt danach wird die Farbintensität mittels Spektrophotometers bei 450 nm und 550 nm (Referenzwellenlänge) gemessen.

Die Sensitivität für diesen ELISA wird von Thermo Scientific mit < 10 pg/ml angegeben.

8.6 TM ELISA-Protokoll

Für die Messungen der Plasmakonzentrationen von TM wird das „Thrombomodulin Human ELISA Kit“ von Abcam verwendet. Vor Verwendung lagern die Kits durchgehend in einem Kühlraum bei 4 ° C. Auch hier werden alle Kits mit derselben Lot-Nummer verwendet.

Protokoll

1. Mischen aller benötigten Reagenzien:
 - Standardpuffer: wird 10-fach mit destilliertem Wasser verdünnt.
 - Standard-Lösung: wird mit einer auf der Flasche angegebenen Menge des Standardpuffers gemischt.
 - Kontroll-Lösung: wird ebenfalls mit einer festgelegten Menge des Standardpuffers vermischt.
2. Für jede Messreihe werden eine Standard-Verdünnungs-Reihe, eine Leer- sowie eine Kontrollmessung durchgeführt. Dafür werden jeweils 100 µl des Standardpuffers in Well B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1, E2, F1 und F2 gefüllt. 200 µl des Standardlösung werden in Well A1 und A2 gegeben. Es werden jeweils 100 µl des Standards aus A1 und A2 in B1 und B2 transferiert. Durch

wiederholte Aspiration mit der Pipette werden die Reagenzien gemischt. Dieses Procedere wird dann wiederholt: 100 µl aus B1 und B2 werden in C1 und C2 übertragen usw. So werden zwei parallele Reihen eines Standard-Verdünnungsvorgangs für TM erstellt. Aus dem letzten Verdünnungs-Well F1 und F2 müssen jeweils 100 µl entfernt werden. Die Verdünnung reicht von 20 – 0,625 ng/ml.

3. In die „Leer- Wells“ G1 und G2 werden 100 µl des Standardpuffers gegeben.
4. Es werden jeweils 100 µl einer unverdünnten Plasmaprobe in zwei benachbarten Wells pipettiert (jede Probe wird zweimal gemessen → es wird ein Mittelwert gebildet).
5. Dann wird der anti-TM-Antikörper vorbereitet: Für eine 96-Well-Platte werden 240 µl der Antikörpers mit 6360 µl des Antikörper-Verdünnungsmittels vermischt.
6. In jedes Well werden 50 µl des verdünnten Anti-TM-Antikörpers gegeben.
7. Die Platte wird mit einer Folie abgedeckt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert.
8. Der Waschpuffer wird 200-fach mit destilliertem Wasser verdünnt.
9. Alle Wells werden geleert und mit 300 µl Waschpuffer pro Well ausgewaschen. Der Waschvorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt.
10. Direkt vor der Nutzung wird die Streptavidin-HRP-Lösung angesetzt: für 96 Wells werden 150 µl Streptavidin-HRP mit 10 ml Strep-HRP-Verdünnungsmittel vermischt.
11. Es werden 100 µl der verdünnten Streptavidin-HRP-Lösung in jedes Well gegeben.
12. Die Platte wird wieder abgedeckt und für 30 min. bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert.
13. Der Waschvorgang aus Punkt 9 wird wiederholt.
14. Es werden 100 µl einer TMB-Fertiglösung in jedes Well eingefüllt. Die ganze Platte wird für 12-15 min. im Dunkeln (die Platte wird in Aluminiumfolie verpackt) inkubiert.
15. Die Enzym-Substrat-Reaktion wird gestoppt indem zügig 100µl H₂SO₄-„Stopp“-Lösung in jedes Well pipettiert werden.
16. Die Platte wird unverzüglich mittels eines Spektrophotometers bei 450 nm gemessen.

Abcam gewährleistet in diesem ELISA eine minimal zu detektierende Konzentration von TM von unter 0,380 ng/ml.

Die TM-Standardkurve reicht von 0,62 bis 20 ng/ml.

Die Kontrollmessungen dürfen eine TM-Konzentration von 13 ± 3 ng/ml aufweisen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20	20	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33
B	10	10	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34
C	5	5	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
D	2,5	2,5	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
E	1,25	1,25	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37
F	0,62	0,62	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38
G	Blan	Blan	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39
H	Kon	Kon	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	P40	P40

Abbildung 34: Platten-Schema einer 96-Well-Platte im TM-ELISA

Well A1/2 - H 1/2: Konzentration der Standardkurve in ng/ml; Blan: Blanc = Leermessung; Kon: Kontrollmessung, P: Probe

8.7 Kontrollwerte der TM-ELISA

Tabelle 20: Kontrollmessung der TM-ELISA

ng/ml: Nanogramm pro Milliliter

Datum der Messung	Konzentration Kontrolle
31.10.2013	9,9 ng/ml
08.11.2013	10,7 ng/ml
27.11.2013	11,6 ng/ml
29.11.2013	9,9 ng/ml
17.12.2013	11,3 ng/ml
05.01.2014	10,5 ng/ml
17.01.2014	10,1 ng/ml
25.05.2014	11,9 ng/ml

8.8 Ethikvotum

JUSTUS-LIEBIG



UNIVERSITÄT
GIESSEN

FACHBEREICH 11



MEDIZIN

Ethik-Kommission, Klinikstr. 32 (Alte Frauenklinik), D-35385 Gießen

Dr. H. Tiede
Med. Klinik II
Pneumologie
Klinikstr. 33
35385 Gießen

**ETHIK-KOMMISSION
am Fachbereich Medizin
Vorsitz: Prof. H. Tillmanns**

Klinikstr. 32 (Alte Frauenklinik)
D-35385 Gießen
Tel.: (0641)99-42470 / 47660
ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.de

Gießen, 25. Juli 2013
Dr. Kr./erb

AZ.: 100/13

Titel: Biomarker für die pulmonale Hypertonie.

Sitzung am 14.05.2013

Sehr geehrte(r) Antragsteller/Antragstellerin,

Liebe Ken Tiede

wir bedanken uns für die Vorstellung Ihres Forschungsprojektes. Im Folgenden erhalten Sie das Votum der Gießener Ethik-Kommission zur oben genannten Studie:

Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter der Klinischen Prüfung (LKP)
Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung
Eingesandte Unterlagen:

- Formalisierter Antrag vom 18.04.13
 Ausführliche Darstellung des Vorhabens (Studienprotokoll)

Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Soweit betreffend, wurde **das auf Seite 2 wiedergegebene Protokoll** unter Berücksichtigung des Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community (ICH-GCP) erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags.

Forderungen der Ethik-Kommission, soweit darin aufgeführt, wurden inzwischen erfüllt.
Sie stimmt dem Vorhaben zu.
Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2).
Sie stimmt dem Vorhaben nicht zu (siehe S. 2).

Die Ethik-Kommission erwartet, dass ihr bis 31.12.15 ohne Aufforderung ein kurzer Bericht auf beigefügtem (roten) Formblatt übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, medizinisch-wissenschaftliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ethik-Kommission über alle Änderungen des Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkungen mitzuteilen, soweit sie im Bereich der Zuständigkeit dieser Ethik-Kommission aufgetreten sind. Bei überregionalen Studien sind sie auch dem LKP mitzuteilen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

8.9 Literaturverzeichnis

- [1] M. M. Hoeper, H. J. Bogaard, R. Condliffe, R. Frantz, D. Khanna, M. Kurzyna, D. Langleben, A. Manes, T. Satoh, F. Torres, M. R. Wilkins, and D. B. Badesch, "Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, no. 25 Suppl, pp. D42–50, Dec. 2013.
- [2] C. Guignabert and P. Dorfmüller, "Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension," *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 34, no. 05, pp. 551–559, Sep. 2013.
- [3] A. J. Peacock, "Treatment of pulmonary hypertension.," *BMJ*, vol. 326, no. 7394, pp. 835–6, Apr. 2003.
- [4] S. Rich, D. R. Dantzker, S. M. Ayres, E. H. Bergofsky, B. H. Brundage, K. M. Detre, A. P. Fishman, R. M. Goldring, B. M. Groves, and S. K. Koerner, "Primary pulmonary hypertension. A national prospective study.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 107, no. 2, pp. 216–23, Aug. 1987.
- [5] G. Simonneau, N. Galiè, L. J. Rubin, D. Langleben, W. Seeger, G. Domenighetti, S. Gibbs, D. Lebrec, R. Speich, M. Beghetti, S. Rich, and A. Fishman, "Clinical classification of pulmonary hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 43, no. 12 Suppl S, p. 5S–12S, Jun. 2004.
- [6] G. Simonneau, I. M. Robbins, M. Beghetti, R. N. Channick, M. Delcroix, C. P. Denton, C. G. Elliott, S. P. Gaine, M. T. Gladwin, Z.-C. Jing, M. J. Krowka, D. Langleben, N. Nakanishi, and R. Souza, "Updated clinical classification of pulmonary hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 54, no. 1 Suppl, pp. S43–54, Jun. 2009.
- [7] G. Simonneau, M. A. Gatzoulis, I. Adatia, D. Celermajer, C. Denton, A. Ghofrani, M. A. Gomez Sanchez, R. Krishna Kumar, M. Landzberg, R. F. Machado, H. Olschewski, I. M. Robbins, and R. Souza, "Updated clinical classification of pulmonary hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, no. 25 Suppl, pp. D34–41, Dec. 2013.
- [8] G. G. Pietra, F. Capron, S. Stewart, O. Leone, M. Humbert, I. M. Robbins, L. M. Reid, and R. M. Tuder, "Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 43, no. 12 Suppl S, p. 25S–32S, Jun. 2004.
- [9] Y. Yasunobu, R. J. Oudiz, X.-G. Sun, J. E. Hansen, and K. Wasserman, "End-tidal PCO₂ abnormality and exercise limitation in patients with primary pulmonary hypertension.," *Chest*, vol. 127, no. 5, pp. 1637–46, May 2005.
- [10] A. Chaouat, F. Coulet, C. Favre, G. Simonneau, E. Weitzenblum, F. Soubrier, and M. Humbert, "Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension.," *Thorax*, vol. 59, no. 5, pp. 446–8, May 2004.
- [11] R. C. Trembath, J. R. Thomson, R. D. Machado, N. V Morgan, C. Atkinson, I. Winship, G. Simonneau, N. Galie, J. E. Loyd, M. Humbert, W. C. Nichols, N. W. Morrell, J. Berg, A. Manes, J. McLaughlin, M. Pauculo, and L. Wheeler, "Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, no. 5, pp. 325–34, Aug. 2001.
- [12] M. Humbert, O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, A. Yaici, E. Weitzenblum, J.-F. Cordier, F. Chabot, C. Dromer, C. Pison, M. Reynaud-Gaubert, A. Haloun, M. Laurent, E. Hachulla, and G. Simonneau, "Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 173, no. 9, pp. 1023–30, May 2006.
- [13] D. Khanna, H. Gladue, R. Channick, L. Chung, O. Distler, D. E. Furst, E. Hachulla, M. Humbert, D. Langleben, S. C. Mathai, R. Saggarr, S. Visovatti, N. Altorok, W. Townsend, J. FitzGerald, and V. V McLaughlin, "Recommendations for screening and detection of connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension.," *Arthritis Rheum.*, vol. 65, no. 12, pp. 3194–201, Dec. 2013.

- [14] S. Ghio, A. Gavazzi, C. Campana, C. Inserra, C. Klersy, R. Sebastiani, E. Arbustini, F. Recusani, and L. Tavazzi, "Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 37, no. 1, pp. 183–8, Jan. 2001.
- [15] F. Grigioni, L. Potena, N. Galiè, F. Fallani, M. Bigliardi, F. Coccolo, G. Magnani, A. Manes, A. Barbieri, A. Fucili, C. Magelli, and A. Branzi, "Prognostic implications of serial assessments of pulmonary hypertension in severe chronic heart failure.," *J. Heart Lung Transplant.*, vol. 25, no. 10, pp. 1241–6, Oct. 2006.
- [16] R. J. Oudiz, "Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease.," *Clin. Chest Med.*, vol. 28, no. 1, pp. 233–41, x, Mar. 2007.
- [17] N. Galiè, M. M. Hoeper, M. Humbert, A. Torbicki, J.-L. Vachiery, J. A. Barbera, M. Beghetti, P. Corris, S. Gaine, J. S. Gibbs, M. A. Gomez-Sanchez, G. Jondeau, W. Klepetko, C. Opitz, A. Peacock, L. Rubin, M. Zellweger, and G. Simonneau, "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the Internat," *Eur. Heart J.*, vol. 30, no. 20, pp. 2493–537, Oct. 2009.
- [18] N. Galiè, M. Humbert, J.-L. Vachiery, S. Gibbs, I. Lang, A. Torbicki, G. Simonneau, A. Peacock, A. Vonk Noordegraaf, M. Beghetti, A. Ghofrani, M. A. Gomez Sanchez, G. Hansmann, W. Klepetko, P. Lancellotti, M. Matucci, T. McDonagh, L. a Pierard, P. T. Trindade, M. Zompatori, M. Hoeper, V. Aboyans, A. Vaz Carneiro, S. Achenbach, S. Agewall, Y. Allanore, R. Asteggiano, L. Paolo Badano, J. Albert Barberà, H. Bouvaist, H. Bueno, R. a Byrne, S. Carerj, G. Castro, Ç. Erol, V. Falk, C. Funck-Brentano, M. Gorenflo, J. Granton, B. lung, D. G. Kiely, P. Kirchhof, B. Kjellstrom, U. Landmesser, J. Lekakis, C. Lionis, G. Y. H. Lip, S. E. Orfanos, M. H. Park, M. F. Piepoli, P. Ponikowski, M.-P. Revel, D. Rigau, S. Rosenkranz, H. Völler, and J. Luis Zamorano, "2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension," *Eur. Heart J.*, vol. 37, no. 1, pp. 67–119, 2015.
- [19] S. Rosenkranz, D. Bonderman, M. Buerke, R. Felgendreher, H. ten Freyhaus, E. Grünig, F. de Haan, C. Hammerstingl, a Harreuter, W. Hohenforst-Schmidt, I. Kindermann, M. Kindermann, F.-X. Kleber, M. Kuckeland, W. M. Kübler, D. Mertens, V. Mitrovic, C. Opitz, a Schmeisser, U. Schulz, R. Speich, W. Zeh, and J. Weil, "[Pulmonary hypertension due to left heart disease: recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010].," *Dtsch. Med. Wochenschr.*, vol. 135 Suppl , no. September, pp. S102–14, Oct. 2010.
- [20] A. Chaouat, R. Naeije, and E. Weitzenblum, "Pulmonary hypertension in COPD.," *Eur. Respir. J.*, vol. 32, no. 5, pp. 1371–85, Nov. 2008.
- [21] J. Behr and J. H. Ryu, "Pulmonary hypertension in interstitial lung disease.," *Eur. Respir. J.*, vol. 31, no. 6, pp. 1357–67, Jun. 2008.
- [22] M. M. Hoeper, S. Andreas, a Bastian, M. Claussen, H. a Ghofrani, M. Gorenflo, C. Grohé, a Günther, M. Halank, P. Hammerl, M. Held, S. Krüger, T. J. Lange, F. Reichenberger, a Sablotzki, G. Staehler, W. Stark, H. Wirtz, C. Witt, and J. Behr, "[Pulmonary hypertension due to chronic lung disease. Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010].," *Dtsch. Med. Wochenschr.*, vol. 135 Suppl , no. September, pp. S115–24, Oct. 2010.
- [23] E. Weitzenblum, A. Sautegau, M. Ehrhart, M. Mammosser, and A. Pelletier, "Long-term oxygen therapy can reverse the progression of pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease.," *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 131, no. 4, pp. 493–8, Apr. 1985.
- [24] E. Weitzenblum, C. Hirth, A. Ducolone, R. Mirhom, J. Rasaholinjanahary, and M. Ehrhart, "Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease.," *Thorax*, vol. 36, no. 10, pp. 752–8, Oct. 1981.
- [25] M. M. Hoeper, E. Mayer, G. Simonneau, and L. J. Rubin, "Chronic thromboembolic pulmonary hypertension.," *Circulation*, vol. 113, no. 16, pp. 2011–20, Apr. 2006.
- [26] V. Pengo, A. W. A. Lensing, M. H. Prins, A. Marchiori, B. L. Davidson, F. Tiozzo, P. Albanese, A. Biasiolo, C. Pegoraro, S. Iliceto, and P. Prandoni, "Incidence of chronic thromboembolic

- pulmonary hypertension after pulmonary embolism.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 22, pp. 2257–64, May 2004.
- [27] H. Wilkens, I. Lang, J. Behr, T. Berghaus, C. Grohe, S. Guth, M. M. Hoeper, T. Kramm, U. Krüger, F. Langer, H.-J. Schäfers, M. Schmidt, H.-J. Seyfarth, T. Wahlers, H. Worth, and E. Mayer, "[Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010].," *Dtsch. Med. Wochenschr.*, vol. 135 Suppl, pp. S125–30, Oct. 2010.
- [28] D. Dingli, J. P. Utz, M. J. Krowka, A. L. Oberg, and A. Tefferi, "Unexplained pulmonary hypertension in chronic myeloproliferative disorders.," *Chest*, vol. 120, no. 3, pp. 801–8, Sep. 2001.
- [29] A. J. Peacock, "Pulmonary hypertension after splenectomy: a consequence of loss of the splenic filter or is there something more?," *Thorax*, vol. 60, no. 12, pp. 983–4, Dec. 2005.
- [30] J. M. Bourbonnais and L. Samavati, "Clinical predictors of pulmonary hypertension in sarcoidosis.," *Eur. Respir. J.*, vol. 32, no. 2, pp. 296–302, Aug. 2008.
- [31] N. Galiè, M. M. Hoeper, M. Humbert, A. Torbicki, J.-L. Vachiery, J. A. Barbera, M. Beghetti, P. Corris, S. Gaine, J. S. Gibbs, M. A. Gomez-Sanchez, G. Jondeau, W. Klepetko, C. Opitz, A. Peacock, L. Rubin, M. Zellweger, and G. Simonneau, "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension.," *Eur. Respir. J.*, vol. 34, no. 6, pp. 1219–63, Dec. 2009.
- [32] S. P. Gaine and L. J. Rubin, "Primary pulmonary hypertension.," *Lancet*, vol. 352, no. 9129, pp. 719–25, Aug. 1998.
- [33] M. Rabinovitch, "Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 12, pp. 4306–13, Dec. 2012.
- [34] H. A. Ghofrani, J. Pepke-Zaba, J. A. Barbera, R. Channick, A. M. Keogh, M. A. Gomez-Sanchez, M. Kneussl, and F. Grimminger, "Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 43, no. 12 Suppl S, p. 68S–72S, Jun. 2004.
- [35] A. Giaid and D. Saleh, "Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, no. 4, pp. 214–21, Jul. 1995.
- [36] S. Bunting, S. Moncada, and J. R. Vane, "The effects of prostaglandin endoperoxides and thromboxane A₂ on strips of rabbit coeliac artery and certain other smooth muscle preparations [proceedings].," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 57, no. 3, p. 462P–463P, Jul. 1976.
- [37] V. Petkov, W. Mosgoeller, R. Ziesche, M. Raderer, L. Stiebellehner, K. Vonbank, G.-C. Funk, G. Hamilton, C. Novotny, B. Burian, and L.-H. Block, "Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension.," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 9, pp. 1339–46, May 2003.
- [38] R. M. Tuder, C. D. Cool, M. W. Geraci, J. Wang, S. H. Abman, L. Wright, D. Badesch, and N. F. Voelkel, "Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 159, no. 6, pp. 1925–32, Jun. 1999.
- [39] B. H. Chua, C. J. Krebs, C. C. Chua, and C. A. Diglio, "Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells.," *Am. J. Physiol.*, vol. 262, no. 4 Pt 1, pp. E412–6, Apr. 1992.
- [40] D. J. Stewart, R. D. Levy, P. Cernacek, and D. Langleben, "Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?," *Ann. Intern. Med.*, vol. 114, no. 6, pp. 464–9, Mar. 1991.
- [41] X. J. Yuan, J. Wang, M. Juhaszova, S. P. Gaine, and L. J. Rubin, "Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension.," *Lancet*, vol. 351, no. 9104, pp. 726–7, Mar. 1998.

- [42] E. D. Michelakis, M. S. McMurtry, X.-C. Wu, J. R. B. Dyck, R. Moudgil, T. A. Hopkins, G. D. Lopaschuk, L. Puttagunta, R. Waite, and S. L. Archer, "Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels.," *Circulation*, vol. 105, no. 2, pp. 244–50, Jan. 2002.
- [43] W. Xu, T. Koeck, A. R. Lara, D. Neumann, F. P. DiFilippo, M. Koo, A. J. Janocha, F. A. Masri, A. C. Arroliga, C. Jennings, R. A. Dweik, R. M. Tuder, D. J. Stuehr, and S. C. Erzurum, "Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 4, pp. 1342–7, Jan. 2007.
- [44] L. Taraseviciene-Stewart, Y. Kasahara, L. Alger, P. Hirth, G. Mc Mahon, J. Waltenberger, N. F. Voelkel, and R. M. Tuder, "Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension.," *FASEB J.*, vol. 15, no. 2, pp. 427–38, Feb. 2001.
- [45] F. A. Masri, W. Xu, S. A. A. Comhair, K. Asosingh, M. Koo, A. Vasanji, J. Drazba, B. Anand-Apte, and S. C. Erzurum, "Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 293, no. 3, pp. L548–54, Sep. 2007.
- [46] T. K. Jeffery and N. W. Morrell, "Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension.," *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 45, no. 3, pp. 173–202, Jan. .
- [47] M. Humbert, N. W. Morrell, S. L. Archer, K. R. Stenmark, M. R. MacLean, I. M. Lang, B. W. Christman, E. K. Weir, O. Eickelberg, N. F. Voelkel, and M. Rabinovitch, "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 43, no. 12 Suppl S, p. 13S–24S, Jun. 2004.
- [48] T. Stevens and M. N. Gillespie, "The hyperproliferative endothelial cell phenotype in idiopathic pulmonary arterial hypertension.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 293, no. 3, pp. L546–7, Sep. 2007.
- [49] R. M. Tuder, S. H. Abman, T. Braun, F. Capron, T. Stevens, P. A. Thistlethwaite, and S. G. Haworth, "Development and pathology of pulmonary hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 54, no. 1 Suppl, pp. S3–9, Jun. 2009.
- [50] P. Dorfmüller, F. Perros, K. Balabanian, and M. Humbert, "Inflammation in pulmonary arterial hypertension.," *Eur. Respir. J.*, vol. 22, no. 2, pp. 358–63, Aug. 2003.
- [51] K. Balabanian, A. Foussat, P. Dorfmüller, I. Durand-Gasselien, F. Capel, L. Bouchet-Delbos, A. Portier, A. Marfaing-Koka, R. Krzysiek, A.-C. Rimaniol, G. Simonneau, D. Emilie, and M. Humbert, "CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 165, no. 10, pp. 1419–25, May 2002.
- [52] P. Herve, M. Humbert, O. Sitbon, F. Parent, H. Nunes, C. Legal, G. Garcia, and G. Simonneau, "Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis.," *Clin. Chest Med.*, vol. 22, no. 3, pp. 451–8, Sep. 2001.
- [53] N. Galiè, A. Torbicki, R. Barst, P. Dartevelle, S. Haworth, T. Higenbottam, H. Olschewski, A. Peacock, G. Pietra, L. J. Rubin, G. Simonneau, S. G. Priori, M. A. A. Garcia, J.-J. Blanc, A. Budaj, M. Cowie, V. Dean, J. Deckers, E. F. Burgos, J. Lekakis, B. Lindahl, G. Mazzotta, K. McGregor, J. Morais, A. Oto, O. A. Smiseth, J. A. Barbera, S. Gibbs, M. Hoeper, M. Humbert, R. Naeije, and J. Pepke-Zaba, "Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology.," *Eur. Heart J.*, vol. 25, no. 24, pp. 2243–78, Dec. 2004.
- [54] M. Leschke, a Wädlich, S. Waldenmaier, and M. Faehling, "[Diagnostics in pulmonary hypertension].," *Internist (Berl.)*, vol. 50, no. 9, pp. 1086, 1088–90, 1092–100, Sep. 2009.
- [55] C. P. Denton, J. B. Cailles, G. D. Phillips, A. U. Wells, C. M. Black, and R. M. Bois, "Comparison of Doppler echocardiography and right heart catheterization to assess pulmonary hypertension in systemic sclerosis.," *Br. J. Rheumatol.*, vol. 36, no. 2, pp. 239–43, Feb. 1997.

- [56] J. L. Vachiéry, S. Brimiouille, V. Crasset, and R. Naeije, "False-positive diagnosis of pulmonary hypertension by Doppler echocardiography.," *Eur. Respir. J.*, vol. 12, no. 6, pp. 1476–8, Dec. 1998.
- [57] J. S. Fritz, C. Blair, R. J. Oudiz, C. Dufton, H. Olschewski, D. Despain, H. Gillies, and S. M. Kawut, "Baseline and follow-up 6-min walk distance and brain natriuretic peptide predict 2-year mortality in pulmonary arterial hypertension.," *Chest*, vol. 143, no. 2, pp. 315–23, Feb. 2013.
- [58] N. Nagaya, T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, S. Kyotani, F. Sakamaki, M. Kakishita, K. Fukushima, Y. Okano, N. Nakanishi, K. Miyatake, and K. Kangawa, "Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension.," *Circulation*, vol. 102, no. 8, pp. 865–70, Aug. 2000.
- [59] R. Voswinckel, F. Reichenberger, H. Gall, W. Seeger, F. Grimminger, and H. a. Ghofrani, "[Therapy of pulmonary arterial hypertension].," *Internist (Berl)*., vol. 50, no. 9, pp. 1101–2, 1104–9, Sep. 2009.
- [60] K. M. Olsson, M. Delcroix, H. A. Ghofrani, H. Tiede, D. Huscher, R. Speich, E. Grünig, G. Staehler, S. Rosenkranz, M. Halank, M. Held, T. J. Lange, J. Behr, H. Klose, M. Claussen, R. Ewert, C. F. Opitz, C. D. Vizza, L. Scelsi, A. Vonk-Noordegraaf, H. Kaemmerer, J. S. R. Gibbs, G. Coghlan, J. Pepke-Zaba, U. Schulz, M. Gorenflo, D. Pittrow, and M. M. Hoeper, "Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: Results from the comparative, prospective registry of newly initiated therapies for pulmonary hypertension (COMPERA)," *Circulation*, vol. 129, pp. 57–65, 2014.
- [61] V. V. McLaughlin and S. Rich, "Pulmonary hypertension.," *Curr. Probl. Cardiol.*, vol. 29, no. 10, pp. 575–634, Oct. 2004.
- [62] D. G. Papamatheakis and N. H. Kim, "Advances in the Management of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 17, no. 9, p. 582, Sep. 2015.
- [63] Y. Bai, L. Sun, S. Hu, and Y. Wei, "Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis.," *Cardiology*, vol. 120, no. 3, pp. 157–65, Jan. 2011.
- [64] M. J. Richter, H. Gall, K. Tello, N. Sommer, W. Seeger, F. Grimminger, and H. a. Ghofrani, "Medikamentöse Therapie der pulmonalen Hypertonie: Was ist neu?," *Internist*, vol. 56, no. 5, pp. 573–582, 2015.
- [65] J. Wharton, N. Davie, P. D. Upton, M. H. Yacoub, J. M. Polak, and N. W. Morrell, "Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells.," *Circulation*, vol. 102, no. 25, pp. 3130–6, Dec. 2000.
- [66] R. Li, T. Cindrova-Davies, J. N. Skepper, and L. A. Sellers, "Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor.," *Circ. Res.*, vol. 94, no. 6, pp. 759–67, Apr. 2004.
- [67] N. Galiè, P. A. Corris, A. Frost, R. E. Girgis, J. Granton, Z. C. Jing, W. Klepetko, M. D. McGoon, V. V. McLaughlin, I. R. Preston, L. J. Rubin, J. Sandoval, W. Seeger, and A. Keogh, "Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, no. 25 Suppl, pp. D60–72, Dec. 2013.
- [68] N. Galiè, H. Olschewski, R. J. Oudiz, F. Torres, A. Frost, H. A. Ghofrani, D. B. Badesch, M. D. McGoon, V. V. McLaughlin, E. B. Roecker, M. J. Gerber, C. Dufton, B. L. Wiens, and L. J. Rubin, "Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2.," *Circulation*, vol. 117, no. 23, pp. 3010–9, Jun. 2008.
- [69] H. A. Ghofrani, R. Wiedemann, F. Rose, N. Weissmann, R. T. Schermuly, K. Quanz, F. Grimminger, W. Seeger, and H. Olschewski, "Lung cGMP release subsequent to NO inhalation in pulmonary hypertension: responders versus nonresponders.," *Eur. Respir. J.*, vol. 19, no. 4, pp. 664–71, Apr. 2002.

- [70] J. Wharton, J. W. Strange, G. M. O. Møller, E. J. Growcott, X. Ren, A. P. Franklyn, S. C. Phillips, and M. R. Wilkins, "Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 172, no. 1, pp. 105–13, Jul. 2005.
- [71] H.-A. Ghofrani, N. Galiè, F. Grimminger, E. Grünig, M. Humbert, Z.-C. Jing, A. M. Keogh, D. Langleben, M. O. Kilama, A. Fritsch, D. Neuser, and L. J. Rubin, "Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 4, pp. 330–40, Jul. 2013.
- [72] M. M. Hoeper, V. V McLaughlin, A. M. Al Dalaan, T. Satoh, and N. Galiè, "Treatment of pulmonary hypertension.," *Lancet. Respir. Med.*, vol. 4, no. 4, pp. 323–336, Mar. 2016.
- [73] A. Seferian and G. Simonneau, "Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow?," *Eur. Respir. Rev.*, vol. 22, no. 129, pp. 217–26, Sep. 2013.
- [74] "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework.," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 69, no. 3, pp. 89–95, Mar. 2001.
- [75] G. H. Guyatt, P. X. Tugwell, D. H. Feeny, R. B. Haynes, and M. Drummond, "A framework for clinical evaluation of diagnostic technologies.," *CMAJ*, vol. 134, no. 6, pp. 587–94, Mar. 1986.
- [76] M. S. Pepe, R. Etzioni, Z. Feng, J. D. Potter, M. Lou, M. Thornquist, M. Winget, Y. Yasui, and I. Ntroduction, "Phases of Biomarker Development for Early Detection of Cancer OF," vol. 93, no. 14, pp. 1054–1061, 2001.
- [77] P. E. Barker, "Cancer biomarker validation: standards and process: roles for the National Institute of Standards and Technology (NIST).," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 983, pp. 142–50, Mar. 2003.
- [78] W. G. Woods, M. Tuchman, L. L. Robison, M. Bernstein, J. M. Leclerc, L. C. Brisson, J. Brossard, G. Hill, J. Shuster, R. Luepker, T. Byrne, S. Weitzman, G. Bunin, and B. Lemieux, "A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma.," *Lancet*, vol. 348, no. 9043, pp. 1682–7, Jan. .
- [79] V. Foris, G. Kovacs, M. Tscherner, A. Olschewski, and H. Olschewski, "Biomarkers in pulmonary hypertension: what do we know?," *Chest*, vol. 144, no. 1, pp. 274–83, Jul. 2013.
- [80] M. Gorenflo, M. Bettendorf, H. E. Ulmer, and K. Brockmeier, "Oxygen-mediated pulmonary vasodilation and plasma levels of endothelin-1, atrial natriuretic peptide and cyclic GMP in patients with left-to-right shunt and pulmonary hypertension.," *Z. Kardiol.*, vol. 89, no. 2, pp. 100–8, Feb. 2000.
- [81] N. Nagaya, M. Ando, H. Oya, Y. Ohkita, S. Kyotani, F. Sakamaki, and N. Nakanishi, "Plasma brain natriuretic peptide as a noninvasive marker for efficacy of pulmonary thromboendarterectomy.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 74, no. 1, pp. 180–4; discussion 184, Jul. 2002.
- [82] G.-J. Mauritz, D. Rizopoulos, H. Groepenhoff, H. Tiede, J. Felix, P. Eilers, J. Bosboom, P. E. Postmus, N. Westerhof, and A. Vonk-Noordegraaf, "Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension.," *Am. J. Cardiol.*, vol. 108, no. 11, pp. 1645–50, Dec. 2011.
- [83] V. V McLaughlin, R. L. Benza, L. J. Rubin, R. N. Channick, R. Voswinckel, V. F. Tapson, I. M. Robbins, H. Olschewski, M. Rubenfire, and W. Seeger, "Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 55, no. 18, pp. 1915–22, May 2010.
- [84] A. Torbicki, M. Kurzyna, P. Kuca, A. Fijałkowska, J. Sikora, M. Florczyk, P. Pruszczyk, J. Burakowski, and L. Wawrzyńska, "Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension.," *Circulation*, vol. 108, no. 7, pp. 844–8, Aug. 2003.
- [85] R. Quarck, T. Nawrot, B. Meyns, and M. Delcroix, "C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension.," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 53, no. 14, pp. 1211–8, Apr. 2009.

- [86] S. M. Kawut, E. M. Horn, K. K. Berekashvili, A. C. Widlitz, E. B. Rosenzweig, and R. J. Barst, "von Willebrand factor independently predicts long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension.," *Chest*, vol. 128, no. 4, pp. 2355–62, Oct. 2005.
- [87] N. Nickel, T. Kempf, H. Tapken, J. Tongers, F. Laenger, U. Lehmann, H. Golpon, K. Olsson, M. R. Wilkins, J. S. R. Gibbs, M. M. Hoeper, and K. C. Wollert, "Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 178, no. 5, pp. 534–41, Sep. 2008.
- [88] C. A. Meadows, M. G. Risbano, L. Zhang, M. W. Geraci, R. M. Tuder, D. H. Collier, and T. M. Bull, "Increased expression of growth differentiation factor-15 in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension.," *Chest*, vol. 139, no. 5, pp. 994–1002, May 2011.
- [89] E. Soon, A. M. Holmes, C. M. Treacy, N. J. Doughty, L. Southgate, R. D. Machado, R. C. Trembath, S. Jennings, L. Barker, P. Nicklin, C. Walker, D. C. Budd, J. Pepke-Zaba, and N. W. Morrell, "Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension.," *Circulation*, vol. 122, no. 9, pp. 920–7, Aug. 2010.
- [90] N. Selimovic, C.-H. Bergh, B. Andersson, E. Sakiniene, H. Carlsten, and B. Rundqvist, "Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension.," *Eur. Respir. J.*, vol. 34, no. 3, pp. 662–8, Sep. 2009.
- [91] B. J. Rollins, "Chemokines," *Blood*, vol. 90, no. 3, pp. 909–928, Aug. 1997.
- [92] A. D. Luster, "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 338, no. 7, pp. 436–45, Feb. 1998.
- [93] E. Porreca, C. Di Febbo, M. Reale, M. L. Castellani, G. Baccante, R. Barbacane, P. Conti, F. Cuccurullo, and A. Poggi, "Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells.," *J. Vasc. Res.*, vol. 34, no. 1, pp. 58–65, Jan. .
- [94] S. Denger, L. Jahn, P. Wende, L. Watson, S. H. Gerber, W. Kübler, and J. Kreuzer, "Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype: a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis.," *Atherosclerosis*, vol. 144, no. 1, pp. 15–23, May 1999.
- [95] K. S. Weber, P. J. Nelson, H. J. Gröne, and C. Weber, "Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, no. 9, pp. 2085–93, Sep. 1999.
- [96] A. Schober and A. Zerneck, "Chemokines in vascular remodeling," pp. 730–737, 2007.
- [97] M. B. Taubman, B. J. Rollins, M. Poon, J. Marmur, R. S. Green, B. C. Berk, and B. Nadal-Ginard, "JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells.," *Circ. Res.*, vol. 70, no. 2, pp. 314–25, Feb. 1992.
- [98] U. O. Wenzel, B. Fouqueray, G. Grandaliano, Y. S. Kim, C. Karamitsos, A. J. Valente, and H. E. Abboud, "Thrombin regulates expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular smooth muscle cells.," *Circ. Res.*, vol. 77, no. 3, pp. 503–9, Sep. 1995.
- [99] G. A. Ferns, E. W. Raines, K. H. Sprugel, A. S. Motani, M. A. Reidy, and R. Ross, "Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.," *Science*, vol. 253, no. 5024, pp. 1129–32, Sep. 1991.
- [100] H. M. Groves, R. L. Kinlough-Rathbone, M. Richardson, L. Jørgensen, S. Moore, and J. F. Mustard, "Thrombin generation and fibrin formation following injury to rabbit neointima. Studies of vessel wall reactivity and platelet survival.," *Lab. Invest.*, vol. 46, no. 6, pp. 605–12, Jun. 1982.
- [101] Y. Furukawa, A. Matsumori, N. Ohashi, T. Shioi, K. Ono, A. Harada, K. Matsushima, and S. Sasayama, "Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries.," *Circ. Res.*, vol. 84, no. 3, pp. 306–14, Feb. 1999.

- [102] A. Schober, A. Zerneck, E. A. Liehn, P. von Hundelshausen, S. Knarren, W. A. Kuziel, and C. Weber, "Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets.," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 11, pp. 1125–33, Nov. 2004.
- [103] H. Kimura, Y. Kasahara, K. Kurosu, K. Sugito, Y. Takiguchi, M. Terai, A. Mikata, M. Natsume, N. Mukaida, K. Matsushima, and T. Kuriyama, "Alleviation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by antibodies to monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1.," *Lab. Invest.*, vol. 78, no. 5, pp. 571–81, May 1998.
- [104] Y. Ikeda, Y. Yonemitsu, C. Kataoka, S. Kitamoto, T. Yamaoka, K.-I. Nishida, A. Takeshita, K. Egashira, and K. Sueishi, "Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary hypertension in rats.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 283, no. 5, pp. H2021–8, Nov. 2002.
- [105] S. Ylä-Herttuala, B. A. Lipton, M. E. Rosenfeld, T. Särkioja, T. Yoshimura, E. J. Leonard, J. L. Witztum, and D. Steinberg, "Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 12, pp. 5252–6, Jun. 1991.
- [106] K. Egashira, "Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1.," *Hypertension*, vol. 41, no. 3 Pt 2, pp. 834–41, Mar. 2003.
- [107] K. Egashira, "Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease.," *Circ. J.*, vol. 66, no. 6, pp. 529–33, Jun. 2002.
- [108] S. Kitamoto, K. Egashira, and A. Takeshita, "Stress and vascular responses: anti-inflammatory therapeutic strategy against atherosclerosis and restenosis after coronary intervention.," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 91, no. 3, pp. 192–6, Mar. 2003.
- [109] F. Cipollone, M. Marini, M. Fazio, B. Pini, A. Iezzi, M. Reale, L. Paloscia, G. Materazzo, E. D'Annunzio, P. Conti, F. Chiarelli, F. Cuccurullo, and A. Mezzetti, "Elevated Circulating Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Patients With Restenosis After Coronary Angioplasty," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, no. 3, pp. 327–334, Mar. 2001.
- [110] M. David-Dufilho, E. Millanvoeye-Van Brussel, G. Topal, L. Walch, A. Brunet, and F. Rendu, "Endothelial thrombomodulin induces Ca²⁺ signals and nitric oxide synthesis through epidermal growth factor receptor kinase and calmodulin kinase II.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 43, pp. 35999–6006, Oct. 2005.
- [111] W. G. Owen and C. T. Esmon, "Functional properties of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C.," *J. Biol. Chem.*, vol. 256, no. 11, pp. 5532–5, Jun. 1981.
- [112] J. Ye, L. Liu, C. Esmon, and A. Johnson, "The fifth and sixth growth factor-like domains of thrombomodulin bind to the anion-binding exosite of thrombin and alter its specificity," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 16, pp. 11023–11028, Jun. 1992.
- [113] C. T. Esmon, "The Protein C Pathway," *CHEST J.*, vol. 124, no. 3_suppl, p. 26S, Sep. 2003.
- [114] J. E. Sadler, "Thrombomodulin structure and function.," *Thromb. Haemost.*, vol. 78, no. 1, pp. 392–5, Jul. 1997.
- [115] A. Chaouat, E. Weitzenblum, and T. Higenbottam, "The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension.," *Eur. Respir. J.*, vol. 9, no. 2, pp. 356–63, Feb. 1996.
- [116] Y. Yamada, J. Maruyama, E. Zhang, and A. Okada, "Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension," 2013.

- [117] F. Sakamaki, S. Kyotani, N. Nagaya, and N. Sato, "Increased Plasma P-Selectin and Decreased Thrombomodulin in Pulmonary Arterial Hypertension Were Improved by Continuous Prostacyclin Therapy," pp. 2720–2725, 2000.
- [118] S. Ohdama, S. Takano, S. Miyake, T. Kubota, K. Sato, and N. Aoki, "Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular diseases.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 101, no. 1, pp. 109–13, Jan. 1994.
- [119] P. Cacoub, M. Karmochkine, R. Dorent, P. Nataf, J. C. Piette, P. Godeau, I. Gandjbakhch, and M. C. Boffa, "Plasma levels of thrombomodulin in pulmonary hypertension.," *Am. J. Med.*, vol. 101, no. 2, pp. 160–4, Aug. 1996.
- [120] G. Cella, F. Vianello, F. Cozzi, H. Marotta, F. Tona, G. Saggiorato, O. Iqbal, and J. Fareed, "Effect of bosentan on plasma markers of endothelial cell activity in patients with secondary pulmonary hypertension related to connective tissue diseases.," *J. Rheumatol.*, vol. 36, no. 4, pp. 760–767, 2009.
- [121] S. Maeda, S. Takahashi, and M. Sato, "Serum thrombomodulin as a newly identified biomarker for postoperative lung injury: a prospective observational study.," *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 228, no. 2, pp. 135–41, Jan. 2012.
- [122] S. X. Leng, J. E. McElhane, J. D. Walston, D. Xie, N. S. Fedarko, and G. A. Kuchel, "ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research.," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 63, no. 8, pp. 879–84, Aug. 2008.
- [123] D. R. Cox, S. Society, and S. B. Methodological, "Regression Models and Life-Tables," *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, vol. 34, no. 2, pp. 187–220, 2007.
- [124] T. Itoh, N. Nagaya, H. Ishibashi-Ueda, S. Kyotani, H. Oya, F. Sakamaki, H. Kimura, and N. Nakanishi, "Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension.," *Respirology*, vol. 11, pp. 158–163, 2006.
- [125] H. Katsushi, N. Kazufumi, F. Hideki, M. Katsumasa, M. Hiroshi, K. Kengo, D. Hiroshi, S. Nobuyoshi, E. Tetsuro, M. Hiromi, and O. Tohru, "Epoprostenol Therapy Decreases Elevated Circulating Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Patients With Primary Pulmonary Hypertension," *Circ. J.*, vol. 68, no. 3, pp. 227–231, Feb. 2004.
- [126] B. Bakouboula, O. Morel, A. Faure, F. Zobairi, L. Jesel, A. Trinh, M. Zupan, M. Canuet, L. Grunebaum, A. Brunette, D. Desprez, F. Chabot, E. Weitzenblum, J.-M. Freyssinet, A. Chaouat, and F. Toti, "Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 177, no. 5, pp. 536–43, Mar. 2008.
- [127] M. Hasegawa, S. Sato, and K. Takehara, "Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 117, no. 1, pp. 159–65, Jul. 1999.
- [128] H. Kaneko, H. Ogasawara, T. Naito, H. Akimoto, S. Lee, T. Hishikawa, I. Sekigawa, Y. Tokano, Y. Takasaki, S. I. Hirose, and H. Hashimoto, "Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus.," *J. Rheumatol.*, vol. 26, no. 3, pp. 568–73, Mar. 1999.
- [129] T.-H. Hong, C.-H. Chang, W.-J. Ko, C.-F. Lin, H.-H. Liu, L.-P. Chow, C.-T. Huang, S.-L. Yu, and Y.-S. Chen, "Biomarkers of early sepsis may be correlated with outcome.," *J. Transl. Med.*, vol. 12, no. 1, p. 146, Jan. 2014.
- [130] T. Ueland, L. Gullestad, S. H. Nymo, A. Yndestad, P. Aukrust, and E. T. Askevold, "Inflammatory cytokines as biomarkers in heart failure.," *Clin. Chim. Acta.*, Sep. 2014.
- [131] J. D. Fontes, J. F. Yamamoto, M. G. Larson, N. Wang, D. Dallmeier, M. Rienstra, R. B. Schnabel, R. S. Vasan, J. F. Keaney, and E. J. Benjamin, "Clinical correlates of change in inflammatory biomarkers: The Framingham Heart Study.," *Atherosclerosis*, vol. 228, no. 1, pp. 217–23, May 2013.

- [132] R. C. Hoogeveen, A. Morrison, E. Boerwinkle, J. S. Miles, C. E. Rhodes, A. R. Sharrett, and C. M. Ballantyne, "Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study.," *Atherosclerosis*, vol. 183, no. 2, pp. 301–7, Dec. 2005.
- [133] J. A. de Lemos, D. A. Morrow, M. S. Sabatine, S. A. Murphy, C. M. Gibson, E. M. Antman, C. H. McCabe, C. P. Cannon, and E. Braunwald, "Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes.," *Circulation*, vol. 107, no. 5, pp. 690–5, Feb. 2003.
- [134] J. M. Cheng, R. M. Oemrawsingh, K. M. Akkerhuis, H. M. Garcia-Garcia, S. P. M. de Boer, L. C. Battes, N. Buljubasic, M. J. Lenzen, P. P. T. de Jaegere, R.-J. van Geuns, P. W. Serruys, I. Kardys, and E. Boersma, "Circulating chemokines in relation to coronary plaque characteristics on radiofrequency intravascular ultrasound and cardiovascular outcome.," *Biomarkers*, vol. 19, no. 7, pp. 611–9, Nov. 2014.
- [135] A. Tournier, D. Wahl, A. Chaouat, J.-P. Max, V. Regnault, T. Lecompte, and F. Chabot, "Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension.," *Thromb. Res.*, vol. 126, no. 6, pp. e418–22, Dec. 2010.
- [136] C. H. Welsh, K. L. Hassell, D. B. Badesch, D. C. Kressin, and R. A. Marlar, "Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension.," *Chest*, vol. 110, no. 3, pp. 710–7, Sep. 1996.
- [137] K. L. Hassell, "Altered hemostasis in pulmonary hypertension.," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 9, no. 2, pp. 107–17, Mar. 1998.
- [138] R. Phankingthongkum, V. Thamlikitkul, D. Jakrapanichakul, and S. Udompanthurak, "Changes in hematologic markers in patients with mitral stenosis after successful percutaneous balloon mitral valvuloplasty.," *J. Med. Assoc. Thai.*, vol. 87, no. 6, pp. 594–9, Jun. 2004.
- [139] I. Welters, T. Menges, M. Ballesteros, C. Knothe, R. Ruwoldt, G. Görlach, and G. Hempelmann, "Thrombin Generation and Activation of the Thrombomodulin Protein C System in Open Heart Surgery Depend on the Underlying Cardiac Disease," *Thromb. Res.*, vol. 92, no. 1, pp. 1–9, Oct. 1998.
- [140] A. Y. Chong, B. S. P. Chin, A. D. Blann, and G. Y. H. Lip, "Effects of antiplatelet therapy and oral anticoagulation on indices of endothelial damage/dysfunction in patients with systolic heart failure in sinus rhythm.," *Thromb. Res.*, vol. 116, no. 2, pp. 181–3, Jan. 2005.
- [141] J. Hurdman, R. Condliffe, C. a. Elliot, C. Davies, C. Hill, J. M. Wild, D. Capener, P. Sephton, N. Hamilton, I. J. Armstrong, C. Billings, a. Lawrie, I. Sabroe, M. Akil, L. O'Toole, and D. G. Kiely, "ASPIRE registry: Assessing the Spectrum of Pulmonary hypertension Identified at a," *Eur. Respir. J.*, vol. 39, no. 4, pp. 945–955, 2012.
- [142] N. H. Kim, M. Delcroix, D. P. Jenkins, R. Channick, P. Darteville, P. Jansa, I. Lang, M. M. Madani, H. Ogino, V. Pengo, and E. Mayer, "Chronic thromboembolic pulmonary hypertension," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, no. 25, 2013.
- [143] P. Van Dreden, B. Woodhams, A. Rousseau, J.-F. Dreyfus, and M. Vasse, "Contribution of procoagulant phospholipids, thrombomodulin activity and thrombin generation assays as prognostic factors in intensive care patients with septic and non-septic organ failure.," *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 51, no. 2, pp. 387–96, Feb. 2013.
- [144] D. M. Mihajlovic, D. F. Lendak, B. G. Draskovic, A. S. Novakov Mikic, G. P. Mitic, T. N. Cebovic, and S. V Brkic, "Thrombomodulin is a Strong Predictor of Multiorgan Dysfunction Syndrome in Patients With Sepsis.," *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2013.
- [145] P. Van Dreden, A. Rousseau, A. Savoure, B. Lenormand, S. Fontaine, and M. Vasse, "Plasma thrombomodulin activity, tissue factor activity and high levels of circulating procoagulant phospholipid as prognostic factors for acute myocardial infarction.," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 20, no. 8, pp. 635–41, Dec. 2009.

- [146] G. a Heresi, "Clinical perspective: biomarkers in pulmonary arterial hypertension.," *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*, vol. 65, no. January, pp. 5–7, 2011.

9 Danksagung

Mein vornehmlicher Dank geht an Herrn Professor Dr. med. Ghofrani für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die wissenschaftlichen Anstöße und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Dr. med. Dr. Henning Gall für die immerwährende Unterstützung, vor allem bei der statistischen Auswertung, sowie sein jederzeit offenes Ohr für meine Fragen.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Svenja Tiede für die geduldige Einarbeitung im BFS, sowie die wichtigen Anregungen zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Vielen Dank an das gesamte Team der PH-Ambulanz und meine Doktoranden-Kollegen, vor allem aber an Susanne Wissgott, für die gute Zusammenarbeit im RHK.

Der größte Dank geht an meine Eltern! Vielen Dank für die großzügige Unterstützung und eure antreibenden Worte. Danke auch an meine Brüder und meine Großmutter, die nie an der Fertigstellung dieser Arbeit gezweifelt haben.

Für die herzliche Unterstützung von Anfang an danke ich auch Familie Juntermanns.

Nicht zuletzt, ein riesiges Dankeschön an Benjamin, für deinen fachlichen und humorvollen Beitrag zur Fertigstellung dieser Arbeit. Vielen Dank für unsere gemeinsamen Jahre.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.