

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Sektion Pneumologie

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Serologisch und nicht-invasiv bestimmte Endothelfunktion mittels EndoPat2000-System von Patienten mit Pulmonal arterieller Hypertonie und Chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertonie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Britta Karen Trochelmann
aus Hamburg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.06.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. R. Schnabel

INHALTSVERZEICHNIS

0	Arbeitshypothese und Fragestellung	7
1	Einleitung	9
1.1	Pulmonale Hypertonie	9
1.1.1	Definition der Pulmonalen Hypertonie und Klassifikation	9
1.1.2	Epidemiologie	12
1.1.3	Pathophysiologie und -genese.....	12
1.1.3.1	PAH.....	12
1.1.3.1.1	Vasokonstriktion	13
1.1.3.1.2	Vaskuläres Remodeling.....	14
1.1.3.1.3	In-situ-Thrombosen	15
1.1.3.2	CTEPH	15
1.1.4	Diagnostik der PAH und CTEPH.....	16
1.1.5	Therapie	18
1.1.5.1	PAH.....	18
1.1.5.1.1	Allgemeine Maßnahmen.....	18
1.1.5.1.2	Unterstützende Therapie	18
1.1.5.1.3	PAH-spezifische Substanzklassen	19
1.1.5.1.4	Chirurgisch	20
1.1.5.2	CTEPH	21
1.1.5.2.1	Pulmonale Endarterektomie (PEA)	21
1.1.5.2.2	Medikamentös	21
1.2	Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel	22
1.2.1	Stickstoffmonoxid (NO).....	22
1.2.2	Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)	22
1.2.3	Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA)	23
1.2.4	L-Arginin	24
1.2.5	Homoarginin	25

2	Patienten und Methoden	26
2.1	Studienprotokoll	26
2.1.1	Patientenkollektiv	26
2.1.2	Gesunde Kontrollprobanden	27
2.1.3	Untersuchungen im Rahmen der Studie	27
2.1.3.1	Patienten	27
2.1.3.2	Gesunde Probanden	28
2.1.4	Zusätzlich erfasste Basis- und Prognoseparameter	28
2.1.4.1	Studienpatienten	28
2.1.4.2	Gesunde Probanden	29
2.1.5	Endpunkte der Studie	29
2.2	Beschreibung der Studienuntersuchungen	30
2.2.1	Vorbereitung der Patienten und Probanden	30
2.2.2	EndoPat2000-System	30
2.2.3	Biomarkerbestimmung	33
2.2.3.1	Gewinnung der Blutproben	33
2.2.3.2	Analyseverfahren mit LC-MS/MS	33
2.2.3.2.1	Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin	33
2.2.3.2.2	Bestimmung von Homoarginin	35
2.3	Die statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Einleitung	37
3.2	Studienpopulation	38
3.2.1	Baseline-Parameter	38
3.2.1.1	Charakteristika und Häufigkeitsverteilung der Studienpopulation	38
3.2.1.2	Hämodynamische Parameter	40
3.2.1.3	Begleiterkrankungen des Studienkollektivs	41
3.2.1.4	PAH-spezifische Medikation des Studienkollektivs	42
3.2.1.5	Serologische Parameter	42
3.2.1.6	Etablierte PH-Prognoseparameter	44
3.2.2	Überblick der Follow-Up-Messungen	46

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.1	PH-Prognoseparameter im Verlauf	47
3.3	Reactive Hyperemia Index.....	48
3.3.1	Baseline-Werte	48
3.3.2	RHI und etablierte PH-Prognoseparameter	50
3.3.2.1	RHI und NYHA-Stadium	50
3.3.2.2	RHI und 6-Minuten-Gehtest.....	51
3.3.2.3	RHI und Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität	52
3.3.2.4	RHI und kapilläre Blutgasanalyse	53
3.3.2.5	RHI und NT-proBNP-Konzentration	53
3.3.2.6	RHI und echokardiografische Parameter	54
3.3.2.7	RHI und hämodynamische Parameter	54
3.3.3	RHI im Verlauf	55
3.3.3.1	Überblick der Werte im Verlauf	55
3.3.3.2	RHI und Clinical Worsening und Überleben.....	56
3.4	Biomarker der endothelialen Dysfunktion.....	58
3.4.1	Baseline Werte	58
3.4.2	Biomarker und etablierte PH-Prognoseparameter	60
3.4.2.1	Biomarker und NYHA-Stadium	60
3.4.2.2	Biomarker und 6-Minuten-Gehtest.....	61
3.4.2.3	Biomarker und Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität	62
3.4.2.4	Biomarker und kapilläre Blutgasanalyse	63
3.4.2.5	Biomarker und NT-proBNP-Konzentration	64
3.4.2.6	Biomarker und echokardiografische Parameter	65
3.4.2.7	Biomarker und hämodynamische Parameter	66
3.4.3	Biomarker im Verlauf	66
3.4.3.1	Überblick der Werte im Verlauf	66
3.4.3.2	Biomarker und Clinical Worsening und Überleben.....	67
3.5	Reactive Hyperemia Index und Biomarker	69
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4	Diskussion.....	72
4.1	Einordnung der Thematik.....	72
4.2	Diskussion der Studienergebnisse	74

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	These 1: Die periphere Endothelfunktion bei PAH-/CTEPH-Patienten ist schlechter als bei gesunden Kontrollprobanden	74
4.2.1.1	RHI als Parameter der Endothelfunktion.....	74
4.2.1.1.1	Baseline-Werte.....	74
4.2.1.1.2	Korrelation mit Prognoseparametern	77
4.2.1.1.3	Assoziation mit Überleben/TtCW	79
4.2.1.1.4	Zusammenfassung.....	80
4.2.1.2	Biomarker als Parameter der Endothelfunktion.....	81
4.2.1.2.1	Baseline-Werte.....	81
4.2.1.2.2	Korrelation mit Prognoseparametern	84
4.2.1.2.3	Assoziation mit Überleben/TtCW	88
4.2.1.2.4	Zusammenfassung.....	90
4.2.1.3	Zusammenhang von RHI und Biomarkern	90
4.2.2	These 2: Die medikamentöse PAH-spezifische Therapie verbessert die Endothelfunktion	92
4.2.2.1	RHI als Parameter der Endothelfunktion.....	92
4.2.2.2	Biomarker als Parameter der Endothelfunktion.....	94
4.3	Fehlerquellen und Limitationen der Studie	95
4.4	Ausblick und Schlussfolgerung	97
5	Zusammenfassung.....	98
6	Summary	100
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	101
8	Abkürzungsverzeichnis	105
9	Literaturverzeichnis	109
10	Danksagung.....	123
11	Lebenslauf	124
12	Eidesstattliche Versicherung	125

0 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Die Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist eine seltene Erkrankung mit schlechter Prognose. Erhöhte Druckverhältnisse im Lungenkreislauf führen zu Rechtsherzbelastung, Rechtsherzversagen und schließlich zum Tod (Galie et al. 2009b, Humbert et al. 2004, Humbert et al. 2010, Mocumbi et al. 2015). Der genaue zugrunde liegende Pathomechanismus ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch spielen vaskuläre Veränderungen und vor allem eine Dysfunktion des Endothels eine zentrale Rolle. Obwohl in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit für die PAH gestiegen ist und die Prognose der Patienten sich seither verbessert hat, bleibt die PAH eine unheilbare Erkrankung mit geringer Lebenserwartung und stark eingeschränkter Lebensqualität (Humbert et al. 2010, Mocumbi et al. 2015, Olschewski und Seeger 2002, Rosenkranz 2014).

Die unspezifische Symptomatik insbesondere im frühen Stadium, die ungenügende Informationslage auf Seiten der Mediziner (Olschewski und Seeger 2002) sowie der aufwändige diagnostische Algorithmus führen meist zu einer späten Diagnose der PAH. Eine unabdingbare Maßnahme zur Verifizierung der Verdachtsdiagnose ist die invasive Rechtsherzkatheteruntersuchung. Zur Erhöhung der Vortestwahrscheinlichkeit und somit Vermeidung „unnötiger“ Rechtsherzkatheteruntersuchungen wäre es wünschenswert, weitere, vor allem nicht-invasive Untersuchungsverfahren zu etablieren. Dazu werden in dieser Arbeit vier kardiovaskuläre Biomarker (ADMA, SDMA, L-Arginin, Homoarginin) bewertet. Mittels eines nicht-invasiven Verfahrens (EndoPat2000-System) wird zudem die Endothelfunktion im Kontext der PAH untersucht. Dies soll einerseits zum besseren Verständnis des Erkrankungsmechanismus führen. Andererseits wird die Möglichkeit einer Schweregradeinteilung der PAH anhand der Endothelfunktion geprüft.

Die therapeutischen Möglichkeiten bei PAH-Patienten sind limitiert. Das Therapieansprechen auf das Endothel und somit eines wichtigen pathophysiologischen Ursprungs dieser Erkrankung ist schlecht zu evaluieren. In dieser Arbeit soll daher außerdem der Therapieerfolg PAH-spezifischer Medikamente auf die Endothelfunktion mittels eines nicht-invasiven Verfahrens (EndoPat2000- System) untersucht werden.

Die zu überprüfenden Thesen dieser Studie lauten:

1. Die periphere Endothelfunktion bei PAH-/CTEPH-Patienten ist schlechter als bei gesunden Kontrollprobanden. Dazu werden Baseline-Werte der Patientengruppen mit gesunden Kontrollprobanden verglichen und die Endothelfunktion mit etablierten Prognoseparametern der PAH korreliert.

Arbeitshypothese und Fragestellung

2. Die medikamentöse PAH-spezifische Therapie verbessert die Endothelfunktion.
Dazu wird die Endothelfunktion von zunächst therapienaiven Patienten über ein Jahr unter PAH-spezifischer Therapie analysiert.

Zur Bewertung der Endothelfunktion werden der RHI (Ergebnis der EndoPat2000-Messung) sowie die Biomarker ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin untersucht.

1 EINLEITUNG

1.1 PULMONALE HYPERTONIE

1.1.1 Definition der Pulmonalen Hypertonie und Klassifikation

Die PH ist definiert durch eine Erhöhung des mittleren PAP auf ≥ 25 mmHg in Ruhe (Dorfmüller et al. 2003, Galie et al. 2009b, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Der PCWP unterscheidet zwischen prä- (≤ 15 mmHg) und postkapillärer PH (> 15 mmHg) (Galie et al. 2009b).

Ursprünglich wurde die PH in zwei Kategorien eingeteilt (Fauzi 2000), abhängig davon, ob es identifizierbare Risikofaktoren oder Ursachen gab (Olschewski und Seeger 2002, Simonneau et al. 2009). Einige Literaturquellen, auf die im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen wurde, verwendeten diese anfänglich gültige Einteilung:

- Primäre PH (PPH) (entspricht in etwa der Nizza-Gruppe 1) (Rose-Jones und McLaughlin 2015, Simonneau et al. 2009)
- Sekundäre PH (PH infolge einer Primärerkrankung).

Im fünf-Jahres-Rhythmus werden die Entwicklungen und Fortschritte in der Diagnostik und Therapie im Rahmen einer Weltkonferenz erörtert und darauf basierend werden internationale Leitlinien erarbeitet (Rosenkranz 2014). Seit 1998 (Weltkonferenz in Evian, Frankreich) erfolgt die PH-Klassifikation in fünf Gruppen (Simonneau et al. 2013). Die zum jetzigen Zeitpunkt geltende PH-Klassifikation orientiert sich an der jüngsten Konferenz in Nizza, Frankreich (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der PH nach Nizza 2013 (Simonneau et al. 2013)

1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) 1.1. Idiopathische PAH 1.2. Hereditäre PAH 1.2.1. BMPR2 1.2.2. ALK-1, ENG, Smad9, CAV1, KCNK3 1.2.3. Unbekannt 1.3. Medikamenten- oder toxininduziert 1.4. Assoziiert mit 1.4.1. Bindegewebserkrankung 1.4.2. HIV-Infektion 1.4.3. Portaler Hypertension 1.4.4. Angeborenem Herzfehler 1.4.5. Schistosomiasis 1' Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH) 1'' Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung 2.1. Linksventrikuläre systolische Dysfunktion 2.2. Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion 2.3. Klappenerkrankung 2.4. Kongenitale/ erworbene Ein-/ Ausflussostruktion des linken Herzens und kongenitale Kardiomyopathien
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie 3.1. Chronische obstruktive Lungenerkrankungen 3.2. Interstitielle Lungenerkrankung 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt restriktivem/ obstruktivem Muster 3.4. Schlafbezogene Atemstörungen 3.5. Alveoläre Hypoventilationssyndrome 3.6. Chronischer Aufenthalt in großer Höhe 3.7. Pulmonale Fehlentwicklungen
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen 5.1. Hämatologische Erkrankungen: chronisch-hämolytische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie 5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Lymphangioleiomatose 5.3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheiten, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen 5.4. Andere: tumoröse Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz, segmentale Pulmonale Hypertonie

BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor- 2, ALK-1 = activin receptor-like kinase 1, ENG= endoglin, Smad9 = mothers against decapentaplegic homolog 9, CAV = Caveolin 1, KCNK3 = Kalium-Kanal Subfamilie K Mitglied 3, HIV = human immunodeficiency virus

Die für diese Arbeit relevanten PH-Klassen sind **fett** gedruckt.

Einleitung

Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, hatten die Diagnose einer der folgenden Nizza-Klassen:

PAH

Die Pulmonal arterielle Hypertonie (Nizza-Klasse 1) ist definiert durch einen mittleren PAP ≥ 25 mmHg bei einem PCWP ≤ 15 mmHg und bei einem normalen oder reduzierten Herzzeitvolumen (Galie et al. 2009b). Bei positiver Familienanamnese für eine PH und nachweislichen genetischen Mutationen, meist Keimzell-Mutationen im *BMPR2*-Gen (Cogan et al. 2006), handelt es sich um eine hereditäre PAH. Eine Medikamenten- oder Toxin-induzierte PAH liegt vor, wenn Risikofaktoren vorhanden sind (definitive Risikofaktoren: Einnahme von Aminorex, Fenfluraminen, Desfenfluraminen oder toxischem Rapsöl (Simonneau et al. 2009)). Eine idiopathische PAH ist eine sporadische Erkrankung, welche nicht durch eine ursächliche Krankheit hervorgerufen wurde (Simonneau et al. 2009). Eine assoziierte PAH tritt in Zusammenhang mit einer HIV-Infektion, einer portalen Hypertension, einer rheumatologischen Grunderkrankung, angeborenen Herzfehlern sowie einer Schistosomiasis auf.

CTEPH

Die chronisch thromboembolische PH (Nizza-Klasse 4) tritt infolge chronischer pulmonaler thrombotischer Ereignisse auf (Rose-Jones und McLaughlin 2015). Sie ist definiert durch einen mittleren PAP ≥ 25 mmHg, einen PCWP ≤ 15 mmHg und einen PVR > 2 Wood units mit multiplen chronischen okklusiven Thromben/ Emboli in den Pulmonalarterien (Galie et al. 2009b).

Auf andere PH-Klassen wird in dieser Arbeit nicht eingegangen.

1.1.2 Epidemiologie

Die exakte Prävalenz der PH weltweit ist unbekannt (Mocumbi et al. 2015). Die PAH-Inzidenz beträgt 2,4 Fälle/1.000.000 Menschen/Jahr (Humbert et al. 2006) und die CTEPH tritt bei bis zu 4% der überlebenden Patienten nach einer akuten Lungenembolie auf und ist eine der prävalentesten PH-Formen (Galie et al. 2009b, Olschewski und Seeger 2002, Pengo et al. 2004).

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung einer PAH liegt bei 54 ± 18 Jahren (Humbert et al. 2010). Das Verhältnis von Frauen zu Männern war in einer Studie mit IPAH-Patienten 2,3:1 (Hoeper et al. 2013). Das Risiko einer Frau für eine PPH-Entwicklung ist nach einer Geburt um den Faktor 1,7 erhöht (Olschewski und Seeger 2002).

Die mediane Überlebenszeit von untherapierten PPH-Patienten betrug in einer Studie von D'Alonzo ab Diagnosestellung 2,8 Jahre (D'Alonzo et al. 1991). Eine aktuellere Studie ergab eine 73,6-prozentige Dreijahresüberlebenszeit (Hoeper et al. 2013) bei IPAH-Patienten. Laut Olschewski und Seeger ist die Überlebenszeit abhängig vom initialen mittleren PAP; sie beträgt 10% bzw. 50% bei einem mittleren PAP von 50 mmHg bzw. 30 mmHg (Olschewski und Seeger 2002).

1.1.3 Pathophysiologie und -genese

1.1.3.1 PAH

Die präkapilläre PH wird ausgelöst durch verschiedene Trigger-Faktoren (Inflammation, Hypoxie, mechanischer Stress, idiopathische Faktoren, Genmutationen), welche zu Vasokonstriktion und vaskulärem Remodeling in den kleinen Pulmonalarterien führen (Humbert et al. 2004, Jeffery und Morrell 2002, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Die pulmonalen Venen sind frei von Veränderungen (Galie et al. 2009b). Häufig tragen in situ-Thrombosen zur Verstärkung dieser Prozesse und damit zur Gefäßverdickung und -versteifung bei und es kommt zu einer Verkleinerung der vaskulären Querschnittsfläche (Olschewski und Seeger 2002, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Resultierend aus einer Dysfunktion und vermehrten Proliferation der Gefäßwandzellen kommt es zu chronischen Obstruktionen der Gefäße mit erhöhten Druckverhältnissen im Lungenkreislauf, welche zu Rechtsherzversagen und Tod führen (Galie et al. 2009b, Humbert et al. 2004, Humbert et al. 2010, Loscalzo 1992, Mocumbi et al. 2015).

Im Folgenden werden die drei wichtigsten zugrunde liegenden Mechanismen (Vasokonstriktion, Remodeling, Thrombosen) erläutert.

1.1.3.1.1 Vasokonstriktion

Die pulmonale Vasokonstriktion ist eine frühe Komponente im Krankheitsprozess der PAH (Humbert et al. 2004). Sie steht im Zusammenhang mit veränderten Kalium-Kanälen und einer endothelialen Dysfunktion (Galie et al. 2009b, Jeffery und Morrell 2002). Dadurch kommt es zu einer erniedrigten Produktion von Vasodilatoren (NO, Prostazyklin) durch das Endothel und einer erhöhten Freisetzung von Vasokonstriktoren (Thromboxan A2, Endothelin-1) (Galie et al. 2009b, Humbert et al. 2004, Jeffery und Morrell 2002). Vasokonstriktion, Proliferation, Thrombosierung und Inflammation werden begünstigt (Olschewski und Seeger 2002).

Es ist noch unklar, ob das Ungleichgewicht der Mediatoren eine Ursache oder das Ergebnis der PAH ist (Olschewski und Seeger 2002). Laut Olschewski und Seeger gibt es im Wesentlichen drei Mediator-Gruppen (Olschewski und Seeger 2002):

- 1) Vasokonstriktive und mitogene Wirkung: Endothelin-1, Thromboxan A2, Angiotensin II, Thrombin, PAF (platelet activating factor), Serotonin und weitere. Diese Substanzen liegen in erhöhter Konzentration bei der PAH vor (Humbert et al. 2004, Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002).
- 2) Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren: VEGF (Endothelzell-spezifisch; bewirkt abnorme Endothelzellproliferation und Neoangiogenese in plexiformen Läsionen), TNF, IL-1 und weitere. Diese Substanzen können bei der PAH in erhöhter Konzentration vorliegen (Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002).
- 3) Vasodilatative und antiproliferative Wirkung: Prostazyklin, NO und weitere. Diese Substanzen werden bei PAH-Patienten vermindert synthetisiert (Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002).

1.1.3.1.2 Vaskuläres Remodeling

Im Prozess der PAH-Entwicklung verändern sich alle Schichten der Gefäßwand (Endothel, Intima, Media, Adventitia) (Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002). Es treten folgende Veränderungen auf:

- Distale Muskularisierung von normalerweise nichtmuskulären Arterien (Humbert et al. 2004, Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002).
- Gesteigerte Muskularisierung von muskulären (proximalen) Pulmonalarterien bedingt durch erhöhten intraluminalen Druck (durch Vasokonstriktion und Remodeling in den kleinen peripheren Arterien) (Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002).
- Bildung einer „Neointima“ (Schicht aus Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix zwischen dem Endothel und der Lamina elastica externa) in kleinen und großen Arterien. Diese trägt in großem Maße zur PVR-Erhöhung bei (Galie et al. 2009b, Humbert et al. 2004, Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002).
- Bildung plexiformer Läsionen durch unorganisierte Endothelzell-Proliferation bei 80% der IPAH-Patienten (Cool et al. 1999, Galie et al. 2009b, Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002). Es bilden sich Kanäle aus Endothelzellen, Matrix-Proteinen und Myofibroblasten (Humbert et al. 2004).
- Inflammation: Einige PAH-Formen sind mit immunologischen Veränderungen assoziiert (zirkulierende Antikörper, erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen IL-1 und IL-6) (Dorfmüller et al. 2003, Humbert et al. 2004). Histologisch sind inflammatorische Infiltrate in Form von Makrophagen und Lymphozyten in der Umgebung von Gefäßläsionen und remodelierten Pulmonalarterien zu finden (Dorfmüller et al. 2003, Jeffery und Morrell 2002).

Die pulmonale Zirkulation ist normalerweise ein Niederdruck- Hochfluss-System mit vielen Reserve-Gefäßen, die nicht dauerhaft perfundiert und relativ dünnwandig sind (Jeffery und Morrell 2002). Die oben genannten Prozesse tragen allesamt zur Verdickung der Gefäßwände, Veränderung der normalen Gefäßschichten, weiteren Proliferationsanregung und infolgedessen Erhöhung der pulmonal-arteriellen Drücke und Gefäßwiderstände bei (Humbert et al. 2004, Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002). Das Gleichgewicht der Mediatoren verschiebt sich zu einem prothrombotischen Überschuss (Olschewski und Seeger 2002). Die Aktivität von Matrix-Metalloproteasen wird heraufreguliert, um die Migration von Fibroblasten in die Media und Intima zu ermöglichen (Humbert et al. 2004, Jeffery und Morrell 2002, Olschewski und Seeger 2002).

Die glatten Gefäßmuskelzellen der Media sezernieren Proteine der Extrazellulären Matrix, wodurch es auch zu Veränderungen in der Adventitia und der Intima kommt (Galie et al. 2009b, Olschewski und Seeger 2002). Durch die Gefäßwandverdickung kommt es zur Neovaskularisierung der Adventitia (und teilweise der Media), wodurch zirkulierende Vorläuferzellen die Gefäßwände erreichen können und die Remodeling-Prozesse wiederum beschleunigen (Humbert et al. 2004).

1.1.3.1.3 In-situ-Thrombosen

Eine der Hauptfunktionen des intakten Endothels ist die Verhinderung von Thrombenbildung (Jeffery und Morrell 2002). Bei der PAH ist diese Funktion beeinträchtigt und es kommt zu thrombotischen Läsionen, Thrombozyten-Dysfunktion und permanenter intravaskulärer Koagulation in den Pulmonalarterien (Galie et al. 2009b, Humbert et al. 2004). Zudem erzeugen Scherkräfte und Defekte der Lungengefäße eine thrombogene Oberfläche (Humbert et al. 2004). Thrombozyten dienen nicht nur zur Koagulation, sondern auch als Speicher für vasokonstriktive Mediatoren (z.B. Thromboxan A₂) (Humbert et al. 2004). Es ist noch unklar, ob Thrombosen und Plättchendysfunktion Ursachen oder Konsequenzen der PAH sind, jedenfalls treten Thromben in den Gefäßen auf, in denen auch das höchste Ausmaß an Remodeling zu finden ist (Humbert et al. 2004, Olschewski und Seeger 2002).

1.1.3.2 CTEPH

Die pathologische Läsion der CTEPH ist charakterisiert durch residuelle organisierte Thromben in den Pulmonalarterien (Galie et al. 2009b). In situ-Thromben und Emboli werden durch prothrombotische Veränderungen der Gerinnungskaskade und Dysfunktion der Endothelzellen und Thrombozyten nicht zersetzt und sie werden fibrotisch. Es kommt zur mechanischen Obstruktion der Gefäße. Auch PAH-charakteristische Läsionen und inflammatorische Infiltrate können vorhanden sein (Galie et al. 2009b).

1.1.4 Diagnostik der PAH und CTEPH

Orientiert an den Leitlinien der ESC (European Society of Cardiology) und ERS (European Respiratory Society) sollte der folgende Diagnose-Algorithmus für die PAH eingehalten werden (Galie et al. 2009b, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Dabei werden zunächst die häufigeren PH-Formen (Gruppe 2, 3 und 4) identifiziert und die Diagnosestellung der PAH erfolgt nach Ausschlussverfahren:

- *Anamnese und körperliche Untersuchung* (klinische Symptome s. unten).
- *EKG* (zum Ausschluss einer rechtsventrikulären Hypertrophie).
- *Transthorakale Echokardiografie (TTE)* (mit Doppler). Die TTE ist das initiale Instrument der PH-Diagnostik (Olschewski und Seeger 2002) und spielt auch in der Verlaufsbeurteilung eine zentrale Rolle. Ebenfalls dient es als Screening-Verfahren bei Risikopatienten (Patienten mit einer Bindegewebserkrankung, Familienangehörige 1. Grades von PPH-Patienten, Patienten mit Portaler Hypertension, HIV-Infizierte, Patienten mit i.v. Drogen-Abusus und nach Appetitzügler-Gebrauch (Olschewski und Seeger 2002)). Es ist eine Beurteilung des (geschätzten) PAP, der rechtsatrialen und der rechtsventrikulären Funktion und Größe sowie des rechten und linken Herzens möglich.
- In der *Ursachenforschung* sind verschiedene Untersuchungen erforderlich: *V/P-Szintigrafie* zum Ausschluss rezidivierender Lungenembolien, *Röntgen- und HR-CT-Aufnahmen* des Thorax und gegebenenfalls kardiale *MRT* zum Ausschluss der PH-Klassen 2 und 3, *Blutanalysen* (kleines und Differenzial-Blutbild, Antikörperbestimmung, HIV-Serologie, Leberfunktion, Schilddrüsenfunktion), *Lungenfunktionstest und Blutgasanalyse*, *Schlafapnoe-Screening*, *Sonografie* des Abdomens zum Ausschluss einer Lebererkrankung.
- Die *Rechtsherzkatheteruntersuchung* gilt als Goldstandard zur definitiven Diagnosestellung. Es kann der Schweregrad der hämodynamischen Einschränkung beurteilt werden und differenziert werden zwischen prä- und postkapillärer PH. Folgende Parameter sollten erfasst werden: Sauerstoffsättigung in den Pulmonalarterien, der Venae cavae inferior und superior sowie im rechten Vorhof und im rechten Ventrikel, RAP, RVP, systolischer, diastolischer und mittlerer PAP, PCWP, CI, PVR. Zudem sollte bei jeder diagnostischen Rechtsherzkatheteruntersuchung eines Patienten mit IPAH, hereditärer PAH oder drogeninduzierter PAH eine *Vasoreaktivitätstestung* erfolgen. Das Testmedikament der Wahl ist inhalatives Stickstoffmonoxid (außerdem zulässig: Adenosin i.v., Epoprostenol i.v., inhalatives Ilomedin). Bei einer Reduktion des mittleren PAP um mindestens 10 mmHg auf unter 40 mmHg und keiner gleichzeitigen Erniedrigung des CI gilt der Patient als Responder für orale

Einleitung

Kalziumkanal-Antagonisten (Olschewski und Seeger 2002, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Ein Therapieversuch mit Kalziumkanal-Antagonisten und eine Kontrolle des Therapieversuches einschließlich einer erneuten Rechtsherzkatheteruntersuchung sind indiziert (Galie et al. 2009b).

Eine (Re-) Evaluation des PH-Schweregrades und des Therapieverlaufs sollte alle drei bis sechs Monate anhand von Parametern mit prognostischem Wert (McLaughlin und McGoon 2006) erfolgen (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009b):

- Klinische Anzeichen von Rechtsherzversagen und gegebenenfalls Synkopen. Die rechtsventrikuläre Adaptation ist eine der wichtigsten Prognosefaktoren für PH-Patienten (Olschewski und Seeger 2002).
- Einschätzung der WHO-Funktionsklasse/ NYHA-Klasse (Olschewski und Seeger 2002, Rose-Jones und McLaughlin 2015):
 - o Stadium I: keine Einschränkung durch Bewegung.
 - o Stadium II: leichte Einschränkung (Dyspnoe, Brustschmerz) bei normaler Belastung.
 - o Stadium III: deutliche belastungsabhängige Einschränkung bei leichter als normaler Betätigung.
 - o Stadium IV: Einschränkungen auch in Ruhe und Auftreten von Synkopen.
- Beurteilung der Belastungskapazität: 6-Minuten-Gehtest (Erfassung der Gehstrecke, Dyspnoe, Sauerstoff-Sättigung), Spiroergometrie (Beurteilung von Gasaustausch und Ventilation).
- Biomarker-Analysen: NT-proBNP als Maß der rechtsventrikulären Funktion (Nagaya et al. 2000), Troponin T und I als Marker für akute pulmonale Embolien.
- Echokardiografie.
- Invasive Hämodynamik (Rechtsherzkatheteruntersuchung).

CTEPH-Diagnostik

Patienten, die eine akute Lungenembolie überlebt haben, sollten stets hinsichtlich einer CTEPH kontrolliert werden (Galie et al. 2009b). Ebenso sollten bei Patienten mit PH ungeklärter Genese eine Ventilations-Perfusions-Szintigrafie und eine CT-Angiografie durchgeführt werden. Bei positivem Ergebnis sollte der Patient an ein spezielles CTEPH-Zentrum überwiesen werden. Meist folgen eine Rechtsherzkatheteruntersuchung und eine traditionelle Pulmonalisangiografie zur Therapieentscheidung.

Klinische Symptome

Die Symptome sind unspezifisch (Galie et al. 2009b) und werden oftmals erst spät richtig eingeordnet. Belastungsabhängige Atemnot und generelle Müdigkeit sind frühe Symptome; außerdem können Brustschmerz, belastungsinduzierte Synkopen, trockener Husten, Raynaud-Phänomen, Lippen-Zyanose, erhöhter jugularvenöser Druck, hepatojugulärer Reflux, Aszites, Hepatomegalie und Ödeme der unteren Extremität auftreten (Galie et al. 2009b, Mocumbi et al. 2015, Rose-Jones und McLaughlin 2015).

1.1.5 Therapie

Leitlinien für die Therapie von PH-Patienten werden durch Expertenkommitees der ESC (European Society of Cardiology) und der ERS (European Respiratory Society) evaluiert und festgelegt (Galie et al. 2009b). An dieser Stelle werden lediglich die Therapieoptionen für PAH- und CTEPH-Patienten beschrieben.

1.1.5.1 PAH

Es existieren PAH-spezifische Medikamente, welche zu einer signifikanten Verbesserung der Symptomatik sowie zu einer langsameren klinischen Verschlechterung führen (Galie et al. 2009b). Jedoch bleibt die PAH unheilbar (Galie et al. 2009b, Humbert et al. 2010, Mocumbi et al. 2015, Olschewski und Seeger 2002, Rosenkranz 2014). Die Betreuung von PAH-Patienten sollte an spezialisierten Zentren erfolgen (Simonneau et al. 2009).

1.1.5.1.1 Allgemeine Maßnahmen

Leichte Betätigungen unter Supervision bis zur symptomatischen Grenze werden empfohlen, jedoch sollte exzessive Betätigung vermieden werden (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009b). Es sollte eine Schwangerschafts-Verhütung erfolgen, da schwangere PAH-Patientinnen eine erhöhte Mortalität aufweisen (Galie et al. 2009b). Zudem sollte es ein Angebot für psychosoziale Unterstützung geben, da viele PAH-Patienten Ängste und Depressionen entwickeln (Galie et al. 2009b). Es sollten Impfungen gegen Pneumokokken und Influenzaviren durchgeführt werden (Galie et al. 2009b).

1.1.5.1.2 Unterstützende Therapie

Eine orale Antikoagulation wird empfohlen für Patienten mit IPAH, hereditärer PAH und PAH induziert durch Gebrauch von Appetitzüglern, da häufig thrombotische Läsionen auftreten und zusätzlich nicht-spezifische Risikofaktoren (Herzinsuffizienz, Immobilität) hinzukommen (Galie et al. 2009b, Simonneau et al. 2013).

Bei Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz und Flüssigkeits-Retention sollten Diuretika verabreicht werden (Galie et al. 2009b, Simonneau et al. 2013).

Einleitung

Eine Langzeit-Sauerstofftherapie ist bei arterieller Hypoxämie indiziert (Galie et al. 2009b, Simonneau et al. 2013).

Digoxin kann bei Patienten mit atrialen Tachyarrhythmien erwogen werden (Galie et al. 2009b, Simonneau et al. 2013).

1.1.5.1.3 PAH-spezifische Substanzklassen

Die therapeutischen Möglichkeiten der PAH sind begrenzt (Rosenkranz 2014). Kombinationstherapien, welche mehr als ein PAH-spezifisches Medikament umfassen, sind etabliert, wenn Monotherapien keine Wirksamkeit aufweisen. Langzeit-Studien dazu existieren noch nicht, ebenso wenig wie offizielle Empfehlungen für Kombinationsstrategien (Galie et al. 2009b). Daher wird in dieser Arbeit auf mögliche Kombinationen nicht eingegangen. Es folgt eine kompakte Darstellung der derzeit etablierten Therapie-Möglichkeiten. Detaillierte Therapieschemata, Dosierungen und unerwünschte Arzneimittelwirkungen werden an dieser Stelle nicht thematisiert.

Endothelinrezeptor-Antagonisten (ERA)

Substanzen: Bosentan, Ambrisentan, Macitentan.

Bei der PAH liegen erhöhte Konzentrationen des Vasokonstriktors Endothelin-1 vor, welcher sowohl an Endothelin-A- (auf glatten Gefäßmuskelzellen; konstriktiver Effekt) als auch an Endothelin-B-Rezeptoren (auf glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen; konstriktiver und dilatativer Effekt) bindet (Galie et al. 2013, Galie et al. 2009b, Rosenkranz 2014).

Es gibt Rezeptor-A-selektive (Ambrisentan) und duale ERA (Bosentan) mit vergleichbaren Effekten (Galie et al. 2009b). ERA bewirken eine Verbesserung im 6-Minuten-Gehtest, der kardiopulmonalen Hämodynamik und eine verzögerte klinische Verschlechterung (Galie et al. 2008b, Rubin et al. 2002). Die prominenteste UAW ist die Hepatotoxizität von Bosentan (Rose-Jones und McLaughlin 2015).

Phosphodiesterase-5 (PDE-5)-Inhibitoren

Substanzen: Sildenafil, Tadalafil.

Die Inhibition der Phosphodiesterase 5 (cGMP-abbauendes Enzym) bewirkt eine Vasodilatation über den NO-cGMP-Signalweg (Galie et al. 2009b). Diese Substanzklasse ist ebenfalls zugelassen für die Therapie der erektilen Dysfunktion (Galie et al. 2009b). In einigen Studien haben sich Besserungen im 6-Minuten-Gehtest, der kardiopulmonalen Hämodynamik und der Symptomatik gezeigt (Galie et al. 2009a, Galie et al. 2005). Die prominentesten UAW sind Flushing, Übelkeit und Kopfschmerzen (Rose-Jones und McLaughlin 2015).

Prostaglandin-Derivate

Substanzen: Epoprostenol (i.v.), Iloprost (inhalativ), Treprostinil (inhalativ, i.v, s.c.), Beraprost (oral).

Das physiologisch in den Endothelzellen gebildete Prostazyklin verursacht Vasodilatation, inhibiert die Thrombozyten-Aggregation und wirkt antiproliferativ (Galie et al. 2009b). Eine Studie über Epoprostenol wies eine Verbesserung des Überlebens, der Hämodynamik und der Symptomatik nach (Barst et al. 1996). Die prominentesten UAW sind Kopfschmerzen, Flushing, Ausschlag, Diarrhö und Kieferschmerz (Rose-Jones und McLaughlin 2015).

Stimulator der löslichen Guanylatzyklase

Substanz: Riociguat.

Riociguat stimuliert die lösliche Guanylatzyklase (sGC) (Grimminger et al. 2009) und wirkt synergistisch mit endogenem NO vasodilatativ (Galie et al. 2013). In der PATENT-1 Studie bewirkte Riociguat eine Verbesserung des 6-Minuten-Gehtests, des PVR, der NT-proBNP-Plasmakonzentration, der NYHA-Klasse und der TtCW bei PAH-Patienten (Ghofrani et al. 2013b).

Kalziumkanal-Antagonisten

Substanzen: Amlodipin, Diltiazem, lang wirksames Nifedipin (in hoher Dosis).

Bei Patienten (vor allem IPA-H-Patienten) mit positiver Vasoreaktivitätstestung während der Rechtsherzkatheteruntersuchung besteht die Indikation zum Einsatz hochdosierter Kalziumkanal-Antagonisten (Galie et al. 2009b, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Die prominenteste UAW ist eine systemische Hypotension (Galie et al. 2009b, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Bei Nicht-Ansprechen dieser Therapie sollte auf PAH-spezifische Medikamente zurückgegriffen werden (Galie et al. 2009b).

1.1.5.1.4 Chirurgisch

Lungen-Transplantation

Die Lungen- oder Herz-Lungen-Transplantation stellt die einzige Heilungsoption für PAH-Patienten dar. Sie wird angestrebt bei Patienten, die nicht auf medikamentöse Therapien ansprechen (Rose-Jones und McLaughlin 2015). PH-Formen mit schlechterer Prognose (z.B. PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen oder angeborenen Herz-erkrankungen) als andere (z.B. IPA-H) haben bessere Chancen auf ein Transplantat (Galie et al. 2013). Es werden auch Herz-Lungen-Transplantationen durchgeführt. Jedoch ist unbekannt, ab wann ein Herz irreversibel verändert ist und auch eine Herztransplantation indiziert ist (Galie et al. 2013).

Atriale Septostomie

Bei der atrialen Septostomie wird ein inter-atrialer Rechts-Links-Shunt geschaffen, um das rechte Herz zu entlasten und die Vorlast des linken Herzens und damit das Herzzeitvolumen zu erhöhen (Kurzynia et al. 2007). Diese Therapieoption wird angewandt bei palliativen Patienten, die nicht für eine Lungentransplantation in Frage kommen oder bei Patienten, die auf der Warteliste für ein Transplantat stehen (Galie et al. 2009b).

1.1.5.2 CTEPH

Die Therapie-Indikationen und –Optionen sollten durch CTEPH-Spezialisten erwogen werden (Galie et al. 2009b, Kim et al. 2013, Rose-Jones und McLaughlin 2015). Die CTEPH ist potentiell heilbar (Kim et al. 2013).

1.1.5.2.1 Pulmonale Endarterektomie (PEA)

Die operative Entfernung des thrombotischen Materials ist für CTEPH-Patienten die Therapie der Wahl (Galie et al. 2009b, Kim et al. 2013, Rosenkranz 2014). Erfolgreich operierte Patienten haben einen nahezu normalisierten PVR und eine normale rechtsventrikuläre Funktion (Galie et al. 2009b, Rose-Jones und McLaughlin 2015, Rosenkranz 2014). Die PEA findet bei einer Kühlung der Körpertemperatur auf ca. 20°C (deep hypothermic circulatory arrest (DHCA)) statt (Kim et al. 2013). Die PEA erbringt bessere Langzeit-Überlebensraten als die medikamentöse Therapie, es sind jedoch nur ca. zwei Drittel aller CTEPH-Patienten geeignet für diese Operation (Kim et al. 2013). Die Entscheidung zur PEA hängt ab von der Lokalisation und dem Ausmaß der Thromben in Relation zum Ausmaß der PH sowie vom Alter des Patienten und seinen Komorbiditäten (Galie et al. 2009b). Es sollte in der Regel keine medikamentöse Überbrückung bis zur PEA erfolgen (Kim et al. 2013).

1.1.5.2.2 Medikamentös

CTEPH-Patienten sollten eine lebenslange Antikoagulation (meist Vitamin-K-Antagonisten) erhalten (Galie et al. 2009b).

Wenn die PEA keinen Erfolg hat (Re-Stenosen, CTEPH besteht fort) oder der Patient inoperabel ist, ist eine medikamentöse Therapie indiziert (Kim et al. 2013, Rosenkranz 2014). Riociguat ist zugelassen für die nicht-operable oder postoperativ persistierende CTEPH (Galie et al. 2015). Bosentan erwies sich als weniger geeignet (Ghofrani et al. 2013a).

1.2 STICKSTOFFMONOXID-STOFFWECHSEL

1.2.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Das NO wurde 1980 als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) von Furchgott und Zawadzki entdeckt (Furchgott und Zawadzki 1980). Es ist der wichtigste Mediator für die Regulation des Gefäßtonus und der vaskulären Homöostase (Lüneburg et al. 2014a, Moncada und Higgs 1993). Neben einer Induktion von Vasodilatation bewirkt NO eine Inhibition der Thrombozyten-Aggregation und der Monozyten-Adhäsion sowie der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (Furchgott und Zawadzki 1980, Lüneburg et al. 2014a). Die Signalkaskade des NO besteht in einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und damit einer Erhöhung der cGMP-Konzentration in glatten Muskelzellen (Budhiraja et al. 2004, Evgenov et al. 2006).

NO-Synthese

Die NO-Synthase (NOS) bildet NO und Citrullin aus L-Arginin (Lüneburg et al. 2014a, Michel und Feron 1997). Es gibt drei Isoformen der NOS: die neuronale NOS (Vorkommen u.a. im neuronalen Gewebe, im Skelettmuskel), die induzierbare NOS (Vorkommen u.a. in Kardiomyozyten, Gliazellen, glatten Gefäßmuskelzellen und in Makrophagen) und die endotheliale NOS (Vorkommen u.a. in Endothelzellen, Kardiomyozyten, Thrombozyten und im Hippocampus) (Michel und Feron 1997). Guanidino-substituierte L-Arginin-Analoga (L-NMMA und ADMA) sind endogene Inhibitoren der NOS (Sessa 1994, Tran et al. 2003).

1.2.2 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)

ADMA ist der potenteste endogen vorkommende Inhibitor aller NOS-Formen (Kielstein et al. 2005, Vallance et al. 1992). Es liegt bei PAH- und CTEPH-Patienten in erhöhter Plasma- und Gewebekonzentration vor und ist assoziiert mit einer schlechteren Hämodynamik und schlechterem Outcome (Kielstein et al. 2005, Pezzuto et al. 2015, Pullamsetti et al. 2005, Skoro-Sajer et al. 2007).

Bildung

ADMA entsteht im Rahmen der posttranslationalen Modifikation von Proteinen durch Methylierung von L-Argininresten. Das Methylgruppen-übertragende Enzym ist die PRMT (Protein-Arginin-Methyltransferase) Typ 1. Durch Proteolyse wird das L-Arginin-Analogon freigesetzt (Tran et al. 2003, Vallance und Leiper 2004).

Eliminierung

ADMA wird zu einem kleinen Teil renal ausgeschieden, jedoch hauptsächlich degradiert durch das Enzym DDAH (Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase), welches ADMA zu Dimethylamin und Citrullin hydrolysiert (Lüneburg et al. 2014a, Tran et al. 2003).

Die ADMA-Konzentration hängt ab von der Aktivität der auf- und abbauenden Enzyme PRMT und DDAH (Vallance und Leiper 2004).

Klinischer Kontext

Neben der PAH sind erhöhte ADMA-Plasmaspiegel bei Patienten mit verschiedenen kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen nachweisbar: arterielle Hypertonie (Surdacki et al. 1999), terminale Niereninsuffizienz (Böger 2003, Vallance et al. 1992), Hyperhomocysteinämie (Stühlinger et al. 2003), pAVK (Böger et al. 1997), Diabetes mellitus Typ II (Abbasi et al. 2001) und weitere. ADMA ist ein Marker der endothelialen Dysfunktion (Böger 2003).

1.2.3 Symmetrisches Dimethylarginin (SDMA)

SDMA inhibiert die NO-Synthese indirekt durch Reduktion der L-Arginin-Bioverfügbarkeit und bewirkt einen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (Mangoni 2009). Einige Studien titulierten SDMA als Marker für die Nierenfunktion (Bode-Böger et al. 2006, Kielstein et al. 2006). Bei PAH-Patienten liegen ebenfalls erhöhte Plasma- und Gewebekonzentrationen von SDMA vor (Pullamsetti et al. 2005).

Bildung

SDMA ist ein durch die PRMT Typ 2 dimethyliertes L-Arginin-Analogon (Lüneburg et al. 2014a, Mangoni 2009, Vallance und Leiper 2004).

Eliminierung

SDMA wird sowohl renal sezerniert (Böger 2003) als auch durch die AGXT2 (Alanin Glyoxylat Aminotransferase 2) abgebaut (Lüneburg et al. 2014b).

Klinischer Kontext

Neben PAH-Patienten weisen u.a. Schlaganfallpatienten (Lüneburg et al. 2012), Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen (Kiechl et al. 2009) und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz erhöhte SDMA-Konzentrationen auf (MacAllister et al. 1996).

1.2.4 L-Arginin

L-Arginin ist eine semiessentielle, proteinogene Aminosäure (Böger 2007), die in vielen Prozessen und Signalwegen eine physiologische Rolle spielt (s.u.). L-Arginin wird u.a. eine Funktion in der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus, der Hämodynamik (Popolo et al. 2014) sowie in der Endothel-vermittelten vaskulären Funktion (Vasodilatation, verminderte Plättchen-Aggregation, reduzierte Monozyten-Adhäsion) zugeschrieben (Böger 2007).

Bildung

L-Arginin entsteht hauptsächlich durch Proteinmetabolismus und -umsatz und lediglich zu 5-15% durch endogene Synthese (Popolo et al. 2014).

Umsatz

L-Arginin dient als Substrat vieler Enzyme: NOS, PRMT Typ 1 und 2, Arginase (zersetzt L-Arginin zu Urea und L-Ornithin; kompetitiert mit der NOS um L-Arginin als Substrat (Böger 2007)), Arginin-Glyzin-Amidino-transferase (AGAT) (bildet Kreatin), L-Arginin-Decarboxylase (ADC) (bildet Agmatin) (Popolo et al. 2014).

Klinischer Kontext

L-Arginin ist in der Lage, die Effekte von SDMA rückgängig zu machen (Bode-Böger et al. 2006). Orale oder intravenöse L-Arginin-Supplementation hat einen positiven Effekt auf u.a. kardiovaskuläre, pulmonale, renale und immunologische Funktionen (Böger 2007, Popolo et al. 2014) und spielt in der Prävention und Behandlung der endothelialen Dysfunktion eine Rolle (Wu et al. 2009).

1.2.5 Homoarginin

Homoarginin ist eine non-proteinogene Aminosäure (Atzler et al. 2015). Als Gegenspieler von ADMA im kardiovaskulären System (Tsikas und Kayacelebi 2014) kann Homoarginin die Endothelfunktion verbessern (Atzler et al. 2015).

Bildung

Der Synthese-Mechanismus ist noch nicht im Detail verstanden. Die AGAT scheint eine wichtige Rolle für den L-Arginin-abhängigen Synthese-Weg zu spielen (Kayacelebi et al. 2015b).

Umsatz

Homoarginin ist dem L-Arginin strukturell ähnlich (Atzler et al. 2015) und kann ebenfalls als Substrat der NOS dienen (Moali et al. 1998), jedoch mit geringerer Affinität (Kayacelebi et al. 2015a). Darüber hinaus kann Homoarginin die Arginase inhibieren, wodurch höhere L-Arginin- und NO-Konzentrationen vorliegen (Atzler et al. 2015).

Klinischer Kontext

Niedrige Homoarginin-Konzentrationen sind assoziiert mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität und Morbidität (Atzler et al. 2015, Choe et al. 2013, Kayacelebi et al. 2015a, März et al. 2010, Pilz et al. 2015, Pilz et al. 2011). Die Homoarginin-Konzentrationen sind stark abhängig von der Nierenfunktion (Choe et al. 2013, März et al. 2010, Pilz et al. 2011). Ursächlich hierfür könnte sein, dass die AGAT hauptsächlich in der Niere exprimiert wird (Atzler et al. 2015).

2 PATIENTEN UND METHODEN

2.1 STUDIENPROTOKOLL

Ziel dieser Studie war die Messung der Endothelfunktion bei Patienten mit PAH und CTEPH. Dies erfolgte nicht-invasiv mit dem EndoPat2000-System und serologisch mit Biomarkern. Die Korrelation der Messergebnisse mit Parametern des Schweregrads der Erkrankung sowie mit etablierten Prognose-Parametern wurde analysiert. Zudem wurde der Verlauf aller Parameter unter PAH-spezifischer Therapie zur Messung des Therapieansprechens auf die Endothelfunktion bewertet.

Es handelte sich um eine offene, prospektive, kontrollierte Beobachtungsstudie durchgeführt in der Spezialambulanz für Pulmonale Hypertonie (und der Pneumologie-Station) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). Der Beobachtungszeitraum pro Patient sollte ein Jahr betragen mit insgesamt fünf Studienvisiten. Für gesunde Kontrollprobanden gab es einen einzelnen Studientag.

Diese Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg geprüft und genehmigt. Jedem Patienten und Probanden wurden die Hintergründe der Studie und das Procedere in einem Aufklärungsgespräch erläutert sowie Informationsmaterial ausgehändigt. Von jedem Studienteilnehmer wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

2.1.1 Patientenkollektiv

Patienten mit Pulmonal arterieller Hypertonie, die sich routinemäßig in der Pneumologischen Ambulanz des UKE zur Verlaufskontrolle vorstellten, wurden nach Überprüfung der Einschlusskriterien (s.u.) über diese Studie informiert. Diese Patienten, die bereits in Behandlung waren, wurden der Studiengruppe 1 zugeordnet (prävalent).

Patienten, die zur Diagnosestellung und Klassifizierung der Pulmonalen Hypertonie im UKE eine Rechtsherzkatheteruntersuchung erhielten und den Einschlusskriterien entsprachen, wurden ebenfalls in die Studie aufgenommen. Diese am Einschlussdatum noch therapienaiven Patienten bildeten die Studiengruppe 2 (inzident).

Es wurden insgesamt 34 Patienten der Studiengruppe 1 und 25 Patienten der Studiengruppe 2 untersucht. Zwei Drittel der Patienten waren weiblichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter betrug 59,2 Jahre (Standardabweichung: 16,26 Jahre).

Folgende *Einschlusskriterien* mussten erfüllt sein:

- Diagnose einer Pulmonalen Hypertonie (mittlerer pulmonal-arterieller Druck über 25 mmHg) der Nizza-Klasse I (PAH) oder IV (CTEPH)
- Mindestalter 18 Jahre
- unterschriebene Einwilligungserklärung.

2.1.2 Gesunde Kontrollprobanden

Gesunde Probanden ohne jegliche Medikation sowie ohne bekannte kardiovaskuläre und pulmonale Erkrankungen dienten als Kontrollgruppe. Sie bildeten die Studiengruppe 3.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie 30 gesunde Probanden untersucht. Zwei Drittel der Kontrollprobanden waren weiblichen Geschlechts. Das Durchschnittsalter betrug 49,9 Jahre (Standardabweichung: 17 Jahre).

Folgende *Einschlusskriterien* mussten erfüllt sein:

- keine kardiopulmonale Erkrankung, zum Ausschluss wurde am Studientag eine Echokardiografie durchgeführt
- keine Einnahme von Medikamenten
- Mindestalter 18 Jahre
- unterschriebene Einwilligungserklärung.

2.1.3 Untersuchungen im Rahmen der Studie

2.1.3.1 Patienten

Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

- Serologische Bestimmung der kardialen Risikomarker (Analyseverfahren s. Abschnitt 2.2.3). Dazu wurde ein 7,5 ml- EDTA-Blut Röhrchen entnommen. Dies erfolgte durch die zentrale Blutentnahmestelle des UKE, wo den Patienten bei jedem Besuch in der Ambulanz Blut für die Analyse von Routineparametern im Rahmen der Behandlung der Pulmonalen Hypertonie entnommen wurde.
- Nicht-invasive Bestimmung der Endothelfunktion mittels EndoPat2000-System (s. Abschnitt 2.2.2).

Die Patienten wurden in der Regel alle drei Monate in der Ambulanz vorstellig. In diesem Rhythmus sollten auch die Studienuntersuchungen stattfinden. Der Beobachtungszeitraum sollte circa ein Jahr betragen, in dem dann fünf Studienvisiten stattgefunden hatten.

2.1.3.2 Gesunde Probanden

Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

- Transthorakale Echokardiografie zum Ausschluss kardiopulmonaler Erkrankungen.
- Serologische Analyse der kardialen Risikomarker (Analyseverfahren s. Abschnitt 2.2.3). Dazu wurde ein 7,5 ml- EDTA-Blut Röhrchen entnommen.
- Nicht-invasive Bestimmung der Endothelfunktion mittels EndoPat2000-System (s. Abschnitt 2.2.2).
- Bestimmung ausgewählter Laborparameter (CRP, Hb, Hkt, GOT, GPT, GGT, Urea, Kreatinin, GFR; Untersuchung durch standardisierte und validierte Verfahren). Dazu wurden ein 2,7 ml-EDTA-Blut Röhrchen sowie ein 7,5 ml-Serum-Blut Röhrchen entnommen.
- Ein 6-Minuten-Gehtest (nach allgemeingültigen Standards des UKE).

Dazu wurden die Probanden einmalig in die Pneumologische Ambulanz des UKE einstellt. Sie erhielten keine Medikation oder invasive Diagnostik.

2.1.4 Zusätzlich erfasste Basis- und Prognoseparameter

Neben den Ergebnissen der EndoPat2000- Messung und der Analyse der Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin wurden weitere Daten erhoben. Diese wurden über den Zeitraum der Studie in einer separaten Tabelle (Microsoft Excel) pseudonymisiert protokolliert und für die Patienten bei jedem Besuch im Zentrum fortgeschrieben.

Die Daten der Kontrollgruppe wurden einmalig nach standardisierten Verfahren, die Daten der Studienpatienten routinemäßig in der Pneumologischen Ambulanz erhoben.

2.1.4.1 Studienpatienten

Patientendaten: Patientenidentifikationsnummer, Geburtsdatum, Geschlecht, Gewicht, Größe, Form der PH gemäß Nizza-Klassifikation, aktuelle Medikation, Komorbiditäten, Rauchverhalten.

Prognose-Parameter: NYHA-Stadium, 6-Minuten-Gehstrecke und BORG-Index, Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, arterieller Kohlendioxid-Partialdruck, NT-proBNP-Spiegel und weitere Laborparameter (CRP, EVB, Hb, Hkt, GOT, GPT, GGT, Urea, Kreatinin, GFR), Ergebnisse der transthorakalen Echokardiografie (RVSP, Tei-Index, TAPSE), Ergebnisse der invasiven Rechtsherzkatheteruntersuchung (mPAP, RAP, CI, SvO₂, PCWP, PVR).

TtCW: Für die Überlebenszeitanalysen wurde als determinierendes Ereignis die klinische Verschlechterung gewählt. Folgende Ereignisse wurden dabei als Clinical Worsening definiert (Pulido et al. 2013): Lungentransplantation, Tod, Therapieeskalation, Verschlechterung der 6-Minuten-Gehstrecke um 15% (Bestätigung in einem zweiten Gehtest), Verschlechterung des NYHA-Stadiums, Hospitalisierung aufgrund der Pulmonalen Hypertonie.

2.1.4.2 Gesunde Probanden

Für die gesunde Kontrollgruppe wurden einmalig neben den Studienergebnissen folgende Daten nach standardisierten Verfahren erhoben und protokolliert:

Patientendaten: Patientenidentifikationsnummer, Geburtsdatum, Geschlecht, Gewicht, Größe, Rauchverhalten.

Prognose-Parameter: NYHA-Stadium, 6-Minuten-Gehstrecke und BORG-Index, NT-proBNP-Spiegel und weitere Laborparameter (CRP, Hb, Hkt, GOT, GPT, GGT, Urea, Kreatinin, GFR).

2.1.5 Endpunkte der Studie

Als primärer Endpunkt wurden Unterschiede des peripheren arteriellen Tonus im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zur Kontrollgruppe festgelegt.

Sekundäre Endpunkte waren Unterschiede und Veränderungen der Serumkonzentrationen der kardiovaskulären Risikomarker sowie die Korrelation von PAT und Plasmakonzentrationen der Biomarker mit etablierten Prognosemarkern im 3-Monatsverlauf.

2.2 BESCHREIBUNG DER STUDIENUNTERSUCHUNGEN

2.2.1 Vorbereitung der Patienten und Probanden

Um Störgrößen zu minimieren, sollten die Studienteilnehmer ab zwölf Stunden vor der Messung keine Nahrung mehr zu sich nehmen, nicht rauchen und keine koffeinhaltigen Getränke konsumieren. Die regelmäßige Einnahme der Medikamente sollte nicht unterbrochen werden. Unmittelbar vor der Untersuchung mit dem EndoPat2000-System sollten keine belastenden Tätigkeiten (z.B. 6-Minuten-Gehtest) durchgeführt werden. Es sollten keine einschnürenden Schmuck- oder Kleidungsstücke getragen werden.

2.2.2 EndoPat2000-System

Die nicht-invasive Diagnostik der Endothelfunktion erfolgte über das EndoPat2000-System (Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel). Diese Messung basierte auf einer reaktiven Hyperämie. Nach einer temporären externen Okklusion der Arteria brachialis wurde die flussvermittelte Vasodilatation bestimmt (PAT-Signaltechnologie). Die Durchführung der Messung erfolgte nach der Beschreibung des Herstellers (Itamar EndoPat2000 User Manual, Software Version 3.2.4, Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel).

Die Patienten wurden immer morgens und im selben Raum bei stetigen Temperaturverhältnissen untersucht. Während der Messung befanden sich die Patienten in liegender Position.

Nach einer fünfminütigen Adaptionsphase der Patienten an den Untersuchungsraum und Erreichen eines relaxierten Zustandes wurde der Blutdruck nach Riva-Rocci gemessen. Die Druckmessung wurde am kontralateralen späteren Messarm durchgeführt.

Anschließend wurden an jedem Zeigefinger EndoPat2000-Messsonden angelegt. Hierüber erfolgte eine Aufzeichnung digitaler pulsatiler Volumenveränderungen (Fingerplethysmographie) zur Bestimmung der Pulswellenamplitude und des peripheren arteriellen Tonus (PAT). Die Messsonden waren über einen pneumoelektrischen Schlauch mit dem Messgerät verbunden. Nach korrekter Positionierung am Zeigefinger wurden integrierte Luftkissen dieser Clips aufgeblasen, um ein Verrutschen zu vermeiden. Die Hände wurden mit Armstützen auf Herzhöhe positioniert. Mittels Schaumstoffringen wurde ein verzerrender Kontakt zwischen Zeige- und benachbarten Fingern vermieden (s. Abb. 1). Die Messsonde am kontralateralen Messfinger diente als endogene Negativkontrolle.

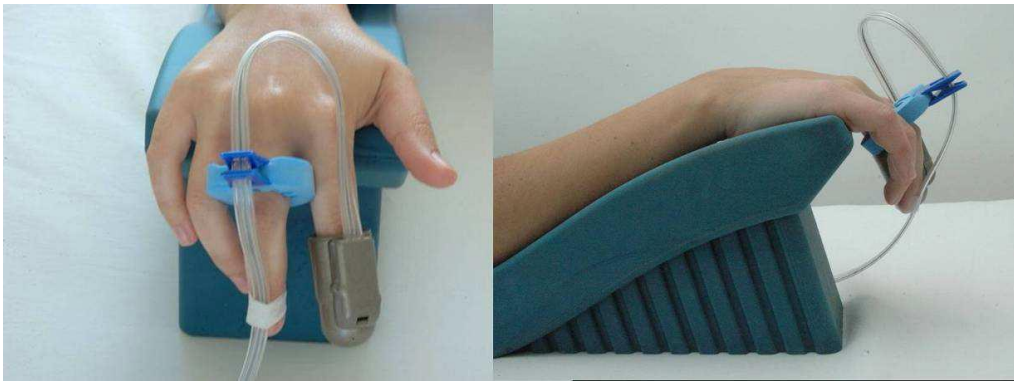


Abb.1: Versuchsaufbau der Fingerplethysmographie (aus: Itamar EndoPat2000 User Manual, Software Version 3.2.4, Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel, S. 35).

Eine Blutdruckmanschette wurde vorbereitend an den oberen Messarm angebracht, aber noch nicht aufgepumpt.

Nach Beendigung der Vorbereitungen wurden die PAT-Signale (s. Abb. 2) zunächst nur beobachtet. Sobald eine Minute lang störfreie Ergebnisse vorlagen, wurde die Aufzeichnung der Signale aktiviert.

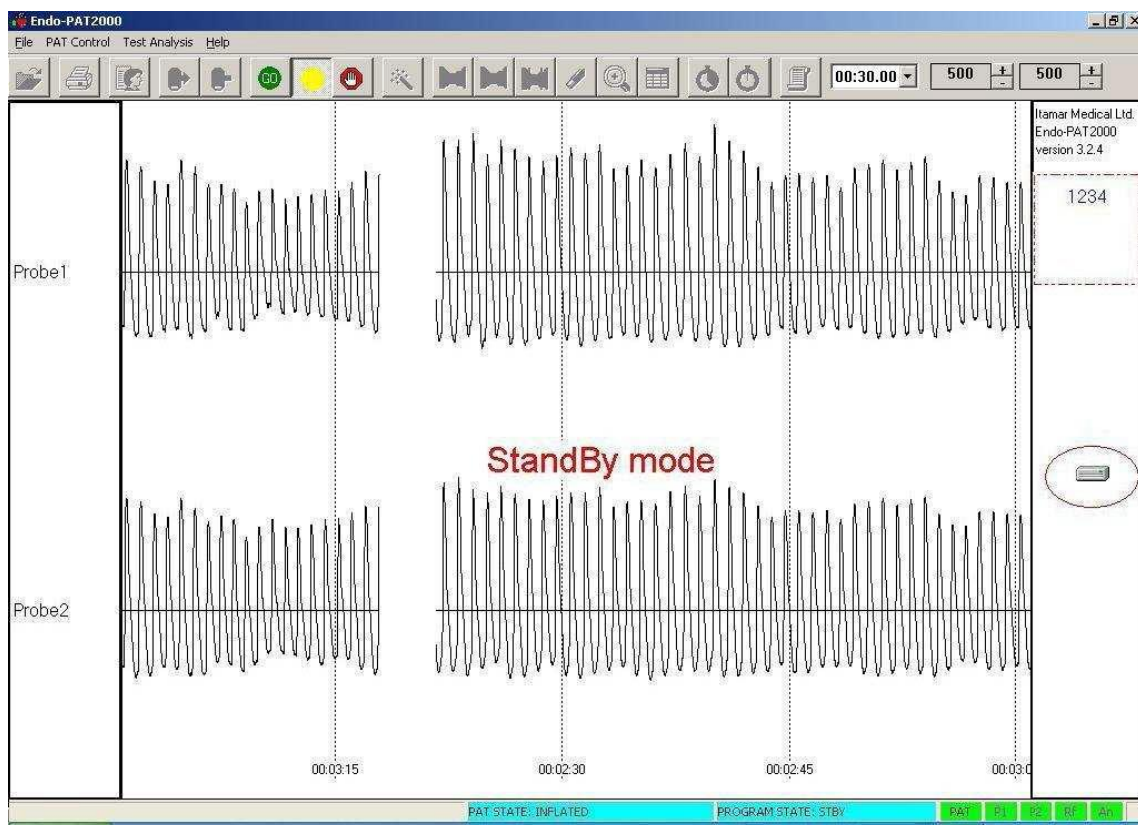


Abb. 2: Darstellung der reinen PAT-Signale in der Prä-Okklusionsphase. Probe 1 und 2 stellen jeweils den linken und rechten Arm dar (aus: Itamar EndoPat2000 User Manual, Software Version 3.2.4, Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel, S.37).

Patienten und Methoden

Nach einer fünfminütigen Baseline-Bestimmung der Endothelfunktion wurden fünf Minuten in Ruhe aufgezeichnet. Danach wurde für exakt fünf Minuten die Blutdruckmanschette auf 100 mmHg über den systolischen Blutdruck aufgepumpt, um eine Okklusion der Arteria brachialis zu erzielen. Nach abrupter Öffnung der Manschette und damit ausgelöster reaktiver und flussvermittelter Hyperämie folgten abschließend sieben Minuten Messung in Ruhe.

Die Software des EndoPat2000-Systems wertete die Signale aus und errechnete den Reactive Hyperemia Index (RHI). Dieser wurde gebildet aus dem Ratio aus postobstruktiver Pulswellenamplituden-Messung und Baseline-Messung (s. Abb. 3).

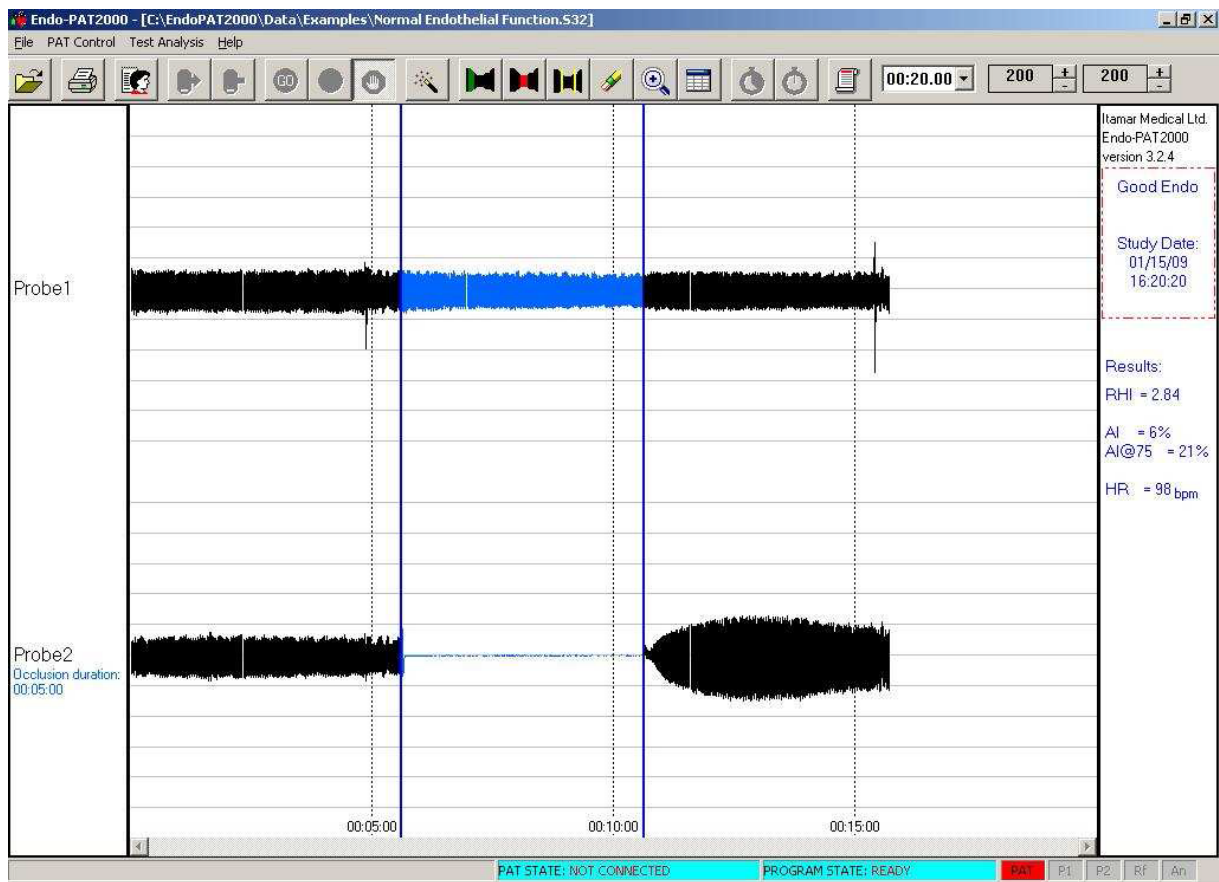


Abb. 3: Ergebnis der automatischen Analyse durch die EndoPat2000-Software. Probe 2 zeigt die Signale des okkludierten Messarmes, Probe 1 die Signale des anderen Armes (aus: Itamar EndoPat2000 User Manual, Software Version 3.2.4, Itamar Medical Ltd., Caesarea, Israel, S. 43).

2.2.3 Biomarkerbestimmung

Die Bestimmung der Konzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin im Plasma erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie mit Massenspektrometrierkopplung (LC-MS/MS). Die Arbeitsschritte sind im Folgenden beschrieben.

2.2.3.1 Gewinnung der Blutproben

Die Entnahme von 7,5 ml venösen Vollblutes in ein EDTA-Blutröhrchen erfolgte am jeweiligen Studientag. Nach der Blutentnahme wurde das Röhrchen auf Eis gekühlt. Anschließend wurde im Labor eine 20-minütige Zentrifugierung der Proben bei 4° C und 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) durchgeführt. Abpipettierte Plasmaproben wurden bis zur gesammelten Untersuchung aller Proben zu einem späteren Zeitpunkt bei -80° C aufbewahrt.

2.2.3.2 Analyseverfahren mit LC-MS/MS

Die Quantifizierung der Biomarker erfolgte nach einer von Schwedhelm et al. (Schwedhelm et al. 2007) modifizierten Methodik (mit LC-MS/MS). Wesentliche Arbeitsschritte hierbei waren:

- Probenvorbereitung
- Derivatisierung der Arginin-Derivate zur besseren Retention auf der Trennsäule
- LC-MS/MS: chromatographische Trennung der Analyten und massenspektrometrische Quantifizierung.

Die Analyse der Konzentrationen von ADMA, SDMA und L-Arginin erfolgte gemeinsam, die Analyse der Homoargininkonzentrationen erfolgte davon separat.

2.2.3.2.1 Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin

Probenvorbereitung

Eine Multiscreen 96-Well-Filterplatte, welche einer 96-Well-Polypropylenplatte auflag, wurde mit je 100 µL einer methanolischen internen Standard-Lösung präpariert. Die Standardlösung enthielt eine 50 µmol/L L-[²H₇]-Argininlösung sowie eine 2 µmol/L [²H₆]-ADMA-Lösung für die Bestimmung von sowohl ADMA als auch SDMA. Durch das Methanol wurde später eine Proteinausfällung in den Proben hervorgerufen. Nachdem je 25 µL der Proben hinzupipettiert worden waren, wurden beide Platten auf einem Orbital-Schüttler geschüttelt (15 min, Raumtemperatur). Um die Analyten von den ausgefällten Proteinen zu trennen, fand eine Zentrifugierung der auf der Polypropylenplatte liegenden Filterplatte statt (10 min, 2000 rpm, 4 °C). Anschließend wurden die beiden Platten getrennt und die Eluate auf der Polypropylenplatte bei 80°C für zehn Minuten auf einem Heizblock getrocknet.

Derivatisierung

Die getrockneten Analyten wurden durch Zugabe von je 100 µL einer 1 N butanolischen Salzsäure zu ihren Butylestern umgesetzt. Es folgte eine weitere Verdampfungsphase auf einem Heizblock bei 80°C. Die Arginin-Derivate lagen nun in ihrer Butylester-Form vor und die Derivatisierungs-Lösung war verdampft.

LC-MS/MS

Zu den getrockneten Proben wurden je 100 µL Probenpuffer aus Methanol und destilliertem Wasser (50/50, v/v, pH 5) gegeben. Zum Lösen der Proben wurde die Polypropylenplatte mit Acetat-Klebefolie abgedeckt und auf dem Orbital-Schüttler geschüttelt (30 min, Raumtemperatur). Nach erneuter Zentrifugierung und Filtrierung durch eine Multiscreen-Filterplatte (10 min, 2000 rpm) wurden je 10 µL des Probengemisches chromatographisch aufgetrennt (Flussrate 0,3 mL/min; mobile Phase: 0,1% Ameisensäure in Wasser (Phase A) und Acetonitril (Phase B)). Hierbei erfolgte eine Retention der Arginin-Derivate an der Trennsäule (C18-Phase vernetzt mit dem Antibiotikum Teicoplanin) durch die Wechselwirkungen freier Hydroxylgruppen des Teicoplanins und der Analyten. Die Quantifizierung der einzelnen Derivate ADMA, SDMA und L-Arginin erfolgte dann im gekoppelten Massenspektrometer. Im Elektrospray-Interface erfolgte die Ionisierung. Nach der Fragmentation mit Argon (Kollisionsgas; Trägergas: Stickstoff, 90 L/h) wurden zur Identifizierung und Quantifizierung der Moleküle folgende Massenübergänge der Ionen gemessen: für ADMA m/z 259,1 zu m/z 214,1; für SDMA m/z 259,1 zu m/z 228,1; für L-Arginin m/z 231,1 zu m/z 70. Durch Vergleiche der Peakflächenverhältnisse der Analyten und der jeweiligen internen Standards wurden die Konzentrationen der einzelnen Arginin-Derivate ermittelt.

Tabelle 2: Weitere Parameter zur Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin

Chromatographische Parameter		Massenspektrometrische Parameter	
Autosampler HPLC-System	Varian, Palo Alto, CA, USA Varian ProStar model 210	System Software	Varian L1200 MS/MS Varian MS Workstation Software 6.9
Flussmittel-Gradient	67/33, v/v isokratisch	Ionisierung	ESI, positiver Modus (ESI+)

MS = Massenspektrometer, ESI = Elektrosprayionisation

2.2.3.2.2 Bestimmung von Homoarginin

Die Bestimmung der Homoarginin-Konzentrationen im Plasma erfolgte im Wesentlichen nach der in Abschnitt 2.2.3.2.1 beschriebenen LC-MS/MS-Methode. An dieser Stelle werden die Unterschiede zur Analyse der ADMA-, SDMA- und L-Arginin-Konzentrationen aufgeführt. Nicht weiter erwähnte Arbeitsschritte sind gleich:

- Interne Standardlösung: isotopenmarkiertes [$^{13}\text{C}_9$]-Homoarginin
- Probenpuffer: 75% destilliertes Wasser und 25% Methanol, pH-Wert= 5
- Trennsäule: Polaris C18-Ether
- Mobile Phase B : Acetonitril/ Methanol (50/50, v/v) mit 0,1% Ameisensäure
- Flussmittel-Gradient: 0:00 min 95/5, A/B
 - 0:30 min 95/5
 - 2:00 min 50/50
 - 2:01 min 95/5
 - 4:00 min 95/5
- Injektionsvolumen: 22 μL .

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Homoarginin-Moleküle wurde ein Übergang der Ionen m/z 245,1 zu m/z 211,1 gemessen.

2.3 DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die erfassten Daten wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics für Windows, Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ausgewertet. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Kategoriale Daten sind im Ergebnisteil mit ihren absoluten Häufigkeiten und prozentualen Anteilen angegeben. Für Vergleiche kategorialer Daten wurde der Chi-Quadrat-Test bzw. der Exakte Test nach Fisher verwendet.

Metrische Daten wurden zunächst mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung untersucht und anschließend wurde eine optische Beurteilung der Werteverteilung vorgenommen. Normalverteilte Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben und mittels parametrischer t-Tests für verbundene bzw. unverbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede untersucht worden. Die Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen wurde für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen verwendet. Nicht normalverteilte Daten sind als Median mit Wertebereich (Minimum – Maximum) angegeben. Gruppenvergleiche erfolgten mit dem Mann-Whitney-U-Test und dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Zusammenhänge der verschiedenen Variablen wurden mit Hilfe von Spearman-Korrelationskoeffizienten untersucht und bewertet.

Zur Darstellung der Überlebenszeitanalyse wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Der Logrank-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede der Überlebenszeitkurven zu ermitteln.

Grafiken wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) erzeugt.

Als statistisch signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ betrachtet. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 EINLEITUNG

Die Datenerhebung erfolgte vom 27.10.2010 bis zum 23.12.2014 in der Pneumologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE).

Gegenstand dieser Studie war die Untersuchung des Reactive Hyperemia Index (RHI) sowie der Biomarker ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie. Nach einer Charakterisierung der Studienpopulation wurden zunächst der RHI und die Biomarker mit anderen Parametern verglichen (Baseline-Werte). Anschließend fand eine Verlaufsanalyse von RHI und Biomarkern über ein Jahr statt, um Veränderungen in der therapienaiven Studiengruppe unter einer Therapieeinleitung zu erfassen. Weiterhin sollten Analysen für den Zusammenhang des RHI bzw. der Biomarker mit dem Schweregrad der Erkrankung im Verlauf und mit der Überlebenszeit durchgeführt werden.

Die Daten wurden getrennt nach Studiengruppen ausgewertet:

- Studiengruppe 1: zum Baseline-Zeitpunkt therapierte Patienten (prävalent)
- Studiengruppe 2: zum Baseline-Zeitpunkt therapienaive Patienten (inzident)
- Studiengruppe 3: gesunde Kontrollgruppe.

Prüfung auf Normalverteilung

Auf die Ergebnisdarstellung der optischen und statistischen Tests auf Normalverteilung wird verzichtet. Die Resultate waren bestimmend für die Wahl der statistischen Tests.

3.2 STUDIENPOPULATION

3.2.1 Baseline-Parameter

3.2.1.1 Charakteristika und Häufigkeitsverteilung der Studienpopulation

Es wurden insgesamt 89 Patienten und Probanden in die Auswertung der Studie einbezogen. Die absolute Häufigkeitsverteilung nach Studiengruppe des Studienkollektivs zum Baseline-Zeitpunkt wird dargestellt in Abb. 4.

33 Patienten waren an einer idiopathischen PAH, zwei Patienten an einer hereditären PAH, neun Patienten an einer PAH assoziiert mit Bindegewebserkrankungen, zwei Patienten an einer PAH assoziiert mit angeborenen Herzfehlern sowie ein Patient an einer PAH assoziiert mit portaler Hypertension erkrankt. Zwölf Patienten hatten die Diagnose einer CTEPH.

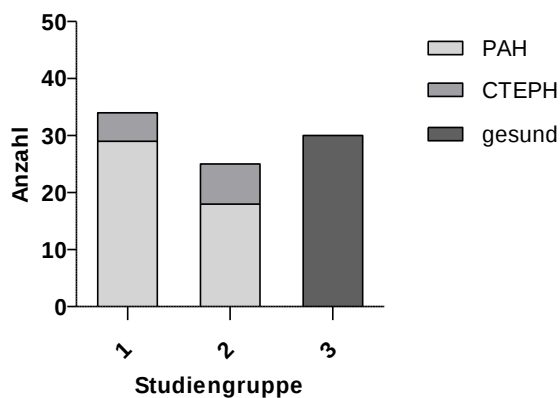


Abb. 4: Balkendiagramm zur Darstellung der absoluten Häufigkeitsverteilung des Studienkollektivs nach Studiengruppe.

Die nachfolgende Tabelle vermittelt einen Überblick des Studienkollektivs aufgeschlüsselt nach der Studiengruppe. In allen Gruppen herrschte ein weiblicher Überschuss. Das durchschnittliche Alter der gesunden Kontrollgruppe lag zehn Jahre unter dem durchschnittlichen Alter des Patientenkollektivs (p -Wert $\leq 0,05$; t-Test). Die Mittelwerte des Body-Mass-Index von Patientenkollektiv und gesunder Kontrollgruppe unterschieden sich signifikant (p -Wert $\leq 0,05$; t-Test). Ebenso war das Rauchverhalten des Patientenkollektivs gemessen in packyears gegenüber der Kontrollgruppe deutlich ausgeprägter (p -Wert $\leq 0,05$; t-Test).

Ergebnisse

Tabelle 3: Baseline-Charakteristika der Studienpopulation

	Studiengruppe			
	1	2	1&2	3
n / % von N	34/100%	25/100%	59/100%	30/100%
Männlich	11/32,4%	8/32%	19/32,2%	10/33,3%
Weiblich	23/67,6%	17/ 68%	40/67,8%	20/66,7%
Alter [Jahre]	59,24 ±14,93	59,2 ±16,26	59,22 ±15,37 *	49,9 ±17,0
BMI [kg/m2]	27,15 ±6,37	26,19 ±5,88	26,74 ±6,13 *	24,23 ±3,58
Raucherstatus [packyears]	14,09 ±19,54	25,64 ±28,84	19,07 ±24,45 *	4,3 ±8,74

*Angabe der absoluten Anzahl / % der Gesamtstichprobe bzw. der Mittelwerte ± Standardabweichung, * = p-Wert ≤0,05; n = Größe der Teilstichprobe, N = Größe der Gesamtstichprobe, BMI = Body Mass Index*

3.2.1.2 Hämodynamische Parameter

Die hämodynamischen Parameter zur leitliniengerechten Diagnosestellung der Pulmonalen Hypertonie wurden mittels Rechtsherzkatheteruntersuchung erhoben. Die Daten für therapierte Patienten wurden im Durchschnitt 17 Monate vor Studieneinschluss erhoben. Für Patienten der Studiengruppe 2 lag das Datum der Rechtsherzkatheteruntersuchung nah am Einschlussdatum. Tabelle 4 stellt die erhobenen Werte für das Patientenkollektiv dar. Es wurden Daten von 57 der 59 Studienpatienten analysiert. Responder für eine hochdosierte Kalzium-Antagonistentherapie wurden nicht ermittelt. Der mittlere pulmonal-arterielle Druck sowie der pulmonalvaskuläre Widerstand waren in der Studiengruppe 1 gegenüber der Studiengruppe 2 signifikant erhöht ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 4: Hämodynamische Parameter aus der Rechtsherzkatheteruntersuchung

	Studiengruppe		
	1	2	1&2
mPAP [mmHg]	51,71 $\pm$ 11,7 *	41,92 $\pm$ 11,31	47,34 $\pm$ 12,43
RAP [mmHg]	8,69 $\pm$ 5,48	7,48 $\pm$ 4,8	8,1 $\pm$ 5,14
CI [(l/min)/m²]	1,84 $\pm$ 0,5	2,06 $\pm$ 0,53	1,95 $\pm$ 0,52
SvO2 [%]	62,38 $\pm$ 8,67	64,04 $\pm$ 8,93	63,18 $\pm$ 8,75
PCWP [mmHg]	12,19 $\pm$ 6,01	11,64 $\pm$ 3,51	11,95 $\pm$ 5,02
PVR [dyn*sec*cm-5]	1014,68 $\pm$ 469,25 *	706,45 $\pm$ 377,34	879,06 $\pm$ 454,14

Angabe der Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, * = p -Wert $\leq 0,05$; mPAP = Mittlerer pulmonal-arterieller Druck, RAP = Rechtsatrialer Druck, CI = Herzindex, SvO2 = Gemischtvenöse Sättigung, PCWP = Pulmonal-kapillärer Verschlussdruck, PVR = Pulmonalvaskulärer Widerstand

3.2.1.3 Begleiterkrankungen des Studienkollektivs

In Tabelle 5 sind Begleiterkrankungen der Studienpatienten aufgelistet. Bei den gesunden Kontrollprobanden gab es keine Vorerkrankungen. Speziell kardiopulmonale Erkrankungen wurden bei ihnen am Studientag mittels Echokardiografie ausgeschlossen. Die Anzahl kardialer Risikofaktoren unterschied sich zwischen den Studiengruppen nicht signifikant (p-Wert > 0,05; Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 5: Begleiterkrankungen der Studienpatienten

	Studiengruppe		
	1	2	1&2
CRF	1,79 ±1,47	1,8 ±1,53	1,8 ±1,48
DM	5/14,7%	3/12%	8/13,6%
KHK	4/11,8%	6/24%	10/16,9%
AHT	13/38,2%	15/60%	28/47,5%
VHF	12/35,3%	3/12%	15/25,4%
HC	12/35,3%	9/36%	21/35,6%
Vitien	9/26,5%	6/24%	15/25,4%
Red LVF	6/17,6%	3/12%	9/15,3%
COPD	4/11,8 %	4/16%	8/13,6%
GOLD I	0	0	0
GOLD II	2/50%	2/50%	4/50%
GOLD III	1/25%	2/50%	3/37,5%
GOLD IV	1/25%	0	1/12,5%
Rheuma	9/26,5%	3/12%	12/20,3%

Angabe der absoluten Anzahl / % der Gesamtstichprobe bzw. der Mittelwerte ± Standardabweichung; CRF = Kardiale Risikofaktoren, DM = Diabetes mellitus, KHK = Koronare Herzkrankheit, AHT= Arterieller Hypertonus, VHF = Vorhofflimmern, HC= Hypercholesterinämie, Red LVF = Reduzierte linksventrikuläre Funktion, COPD = Chronic obstructive lung disease, GOLD I-IV = COPD-Stadieneinteilung nach der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Rheuma = Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

An Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises lagen im Patientenkollektiv eine rheumatoide Arthritis, drei Lupus erythematoses, eine Mischkollagenose, eine Dermatomyositis sowie mehrere systemische Sklerosen (drei CREST-Syndrome, eine systemische Sklerose sine Scleroderma, eine progressiv systemische Sklerose, eine klassische Sklerodermie) vor.

3.2.1.4 PAH-spezifische Medikation des Studienkollektivs

Tabelle 6 gibt einen Überblick der PAH-spezifischen Medikamente, die im Beobachtungszeitraum von den Patienten eingenommen wurden. Für die therapienaiven Patienten sind die Medikamente, die zur Therapieeinleitung verschrieben wurden, aufgelistet. Kein Patient erhielt hochdosierte Kalzium-Antagonisten. Außerdem aufgelistet sind Endothel-beeinflussende Präparate (v.a. Beta-Blocker, ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptorblocker, niedrigdosierte Kalziumkanalblocker) und Marcumar. Von den gesunden Kontrollprobanden wurden keine Medikamente eingenommen.

Tabelle 6: PAH-spezifische Medikation des Studienkollektivs

	Studiengruppe		
	1	2	1&2
PDE5-I	28/82,4%	8/32%	36/61%
ERA	25/73,5%	19/76%	44/74,6%
PG	14/41,2%	3/12%	17/28,8%
Riociguat	1/2,9%	3/12%	4/6,8%
TKI	3/8,8%	0	3/5,1%
Marcumar	22/64,7%	12/48%	34/57,6%
Endothelm.	19/55,9%	18/72%	37/62,7%

Angabe der absoluten Anzahl / % der Gesamtstichprobe; PDE5-I = Phosphodiesterase 5-Inhibitoren, ERA = Endothelinrezeptor-Antagonisten, PG = Prostaglandinderivate, TKI = Tyrosinkinaseinhibitoren, Endothelm. = Endothelmodulierende Medikamente

3.2.1.5 Serologische Parameter

Zum Baseline-Zeitpunkt wurden ausgewählte Blutwerte der Patienten erfasst (Tabelle 7). Bei 15 gesunden Probanden wurden diese Laborwerte, außer der Erythrozytenverteilungsbreite, ebenfalls untersucht. Nach der National Kidney Foundation hatten 15 Patienten und acht Kontrollprobanden eine Niereninsuffizienz im Stadium II, 21 Patienten im Stadium III und zwei Patienten im Stadium IV. Elf weibliche und fünf männliche Patienten hatten zudem einen anämischen Hämoglobinwert ($Hb < 12 \text{ g/dl}$ bzw. 13 g/dl). Der Mann-Whitney-U-Test diente zur Analyse von Unterschieden zwischen den Studiengruppen. Gesunde Kontrollprobanden hatten signifikant niedrigere CRP-, GGT- und Kreatinin-Werte als das Patientenkollektiv. Die Urea-Konzentrationen waren bei gesunden Probanden jedoch signifikant höher.

Tabelle 7: Zum Baseline-Zeitpunkt erhobene serologische Werte

	Studiengruppe				p-Werte			
	1	2	1&2	3	1vs.2	1vs.3	1&2vs.3	2vs.3
CRP [mg/l]	0 (0–30)	0 (0–32)	0 (0–32)	0 (0–0)	0,143	0,014*	0,005*	0,011*
EVB [%]	14,9 (11,1–23,8)	14,9 (12,6–20)	14,9 (11,1–23,8)		0,602			
Hb [g/dl]	12,85 (6,8–17)	13,7 (10,5–16,9)	13,5 (5,8–17)	13,6 (12,3–15,7)	0,17	0,104	0,32	0,978
Hkt [%]	39,4 (30,5–51,2)	40,6 (28,8–49,7)	40,2 (28,8–51,2)	40,6 (36,3–45,2)	0,263	0,318	0,677	0,679
GOT [U/l]	26 (6–63)	24 (13–70)	24 (6–70)	23 (12–41)	0,276	0,745	0,995	0,679
GPT [U/l]	18,5 (8–116)	24 (9–41)	21 (8–116)	26 (15–49)	0,237	0,106	0,185	0,507
GGT [U/l]	34 (9–397)	50 (16–242)	46 (9–397)	17 (12–44)	0,72	0,003*	<0,001*	<0,001*
Urea [mg/dl]	19 (8–57)	16 (7–50)	18 (7–57)	29 (21–44)	0,341	0,001*	<0,001*	<0,001*
Kreatinin [mg/dl]	1,02 (0,7–2)	0,9 (0,52–4,8)	1 (0,52–4,8)	0,78 (0,49–1,14)	0,558	0,001*	0,001*	0,005*
GFR [ml/min]	70,12 (26,63–167,86)	77,47 (22,57–146,8)	74,26 (22,57–167,86)	79,61 (60,12–189,17)	0,662	0,134	0,108	0,164

Ergebnisse

Angabe des Medians (Minimum – Maximum) und der p-Werte, *= signifikante Differenz der Mittelwerte; CRP = C-reaktives Protein, EVB = Erythrozytenverteilungsbreite, Hb = Hämoglobin-Konzentration, Hkt = Hämatokrit, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GGT = Gamma-Glutamyltransferase, GFR = Glomeruläre Filtrationsrate

3.2.1.6 Etablierte PH-Prognoseparameter

In Tabelle 8 sind allgemein gültige Prognoseparameter der Pulmonalen Hypertonie dargestellt. Die Daten wurden zum Baseline-Zeitpunkt erhoben. Die meisten Studienpatienten (40 von 59 Patienten) befanden sich zum Baseline-Zeitpunkt in den NYHA-Stadien III und IV (Abb. 5). Alle Kontrollprobanden befanden sich im NYHA-Stadium I.

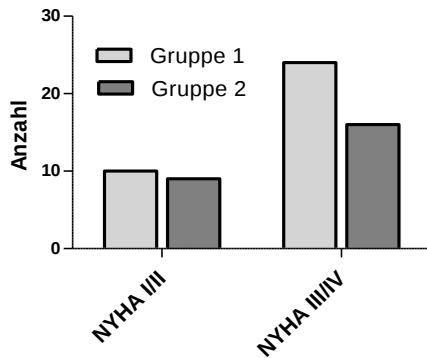


Abb. 5: Balkendiagramm zur Darstellung der absoluten Häufigkeiten nach NYHA-Stadium.

Der 6-Minuten-Gehtest wurde bei 49 (von 59) Patienten und bei 29 (von 30) Kontrollprobanden durchgeführt. Gegenüber beiden Patientengruppen erzielten die gesunden Probanden signifikant längere Gehstrecken innerhalb von sechs Minuten. Auch der BORG-Index war signifikant besser bei gesunden Probanden. Die Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, die Blutgasanalyse zur Erfassung des CO₂-Partialdruckes sowie exakte echokardiografische Parameter wurden nur bei den Patienten erhoben. In diesen Parametern unterschieden sich therapierte von therapienaiven Patienten nicht. Der NT-proBNP-Plasmaspiegel wurde zum Baseline-Zeitpunkt bei 58 Patienten und 15 Kontrollprobanden erhoben. Signifikant niedrigere Werte gegenüber den Patientengruppen fielen bei gesunden Probanden auf.

Tabelle 8 : Etablierte PH-Prognoseparameter zum Baseline-Zeitpunkt

	Studiengruppe				p-Werte	
	1	2	1&2	3	1vs.2	1/1&2/2vs.3
NYHA	2,71 ±0,58	2,6 ±0,58	2,66 ± 0,58	1	0,49	< 0,001*
Gehstrecke [m]	410,14 ±119,81	369,62 ±125,08	392,78 ±122,49	631,97 ±79,16	0,431	< 0,001*
BORG-Index	4,37 ±1,94	4,95 ±1,91	4,63 ±1,93	0	0,297	< 0,001*
DLCO [mmol/min/kPa]	6,41 ±3,64	5,75 ±2,41	6,13 ±3,17		0,879	
DLCO [%]	74,79 ±51,85	67,71 ±25,04	71,83 ±42,56		0,567	
paCO2 [mmHg]	35, 92 ±6,61	35,69 ±5,41	35,82 ±6,1		0,886	
O2 [L]	0,38 ±1,1	0,3 ±0,82	0,35 ±0,99		0,761	
RVSP [mmHg]	59,80 ±21,2	60,04 ±21,38	59,91 ±21,07		0,879	
TAPSE [mm]	19,19 ±12,24	18,31 ±5,5	18,82 ±9,91		0,567	
Tei-Index	0,69 ±0,16	0,69 ±0,24	0,69 ±0,19		0,729	
NT-proBNP [ng/l]	613 (43 – 6861)	1458 (19 - 24578)	785,6 (19 – 24578)	59 (25 -120)	0,336	< 0,001*

Ergebnisse

Angabe der Mittelwerte ± Standardabweichung bzw. des Medians (Minimum – Maximum) sowie der p-Werte (*= signifikante Differenz der Mittelwerte); NYHA = Klassifikation nach New York Heart Association, DLCO = Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, paCO2 = Kohlendioxid-Partialdruck, O2 = Sauerstoffzufuhr, RVSP = Right ventricular systolic pressure, TAPSE = Tricuspid annular plane systolic excursion, NT-pro BNP= N-terminales pro B-natriuretisches Peptid

3.2.2 Überblick der Follow-Up-Messungen

Die durchschnittliche Anzahl an Monaten bis zu der jeweils nächsten Messwiederholung ist in Abb. 6 zusammengefasst. Die Follow-Ups zwei bis vier erfolgten im angestrebten Rahmen nach drei, sechs und neun Monaten. Der fünfte Termin (nach zwölf Monaten) wurde im Schnitt um drei Monate überschritten.

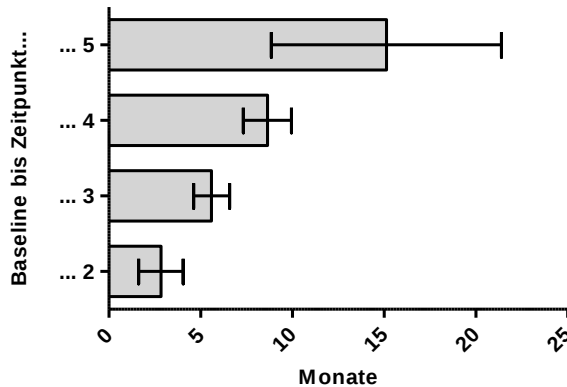


Abb. 6: Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Zeitspanne vom Einschlussdatum zu den Zeitpunkten der Messwiederholungen. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen.

Zum Baseline-Erhebungsdatum waren alle Patienten anwesend. Mit jedem wiederholten Termin nahm die Anzahl der Patienten ab. Zum letzten Follow-Up konnten die meisten Patienten wieder rekrutiert werden (Abb. 7).

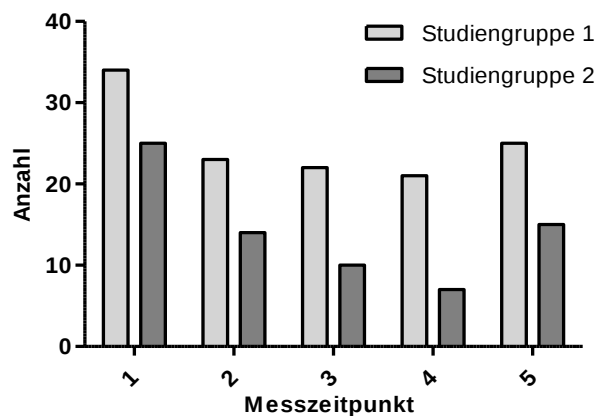


Abb. 7: Balkendiagramm zur Darstellung der Anzahl der Patienten zu Zeitpunkten der Messwiederholungen nach Studiengruppe.

3.2.2.1 PH-Prognoseparameter im Verlauf

Die Veränderungen der Ergebnisse des 6-Minuten-Gehtests sowie der NT-proBNP-Plasmakonzentrationen der einzelnen Studienvisiten sind in Abb. 8 und Abb. 9 dargestellt. Die Darstellung beschränkt sich auf die Studiengruppe 2, da die Verlaufsbeurteilung nur der initial therapienaiven Patienten erfolgen soll. Die zurückgelegten Meter im 6-Minuten-Gehtest stiegen im Median bis zum zweiten Follow-Up an, sanken danach wieder, um zum vierten Messzeitpunkt wieder anzusteigen (Abb. 8). Die medianen NT-proBNP-Werte verhielten sich invers (Abb. 9), jedoch fand vom vierten zum fünften Messzeitpunkt bei beiden Untersuchungsergebnissen ein Absinken der Werte statt. Mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test konnte sowohl für die Gehstrecke als auch für die NT-proBNP-Konzentration ein signifikanter (p -Wert = 0,037 bzw. p -Wert = 0,046) Anstieg bzw. Abfall der Werte nach einem Jahr analysiert werden.

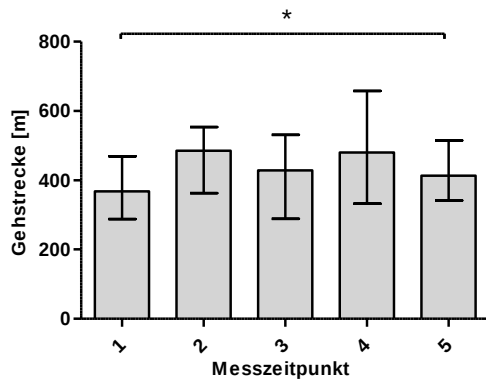


Abb. 8: Balkendiagramm zur Darstellung der Gehstrecke im Verlauf (Studiengruppe 2, Daten aller mindestens zum ersten und letzten Messzeitpunkt anwesenden Patienten). Angabe der Mediane und IQR. *= p -Wert $\leq 0,05$.

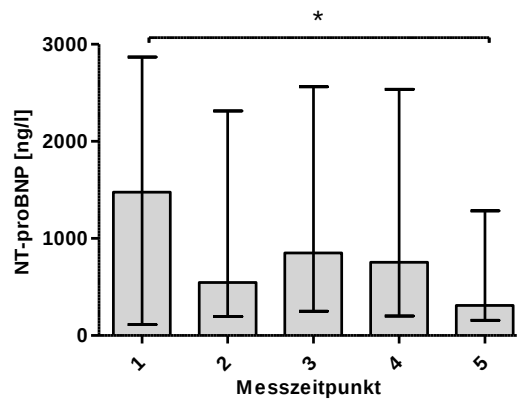


Abb. 9: Balkendiagramm zur Darstellung der NT-proBNP-Konzentrationen im Verlauf (Studiengruppe 2, Daten aller mindestens zum ersten und letzten Messzeitpunkt anwesenden Patienten). Angabe der Mediane und IQR. *= p -Wert $\leq 0,05$.

3.3 REACTIVE HYPEREMIA INDEX

3.3.1 Baseline-Werte

Am Einschlussdatum fand die Messung des RHI mit dem EndoPat2000-System bei allen Patienten und gesunden Probanden statt. Aus technischen Gründen konnte bei je einem Patienten aus Gruppe 1 und aus Gruppe 2 der Baseline-RHI-Wert nicht berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Die definierte Schwelle der endothelialen Dysfunktion liegt bei einem RHI-Wert von 1,67 (Peled et al. 2008, Yinon et al. 2006). Werte unterhalb von 1,67 lassen auf eine endotheliale Dysfunktion schließen. Nach Ausschluss von Kontrollprobanden mit Baseline-Werten unterhalb dieser Schwelle (neun Probanden) wurde ein medianer RHI-Wert von 2,27 errechnet. Statistische Tests mit dieser reduzierten Kontrollgruppe erbrachten Ergebnisse, die mit denen der kompletten Kontrollgruppe vergleichbar waren. Daher wird im Folgenden auf die zusätzliche Darstellung der Kontrollgruppe mit RHI-Werten ausschließlich größer als 1,66 verzichtet. Der Vollständigkeit halber sind in Tabelle 9 zudem die medianen Werte für PAH- und CTEPH-Patienten angegeben. Weitere PH-Klassen-spezifische Analysen werden nicht dargestellt, da die Gruppe der CTEPH-Patienten sehr klein (zwölf Patienten) war und sich keine zuverlässigen analytischen Ergebnisse produzieren ließen.

Tabelle 9: RHI-Werte zum Baseline-Zeitpunkt nach Studiengruppe und PH-Klasse

	Studiengruppe				PH-Klasse	
	1	2	1&2	3	PAH	CTEPH
RHI	2,08 (1,19 - 5,05)	1,48 (1,0 - 2,88)	1,87 (1,0 - 5,05)	1,84 (1,0 - 3,8)	2,08 (1,0-5,05)	1,48 (1,25-2,45)

Angabe des Medians (Minimum – Maximum); RHI= Reactive Hyperemia Index

Anhand der medianen RHI-Werte war ersichtlich, dass einerseits therapienaive Patienten geringere RHI-Werte hatten als gesunde Probanden oder therapierte Patienten. Andererseits konnten auch bessere RHI-Werte bei therapierten Patienten als bei gesunden Probanden ermittelt werden. Der RHI von therapienaiven Patienten der Studiengruppe 2 war signifikant niedriger als in den Studiengruppen 1 und 3 ($p=0,029$ und $p=0,034$; Mann-Whitney-U-Test). Zwischen therapierten PH-Patienten und gesunden Probanden gab es keinen signifikanten Unterschied (Abb. 10).

Ergebnisse

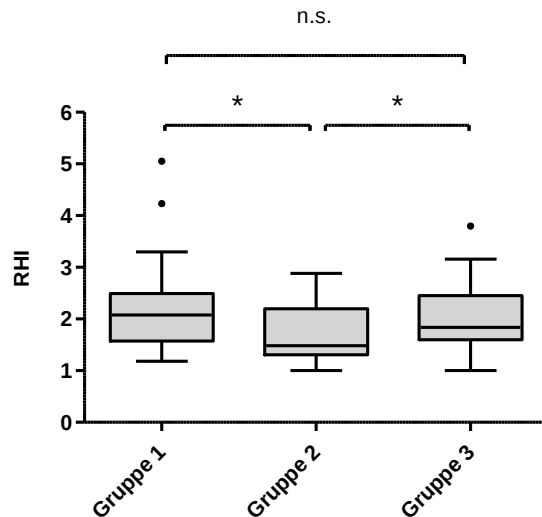


Abb. 10: Box-Whisker-Plots zur Darstellung der RHI-Werte je Studiengruppe zum Baseline-Zeitpunkt. Angabe des Medians und des IQR. Die Whisker sind definiert nach Tukey. Ausreißerwerte sind als Punkte dargestellt.
*=p-Wert $\leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

Statistische Charakteristik des RHI

Der Test von Kolmogorov-Smirnov und auch die optische Überprüfung der Verteilungskurve zeigten, dass die Werte des RHI nicht normalverteilt waren. Der Median aller zum Baseline-Zeitpunkt bei Patienten erhobenen Werte lag bei 1,87. Dieser Wert galt daher in diesem kleinen Studienkollektiv als Cutoff-Wert für die Definition der endothelialen Dysfunktion. Werte kleiner als 1,87 wurden als dysfunktional gewertet.

Durch Logarithmieren der RHI-Werte konnte eine Normalverteilung erreicht werden.

RHI und Rauchverhalten

Eine Spearman-Korrelationsanalyse erbrachte keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Rauchverhalten der Studienteilnehmer gemessen in packyears und den RHI-Werten (Patientenkollektiv: p-Wert=0,388, Korrelationskoeffizient (R)=-0,118; Kontrollgruppe: p-Wert=0,698, R=0,074).

3.3.2 RHI und etablierte PH-Prognoseparameter

Um seine diagnostische und prognostische Relevanz in der Klinik zu überprüfen, wurde der RHI mit verschiedenen, bereits etablierten Prognoseparametern zur Verlaufsbeurteilung der Pulmonalen Hypertonie verglichen.

3.3.2.1 RHI und NYHA-Stadium

Die NYHA-Klassifikation ist ein wichtiger Prognosewert in der Behandlung von PH-Patienten. In Abb. 11-13 sind die RHI-Werte nach NYHA-Stadien und Studiengruppen dargestellt. Zusammengefasst wurden je die NYHA-Stadien I und II sowie die Stadien III und IV. Es war ersichtlich, dass sich in allen Studiengruppen höhere RHI-Werte bei Patienten der NYHA-Klassen I und II ergaben. Ein signifikanter Unterschied der RHI - Mittelwerte zwischen den NYHA-Stadien konnte nicht gefunden werden. Mittels Chi-Quadrat-Test konnte kein Zusammenhang zwischen hohem bzw. niedrigem RHI und niedrigem bzw. hohem NYHA-Stadium gezeigt werden (p-Wert >0,05).

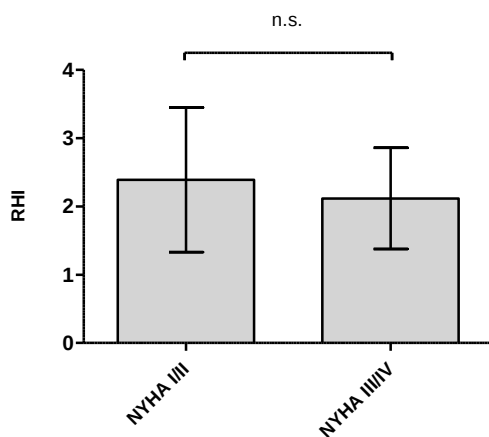


Abb. 11: Studiengruppe 1

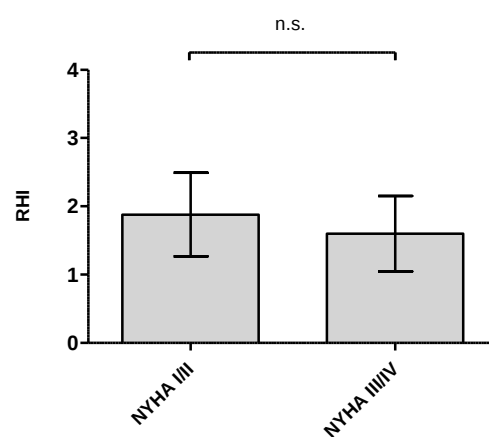


Abb. 12: Studiengruppe 2

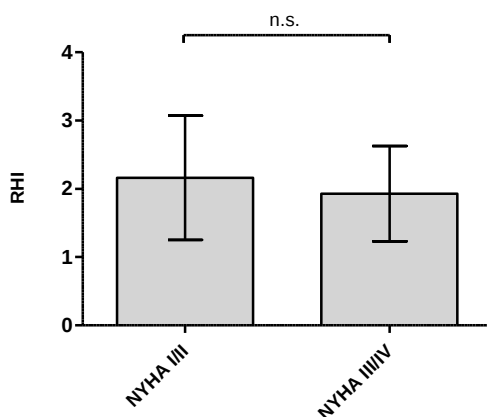


Abb. 13: Studiengruppe 1 und 2

Abb. 11 - 13: Balkendiagramme zur Darstellung der RHI-Verteilung nach NYHA-Klasse je Studiengruppe. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen. n.s. = nicht signifikant.

3.3.2.2 RHI und 6-Minuten-Gehtest

Im 6-Minuten-Gehtest zum Baseline-Zeitpunkt wurde unter anderem die erreichte Gehstrecke in Metern erhoben. Patienten mit geringerem RHI (entspricht einer endothelialen Dysfunktion) legten weniger Meter zurück als Patienten mit höherem RHI (Abb. 14 für Patienten der Studiengruppen 1 und 2). Eine signifikante Differenz der mittleren Gehstrecke zwischen hohen und niedrigen RHI-Werten konnte jedoch nicht gezeigt werden ($p=0,084$; Mann-Whitney-U-Test). Untersuchungen mit dem RHI-Grenzwert 1,67 (Yinon et al. 2006, Peled et al. 2008) erbrachten ähnliche Resultate (nicht dargestellt).

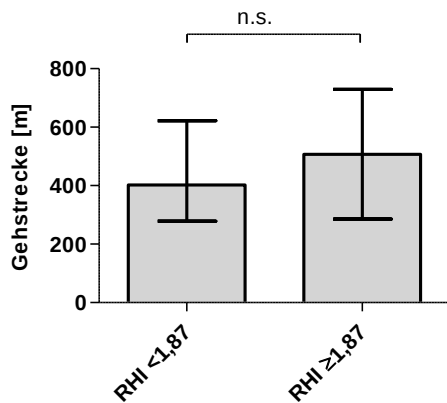


Abb. 14: Balkendiagramm zur Darstellung der Gehstrecke nach RHI-Werten. Abgebildete Ergebnisse des gesamten Patientenkollektivs. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen (n.s.= nicht signifikant).

Mittels Korrelationsanalysen wurde für das gesamte Patientenkollektiv ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen dem RHI und der 6-Minuten-Gehstrecke (Abb. 17) ermittelt. Bei Verbesserung des RHI war somit auch eine längere Gehstrecke im 6-Minuten-Gehtest zu erwarten. Für die einzelnen Studiengruppen 1 und 2 resultierten ebenfalls positive Korrelationskoeffizienten, jedoch waren die zugehörigen p-Werte nicht signifikant.

Ergebnisse

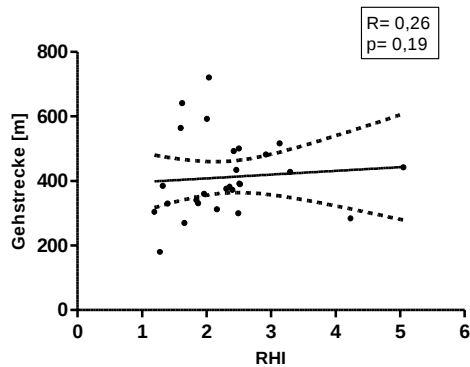


Abb. 15: Studiengruppe 1

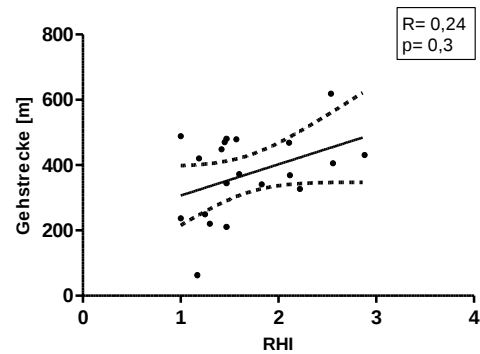


Abb. 16: Studiengruppe 2

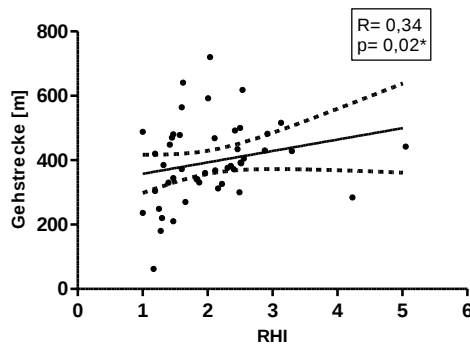


Abb. 17: Studiengruppen 1 und 2

Abb. 15-17: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der Gehstrecke zum Baseline-Zeitpunkt. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95%-Konfidenzintervall (R = Spearman-Korrelationskoeffizient, p = p -Wert).

3.3.2.3 RHI und Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität

In allen Gruppen konnte mittels Korrelationsanalysen ein positiver, jedoch nicht signifikanter Zusammenhang zwischen sowohl der absoluten als auch der prozentualen Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität und dem RHI gemessen werden (Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt

	Studiengruppe		
	1	2	1&2
DLCO Ist [mmol/min/kPa]	R 0,207 p 0,263	R 0,129 p 0,568	R 0,162 p 0,246
DLCO [%]	R 0,196 p 0,291	R 0,077 p 0,732	R 0,137 p 0,329

R = Spearman-Korrelationskoeffizient, p = p -Wert, DLCO = Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität

3.3.2.4 RHI und kapilläre Blutgasanalyse

Als potentiell prognostischer Wert der Blutgasanalyse wurde der Kohlendioxid-Partialdruck mit dem RHI korreliert. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang ermittelt (Tabelle 11). Auch im Mann-Whitney-U-Test wurde kein Unterschied der Kohlendioxid-Partialdrücke zwischen supra- und inframedianen RHI-Werten festgestellt (vergleichbare Ergebnisse für den RHI-Cutoff-Wert 1,67).

Tabelle 11: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt

	Studiengruppe		
	1	2	1&2
paCO ₂ [mmHg]	R 0,146 p 0,417	R -0,234 p 0,294	R -0,015 p 0,916

R= Spearman-Korrelationskoeffizient, p= p-Wert, paCO₂ = Kohlendioxid-Partialdruck

3.3.2.5 RHI und NT-proBNP-Konzentration

In der Korrelationsanalyse konnte für die Studiengruppe 1 ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen dem RHI und der NT-proBNP-Plasmakonzentration nachgewiesen werden (Abb. 18). In den anderen Studiengruppen war der Zusammenhang ebenfalls negativ, jedoch geringer ausgeprägt und nicht signifikant.

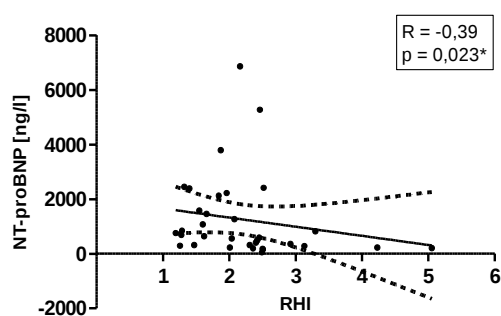


Abb. 18: Studiengruppe 1

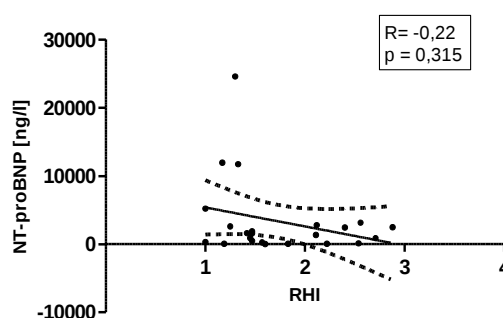


Abb. 19: Studiengruppe 2

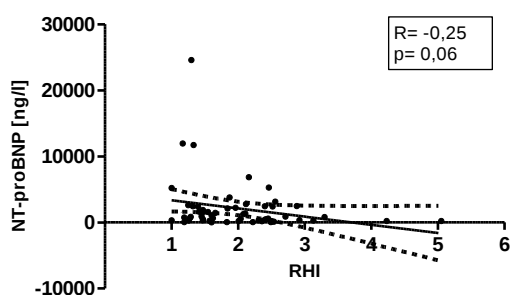


Abb. 20: Studiengruppe 1 und 2

Abb. 18-20: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der NT-proBNP-Konzentration zum Baseline-Zeitpunkt. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95%-Konfidenzintervall (R= Spearman-Korrelationskoeffizient, p= p-Wert).

3.3.2.6 RHI und echokardiografische Parameter

Die echokardiografische Untersuchung wurde bei Patienten der PH-Ambulanz im UKE meist halbjährlich durchgeführt. Im Durchschnitt lagen zwischen der Baseline-Messung des RHI und der Echokardiografie 1,1 Monate. Zwischen RHI und den Parametern RVSP, TAPSE und Tei-Index gab es keine signifikante Korrelation. Die Korrelationskoeffizienten je Echokardiografieparameter unterschieden sich in den Studiengruppen stark (Tabelle 12). Gesunde Kontrollprobanden erhielten eine orientierende Ultraschalluntersuchung. Bei keinem Probanden fiel hier eine schwerwiegende kardiopulmonale Veränderung auf.

Tabelle 12: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt

	Studiengruppe		
	1	2	1&2
RVSP [mmHg]	R -0,05 p 0,799	R 0,098 p 0,665	R 0,051 p 0,722
TAPSE [mm]	R -0,091 p 0,647	R 0,125 p 0,598	R -0,023 p 0,878
Tei-Index	R -0,144 p 0,502	R 0,114 p 0,662	R 0,042 p 0,796

R= Spearman-Korrelationskoeffizient, p= p-Wert, RVSP = Right ventricular systolic pressure, TAPSE = Tricuspid annular plane systolic excursion

3.3.2.7 RHI und hämodynamische Parameter

Es gab in keiner Studiengruppe signifikante Korrelationen der RHI-Werte mit den Ergebnissen der Rechtsherzkatheteruntersuchung.

3.3.3 RHI im Verlauf

Durch die mehrmalige Wiederholung der Datenerhebung konnte der RHI im Verlauf dargestellt werden. Im Fokus der Analyse stand hierbei die Studiengruppe 2 mit therapienaiven Patienten, um eine mögliche Veränderung des RHI nach Therapieeinleitung zu erfassen. Es wurden daher nur therapienaive Patienten in die Verlaufsanalysen einbezogen, die zusätzlich mindestens zur ersten und zur Studiervisite nach einem Jahr anwesend waren. Insgesamt waren dies fünfzehn Patienten. Lediglich für einen Patienten konnte aus technischen Gründen kein RHI für das Follow-Up nach einem Jahr errechnet werden.

3.3.3.1 Überblick der Werte im Verlauf

Für die Patienten der therapienaiven Studiengruppe 2 erfolgte die Therapieeinleitung innerhalb von Tagen um den Studienbeginn herum. Für diese Gruppe ließ sich bis zum dritten Messzeitpunkt ein Anstieg (nicht signifikant im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) des RHI verzeichnen. Nach der dritten Datenerhebung sank dieser jedoch wieder ab. Zum fünften Messzeitpunkt fand eine leichte Erhöhung der Werte von 1,34 im Median auf 1,42 statt (Abb. 21).

Eine Varianzanalyse (ANOVA) für Messwertwiederholungen mit den logarithmierten und dann normalverteilten RHI-Werten erbrachte keine ausreichenden p-Werte als Ausdruck einer signifikanten Veränderung des RHI im Verlauf. Mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde ein signifikanter Abfall der RHI-Werte von Messzeitpunkt 3 zu Messzeitpunkt 5 festgestellt (p-Wert= 0,028).

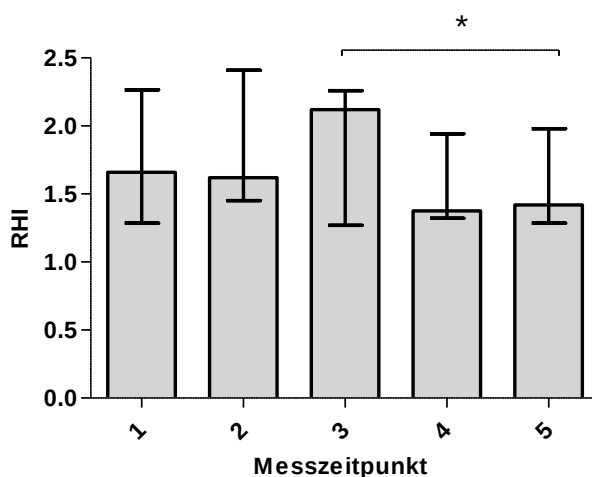


Abb. 21: Balkendiagramm zur Darstellung der RHI-Werte im Verlauf (Studiengruppe 2, Daten aller mindestens zum ersten und letzten Messzeitpunkt anwesenden Patienten). * = p-Wert $\leq 0,05$. Angabe der Mediane und IQR.

3.3.3.2 RHI und Clinical Worsening und Überleben

In die Analyse des Clinical Worsening wurden alle 25 Patienten der Studiengruppe 2 einbezogen. In die Überlebenszeitanalyse wurden zusätzlich Patienten der Studiengruppe 1 einbezogen (n= 59).

Als Clinical Worsening wurden verschiedene Ereignisse betrachtet (s. Abschnitt 2.1.4.1). Insgesamt sind im Beobachtungszeitraum fünf Patienten in Studiengruppe 1 und zwei Patienten aus Studiengruppe 2 verstorben. Für einen Studienpatienten aus Gruppe 1 konnte bezüglich des Überlebens keine Aussage getroffen werden (lost to follow-up). Tabelle 13 stellt die Häufigkeiten einer eingetretenen klinischen Verschlechterung und die Anzahl der Monate bis zum Eintreten der Verschlechterung in der Studiengruppe 2 sowie die Überlebensdaten im gesamten Patientenkollektiv dar.

Tabelle 13: Darstellung während der Studienzeit aufgetretener Ereignisse

	CW	Tod	
Studiengruppe 2	12/48%	7/12%	Studiengruppen 1&2
TtCW (Monate)			Tod (Monate)
RHI < 1,87	3,5 (1 – 19)	15 (10-50)	RHI < 1,87
RHI ≥ 1,87	4 (1 – 18)	24,5 (2-35)	RHI ≥ 1,87

Angabe der absoluten Anzahl / % der Gesamtstichprobe bzw. des Medians (Minimum – Maximum); CW = Clinical Worsening, TtCW = Time to Clinical Worsening, RHI = Reactive Hyperemia Index

Die medianen Zeitspannen ohne klinische Verschlechterung der therapienaiven Patienten mit RHI-Werten größer-gleich und kleiner als 1,87 (Median der RHI-Werte im Patientenkollektiv) unterschieden sich kaum (Tabelle 13). Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven zeigten einen Trend zu einer längeren ereignisfreien Zeit bei supramedianen RHI-Werten (Abb. 22). Außerdem dargestellt ist die Kaplan-Meier-Kurve für die klinische Verschlechterung mit dem RHI-Wert 1,67 als Grenzwert. Die Überlebenszeiten waren länger bei supramedianen RHI-Werten (Tabelle 13; p-Wert >0,05 im Mann-Whitney-U-Test). Die entsprechenden Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurven (ebenfalls durchgeführt für den Cutoff-Wert 1,67) überlagerten sich stark (nicht abgebildet).

Mit dem Exakten Test nach Fisher konnte kein Zusammenhang zwischen hohem bzw. niedrigem RHI-Wert und aufgetretener bzw. keiner klinischen Verschlechterung (Tod bzw. kein Tod) gefunden werden.

Ergebnisse

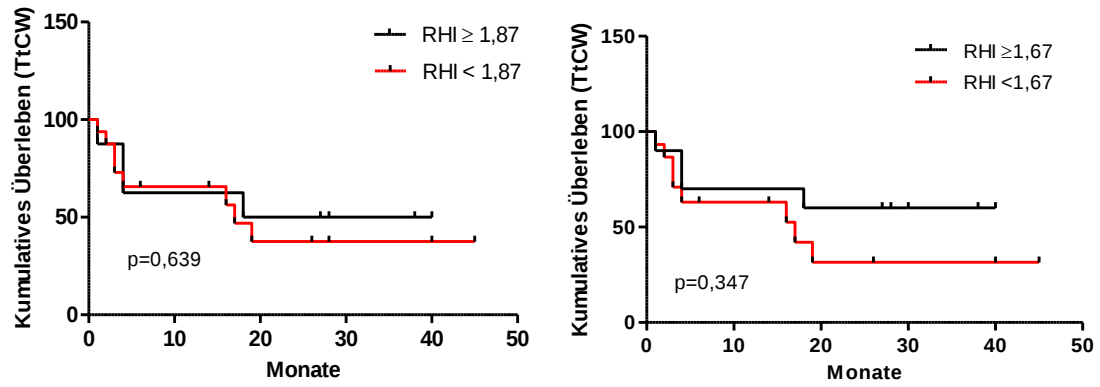


Abb. 22: Überlebenszeitkurven bis zur klinischen Verschlechterung der Studiengruppe 2 getrennt nach dem RHI-Wert 1,87 bzw. 1,67. p = p -Wert ermittelt im Logrank-Test.

3.4 BIOMARKER DER ENDOTHELIALEN DYSFUNKTION

3.4.1 Baseline Werte

Am Einschlussdatum fand die Bestimmung der ADMA-, SDMA-, L-Arginin- und Homoarginin-Plasmakonzentrationen bei allen Patienten und 28 gesunden Probanden statt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin zum Baseline-Zeitpunkt nach Studiengruppe und PH-Klasse

	<i>Studiengruppe</i>				<i>PH-Klasse</i>	
	1	2	1&2	3	PAH	CTEPH
ADMA [µM]	0,64 (0,42-0,95)	0,68 (0,35-1,06)	0,65 (0,35-1,06)	0,62 (0,31-0,83)	0,62 (0,35-1,06)	0,72 (0,52-1,05)
SDMA [µM]	0,66 (0,4-1,39)	0,65 (0,38-2,72)	0,66 (0,38-2,72)	0,54 (0,37-0,8)	0,65 (0,38-2,72)	0,71 (0,51-1,02)
L-Arginin [µM]	82,3 (35,5-63,8)	81 (43,3-155)	81,15 (35,5-163,8)	98,4 (50,8-170,1)	80 (35,5-163,8)	91,2 (65,2-109,6)
Homoarginin [µM]	1,66 (0,49-3,19)	1,37 (0,63-4,02)	1,64 (0,49-4,02)	2,33 (1,16-6,62)	1,64 (0,49-4,02)	1,57 (0,63-3,18)

Angabe des Medians (Minimum – Maximum); ADMA= Asymmetrisches Dimethylarginin, SDMA= Symmetrisches Dimethylarginin

Anhand der medianen Plasmakonzentrationen war ersichtlich, dass gesunde Probanden niedrigere ADMA- und SDMA- Konzentrationen aufwiesen als das Patientenkollektiv (signifikant niedrigere Werte für SDMA; s. Abb. 23).

Für L-Arginin und Homoarginin wurden bei gesunden Kontrollprobanden signifikant höhere Konzentrationen im Plasma ermittelt als bei therapierten bzw. therapienaiven Patienten.

Ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen therapienaiven und therapierten Patienten konnte für keinen Biomarker ermittelt werden.

Ergebnisse

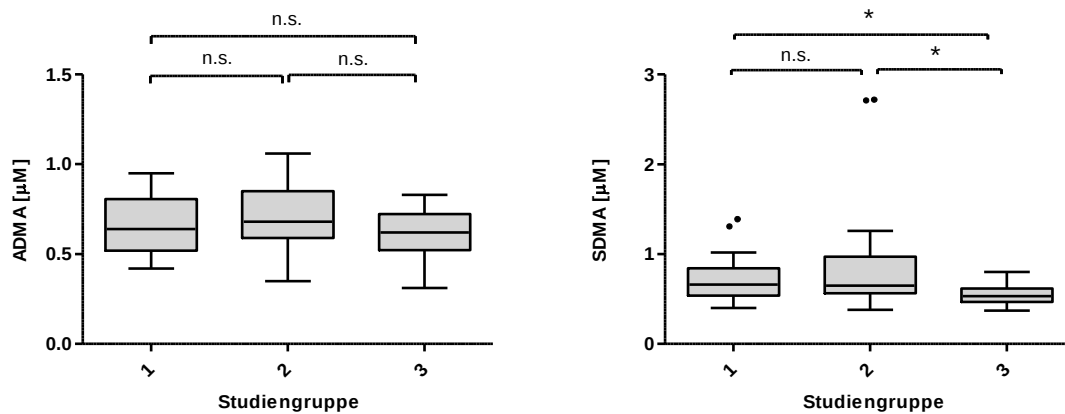


Abb. 23: Box-Whisker-Plots zur Darstellung der ADMA- und SDMA-Konzentrationen je Studiengruppe zum Baseline-Zeitpunkt. Angabe des Medians und des IQR. Die Whisker sind definiert nach Tukey. Ausreißerwerte sind als Punkte dargestellt (*= p -Wert $\leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant).

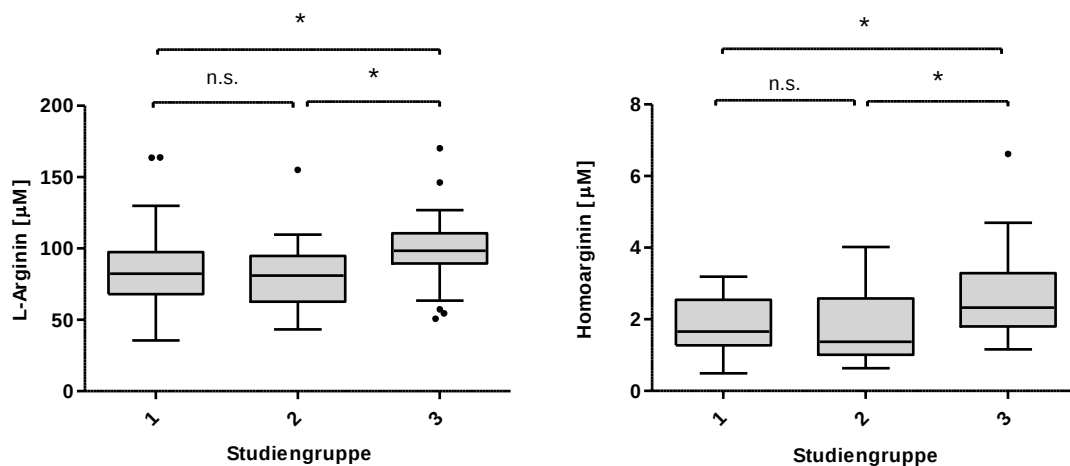


Abb. 24: Box-Whisker-Plots zur Darstellung der L-Arginin- und Homoargininkonzentrationen je Studiengruppe zum Baseline-Zeitpunkt. Angabe des Medians und des IQR. Die Whisker sind definiert nach Tukey. Ausreißerwerte sind als Punkte dargestellt (*= p -Wert $\leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant).

Statistische Charakteristik der Biomarker

Die ermittelten Plasmakonzentrationen der Biomarker aller Messzeitpunkte waren nicht durchgehend normalverteilt. Daher erfolgte die Auswertung der Ergebnisse mit nicht-parametrischen Tests.

Als Cutoff-Wert wurde je die mediane Baseline-Konzentration der einzelnen Biomarker definiert (s. Tabelle 14).

Biomarker und Parameter der Nierenfunktion

Das Kreatinin war im Patientenkollektiv signifikant korreliert mit ADMA (p-Wert=0,009, Korrelationskoeffizient (R) = 0,339) und SDMA (p-Wert<0,001, R=0,696).

Für die glomeruläre Filtrationsrate und ADMA (p-Wert=0,001, R=-0,415), SDMA (p-Wert<0,001, R=-0,736) und Homoarginin (p-Wert=0,009, R=0,339) wurden ebenfalls signifikante Zusammenhänge ermittelt (gesamtes Patientenkollektiv).

3.4.2 Biomarker und etablierte PH-Prognoseparameter

Um eine Aussage über die Tauglichkeit als Biomarker zur Prognoseabschätzung für die Pulmonale Hypertonie treffen zu können, wurden ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin mit gängigen PH-Prognoseparametern verglichen.

3.4.2.1 Biomarker und NYHA-Stadium

Anhand der medianen Plasmakonzentrationen ließ sich erkennen, dass die ADMA- und SDMA-Konzentrationen höher waren in höheren NYHA-Stadien. L-Arginin- und Homoarginin-Werte waren niedriger in höheren NYHA-Stadien (Tabelle 15).

Tabelle 15: Angabe der medianen Plasmakonzentrationen (Minimum-Maximum) von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin nach NYHA-Stadium für das gesamte Patientenkollektiv

	ADMA [μM]	SDMA [μM]	L-Arginin [μM]	Homoarginin [μM]
NYHA I/II	0,62 (0,35-0,9)	0,59 (0,38-1,31)	94,3 (35,5-163,8)	1,96 (0,78-3,02)
NYHA III/IV	0,69 (0,41-1,06)	0,69 (0,4-2,72)	79,2 (43,3-163,4)	1,43 (0,49-4,02)

ADMA= Asymmetrisches Dimethylarginin, SDMA= Symmetrisches Dimethylarginin, NYHA= Klassifikation nach New York Heart Association

Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten signifikante Konzentrationsunterschiede festgestellt werden für SDMA in Studiengruppe 2 und knapp nicht signifikante Unterschiede für L-Arginin im gesamten Patientenkollektiv (Abb. 25 und Abb. 26). Für Homoarginin und ADMA wurden keine signifikanten Zusammenhänge mit dem NYHA-Stadium ermittelt.

Ergebnisse

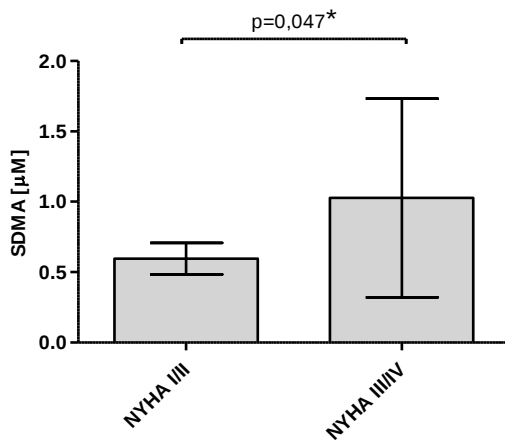


Abb. 25: Studiengruppe 2

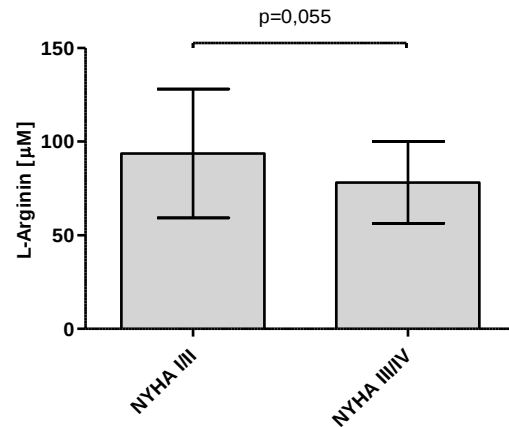


Abb. 26: Studiengruppen 1&2

Abb. 25 und 26: Balkendiagramme zur Darstellung der SDMA- und L-Arginin-Konzentrationen nach NYHA-Klasse. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen; $p = p$ -Wert.

Der Exakte Test nach Fisher zeigte keine signifikanten Zusammenhänge zwischen hohem bzw. niedrigem NYHA-Stadium und Plasmakonzentrationen der Biomarker ober- bzw. unterhalb des jeweiligen Medianwertes.

3.4.2.2 Biomarker und 6-Minuten-Gehtest

Für SDMA und ADMA ergab sich eine signifikant negative Korrelation mit der Gehstrecke im 6-Minuten-Gehtest für das gesamte Patientenkollektiv (s. Abb. 27 und 28). Zusätzlich ergab sich eine signifikante Korrelation für SDMA bei therapienaiven Patienten ($R = -0,462$, $p=0,035$). In allen anderen Analysen sowie für L-Arginin und Homoarginin wurden keine signifikanten Korrelationen beobachtet.

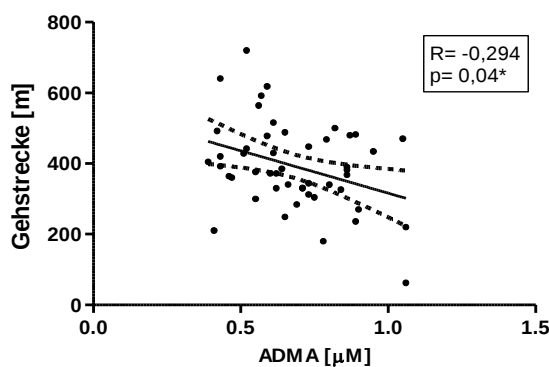


Abb. 27: Studiengruppen 1&2

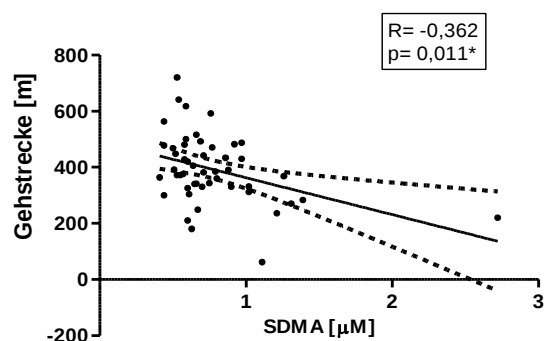


Abb. 28: Studiengruppen 1&2

Abb. 27 und 28: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen ADMA bzw. SDMA und der Gehstrecke zum Baseline-Zeitpunkt. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95%-Konfidenzintervall ($R =$ Spearman-Korrelationskoeffizient, $p = p$ -Wert).

3.4.2.3 Biomarker und Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Spearman-Korrelationsanalyse zwischen der Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität und den Biomarkern dargestellt. Lediglich für L-Arginin gab es in der Gruppe der therapienaiven Patienten eine signifikante positive Korrelation.

Tabelle 16: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den Biomarkern zum Baseline-Zeitpunkt

	Studiengruppe			
	1	2	1&2	
DLCO Ist [mmol/min/kPa]	R -0,223 p 0,221	R 0,133 p 0,545	R -0,031 p 0,822	ADMA
DLCO [%]	R -0,168 p 0,358	R 0,173 p 0,431	R 0,018 p 0,899	
DLCO Ist [mmol/min/kPa]	R -0,128 p 0,485	R -0,337 p 0,116	R -0,215 p 0,115	SDMA
DLCO [%]	R -0,111 p 0,544	R -0,237 p 0,277	R -0,147 p 0,285	
DLCO Ist [mmol/min/kPa]	R -0,248 p 0,179	R 0,569 p 0,005 *	R 0,12 p 0,388	L-Arginin
DLCO [%]	R -0,207 p 0,265	R 0,494 p 0,016 *	R 0,076 p 0,586	
DLCO Ist [mmol/min/kPa]	R -0,09 p 0,625	R 0,238 p 0,274	R 0,106 p 0,443	Homoarginin
DLCO [%]	R -0,123 p 0,503	R 0,099 p 0,653	R -0,008 p 0,956	

R= Spearman-Korrelationskoeffizient, p= p-Wert, * = p-Wert $\leq 0,05$, DLCO = Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, ADMA= Asymmetrisches Dimethylarginin, SDMA= Symmetrisches Dimethylarginin

3.4.2.4 Biomarker und kapilläre Blutgasanalyse

Tabelle 17 fasst die Korrelationsanalysen der Biomarker mit den kapillären Kohlendioxid-Partialdrücken zusammen.

Tabelle 17: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den Biomarkern zum Baseline-Zeitpunkt

	Studiengruppe			
	1	2	1&2	
paCO ₂ [mmHg]	R 0,081	R 0,316	R -0,196	ADMA
	p 0,648	p 0,142	p 0,144	
	R -0,045	R 0,155	R 0,051	SDMA
	p 0,802	p 0,479	p 0,706	
	R 0,392	R 0,089	R 0,284	L-Arginin
	p 0,024 *	p 0,686	p 0,034 *	
	R 0,126	R -0,001	R 0,057	Homoarginin
	p 0,478	p 0,997	p 0,672	

R= Spearman-Korrelationskoeffizient, p= p-Wert, * = p-Wert $\leq 0,05$, paCO₂ = Kohlendioxid-Partialdruck, ADMA= Asymmetrisches Dimethylarginin, SDMA= Symmetrisches Dimethylarginin

Für L-Arginin und den Kohlendioxid-Partialdruck wurde ebenso im Mann-Whitney-U-Test ein Zusammenhang bestätigt (Studiengruppe 1: p-Wert =0,013; Studiengruppe 1&2: p-Wert =0,005, s. Abb. 29). Für SDMA, ADMA und Homoarginin gab es keine signifikanten Ergebnisse.

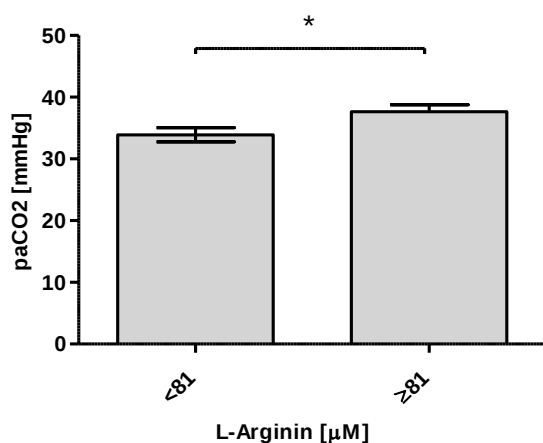


Abb. 29: Balkendiagramm zur Darstellung des Kohlendioxid-Partialdruckes nach supra- bzw. inframedianen L-Arginin-Werten. Abgebildete Ergebnisse des gesamten Patientenkollektivs. Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen (*=p-Wert $\leq 0,05$).

3.4.2.5 Biomarker und NT-proBNP-Konzentration

Für das gesamte Patientenkollektiv wurde eine signifikant positive (für ADMA und SDMA) bzw. negative (für L-Arginin und Homoarginin) Korrelation ermittelt (s. Abb. 30). Für therapienaive Patienten wurde eine positive Korrelation mit ADMA ($R=0,397$; $p=0,054$) und SDMA ($R=0,561$; $p=0,004$) gefunden; für therapierte Patienten eine signifikant positive Korrelation mit SDMA ($R=0,411$; $p=0,016$) und eine signifikant negative Korrelation mit L-Arginin ($R=-0,512$; $p=0,002$).

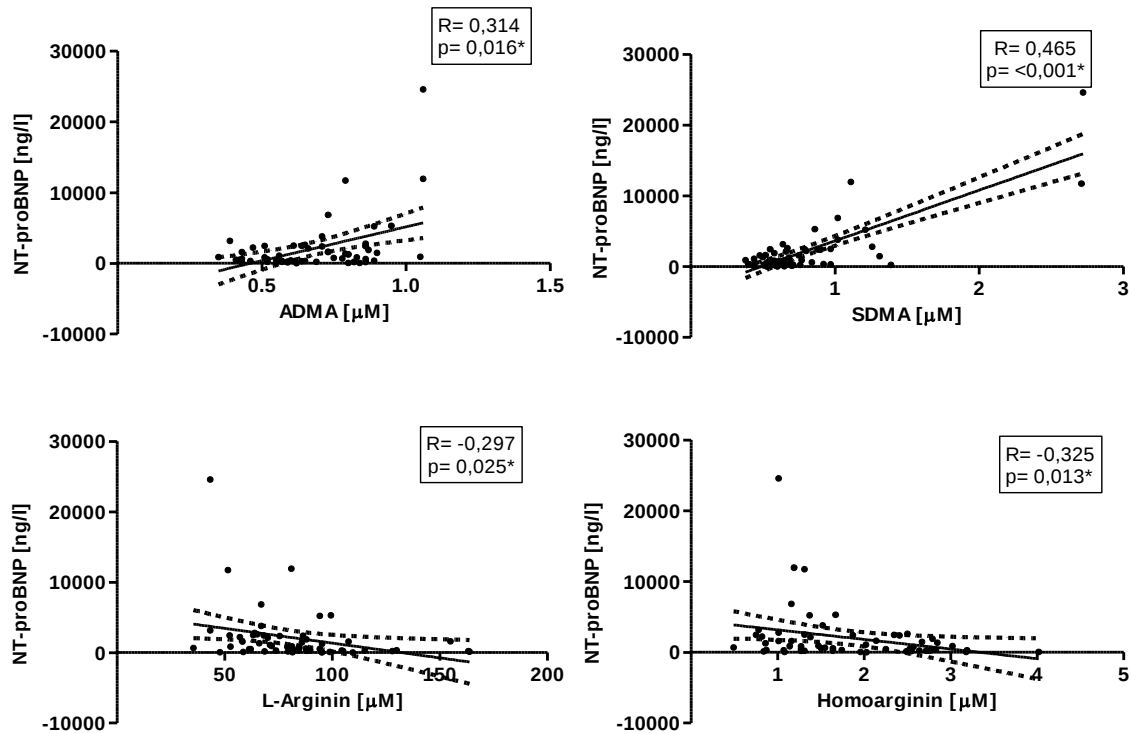


Abb. 30: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen ADMA bzw. SDMA bzw. L-Arginin bzw. Homoarginin und der NT-proBNP-Konzentration zum Baseline-Zeitpunkt für das gesamte Patientenkollektiv. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95%-Konfidenzintervall (R = Spearman-Korrelationskoeffizient, p = p-Wert).

3.4.2.6 Biomarker und echokardiografische Parameter

Zwischen ADMA bzw. SDMA und den echokardiografischen Untersuchungsergebnissen gab es keinen signifikanten Zusammenhang.

L-Arginin und Homoarginin korrelierten signifikant negativ mit dem RVSP bzw. Tei-Index (Tabelle 18).

Tabelle 18: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den Biomarkern zum Baseline-Zeitpunkt

	Studiengruppe			
	1	2	1&2	
RVSP [mmHg]	R -0,217 p 0,249	R -0,037 p 0,867	R -0,149 p 0,286	
TAPSE [mm]	R -0,157 p 0,415	R -0,024 p 0,916	R -0,082 p 0,573	ADMA
Tei-Index	R 0,147 p 0,485	R 0,182 p 0,471	R 0,143 p 0,359	
RVSP [mmHg]	R -0,042 p 0,826	R -0,332 p 0,121	R -0,198 p 0,155	
TAPSE [mm]	R -0,275 p 0,149	R 0,292 p 0,199	R -0,022 p 0,879	SDMA
Tei-Index	R 0,248 p 0,231	R 0,267 p 0,285	R 0,283 p 0,066	
RVSP [mmHg]	R -0,368 p 0,049 *	R -0,07 p 0,751	R -0,266 p 0,057	
TAPSE [mm]	R 0,092 p 0,641	R -0,317 p 0,161	R -0,091 p 0,536	L-Arginin
Tei-Index	R -0,35 p 0,094	R -0,087 p 0,731	R -0,234 p 0,136	
RVSP [mmHg]	R -0,28 p 0,134	R 0,162 p 0,461	R -0,059 p 0,675	
TAPSE [mm]	R -0,005 p 0,981	R -0,11 p 0,635	R -0,066 p 0,647	Homo-arginin
Tei-Index	R -0,37 p 0,068	R -0,179 p 0,478	R -0,314 p 0,04 *	

R= Spearman-Korrelationskoeffizient, p= p-Wert, * = p-Wert $\leq 0,05$, RVSP = Right ventricular systolic pressure, TAPSE = Tricuspid annular plane systolic excursion, ADMA= Asymmetrisches Dimethylarginin, SDMA= Symmetrisches Dimethylarginin

3.4.2.7 Biomarker und hämodynamische Parameter

Weder für ADMA, SDMA noch für Homoarginin gab es signifikante Korrelationen mit erhobenen Daten aus der Rechtsherzkatheteruntersuchung.

Für L-Arginin ergaben sich positive signifikante Korrelationen in Studiengruppe 1 mit dem Herzindex ($R=0,486$; $p\text{-Wert}=0,014$) und der gemischtvenösen Sauerstoffsättigung ($R=0,455$; $p\text{-Wert}=0,02$) sowie eine negative signifikante Korrelation mit dem Pulmonalvaskulären Widerstand ($R=-0,433$; $p\text{-Wert}=0,021$).

3.4.3 Biomarker im Verlauf

3.4.3.1 Überblick der Werte im Verlauf

Für die Verlaufsanalysen der Plasmakonzentrationen wurden nur die Daten therapienativer Patienten einbezogen, die mindestens zur ersten Studienvisite und nach einem Jahr anwesend waren. Lediglich von einem Patienten lagen keine Biomarker-Ergebnisse vom Messzeitpunkt nach sechs Monaten vor. Bis zum dritten Messzeitpunkt stiegen die ADMA- und SDMA-Konzentrationen an, danach sanken sie. Die L-Arginin- und Homoarginin-Konzentrationen erreichten am dritten bzw. zweiten Follow-Up maximale Werte, ein Trend zum Fallen der Konzentrationen ließ sich anschließend beobachten.

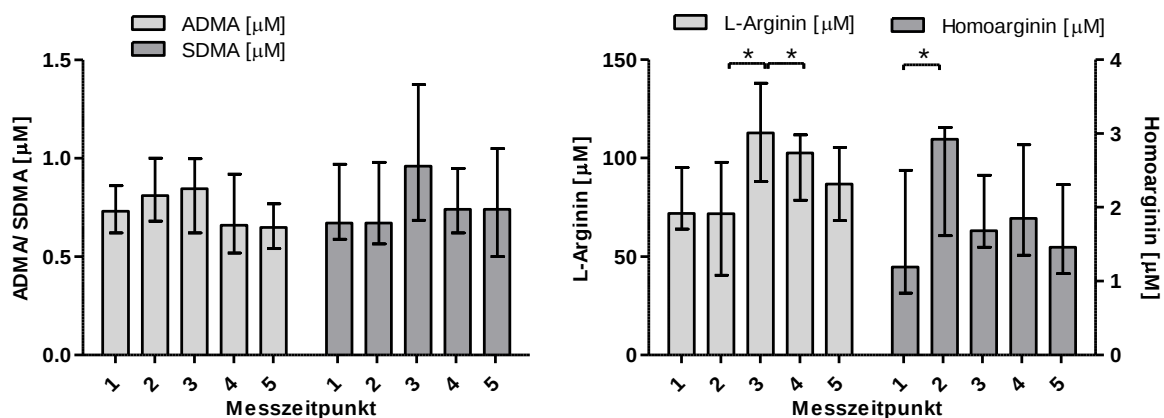


Abb. 31: Balkendiagramme zur Darstellung der Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin im Verlauf (Studiengruppe 2, Daten aller mindestens zur ersten und letzten Studienvisite anwesenden Patienten). Angabe der Mediane und IQR. *= signifikanter Konzentrationsunterschied; $p \leq 0,05$.

3.4.3.2 Biomarker und Clinical Worsening und Überleben

Die Analysen zum Überleben und zur klinischen Verschlechterung in Abhängigkeit der Plasmakonzentrationen wurden analog zu Abschnitt 3.3.3.2 durchgeführt. Tabelle 19 stellt die Häufigkeiten einer eingetretenen klinischen Verschlechterung und die Anzahl der Monate bis zum Eintreten der Verschlechterung in der Studiengruppe 2 sowie die Überlebensdaten im gesamten Patientenkollektiv dar.

Tabelle 19: Darstellung der Monate vom Studieneinschlussdatum bis zum Eintreten einer klinischen Verschlechterung bzw. des Todes

CW		Tod	
Studiengruppe 2	12 / 48%	7/ 12%	Studiengruppen 1&2
TtCW (Monate)			Tod (Monate)
ADMA <0,65	4 (1-4)	50 (50)	ADMA <0,65
ADMA ≥0,65	4 (1-19)	15,5 (2-35)	ADMA ≥0,65
SDMA <0,66	4 (1-19)	30 (10-50)	SDMA <0,66
SDMA ≥0,66	4 (1-17)	16 (2-35)	SDMA ≥0,66
L-Arginin <81	2,5 (1-17)	24,5 (10-50)	L-Arginin <81
L-Arginin ≥81	4 (2-19)	15 (2-35)	L-Arginin ≥81
Homoarginin <1,64	3,5 (1-16)	15 (2-33)	Homoarginin <1,64
Homoarginin ≥1,64	10,5 (1-19)	42,5 (35-50)	Homoarginin ≥1,64

Angabe der absoluten Anzahl / % der Gesamtstichprobe bzw. des Medians (Minimum – Maximum); ADMA= Asymmetrisches Dimethylarginin, SDMA= Symmetrisches Dimethylarginin, TtCW= Time to Clinical Worsening

Patienten mit supramedianen ADMA-Konzentrationen hatten ein signifikant schlechteres Überleben als Patienten mit inframedianen Werten (Kaplan-Meier-Kurve s. Abb. 32). Die medianen Überlebenszeiten in Monaten verhielten sich entsprechend (Tabelle 19). Hinsichtlich der TtCW waren hohe ADMA-Konzentrationen im Kaplan-Meier-Diagramm ebenfalls mit einer geringeren ereignisfreien Zeit assoziiert (nicht abgebildet), jedoch wurde im Logrank-Test kein signifikanter Unterschied ermittelt. Die absoluten medianen Werte unterschieden sich nicht.

Für hohe SDMA-Werte konnte anhand der Kaplan-Meier-Analysen eine geringere Zeitspanne bis zum Eintreten sowohl einer klinischen Verschlechterung (Abb. 33) als auch des Todes ermittelt werden (nicht abgebildet). Im Logrank-Test war dieser Unterschied nicht signifikant. Auch die medianen Werte (Tabelle 19) deuteten auf längere Überlebenszeiten bei inframedianen SDMA-Konzentrationen hin.

Ergebnisse

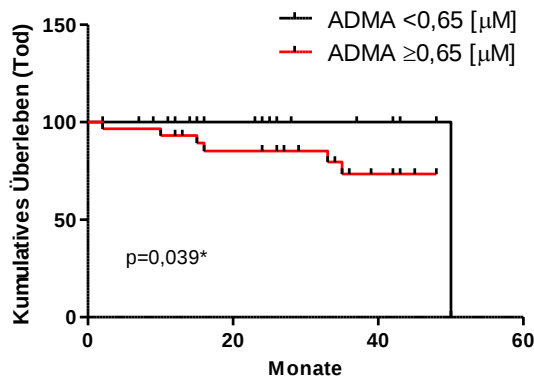


Abb. 32: Überlebenszeitkurve der Studiengruppen 1&2 getrennt nach der medianen ADMA- Konzentration. $p = p$ -Wert ermittelt im Logrank-Test.

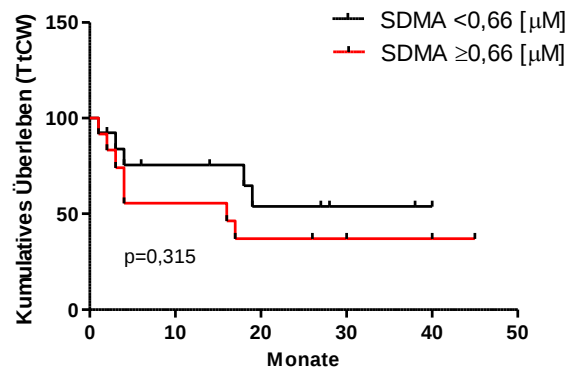


Abb. 33: Überlebenszeitkurven bis zum Eintreten des Clinical Worsening der Studiengruppe 2 getrennt nach der medianen SDMA- Konzentration. $p = p$ -Wert ermittelt im Logrank-Test.

In der Kaplan-Meier-Analyse des L-Arginin überlagerten sich die Überlebenskurven stark (nicht abgebildet); die medianen Überlebenszeiten waren länger bei niedrigen L-Arginin-Konzentrationen (Tabelle 19). Die Kurven hinsichtlich der TtCW (nicht abgebildet) stellen ein nicht signifikantes, längeres Überleben bei niedrigeren Werten dar, dieser Trend wurde auch in den medianen Zeitspannen ersichtlich.

Supramediane Homoarginin-Konzentrationen waren assoziiert mit längeren medianen Überlebenszeiten bzw. ereignisfreien Intervallen (Tabelle 19). Im Mann-Whitney-U-Test wurde kein signifikanter Zusammenhang aufgezeigt. Abb. 34 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse. Auch hier war ein positiver Zusammenhang zwischen Homoarginin-Werten und Überlebenszeit ersichtlich. In der Analyse der TtCW waren die Kurven leicht überlagert (nicht abgebildet), es stellte sich jedoch ein Trend zum längeren Überleben mit hohen Homoarginin-Werten dar.

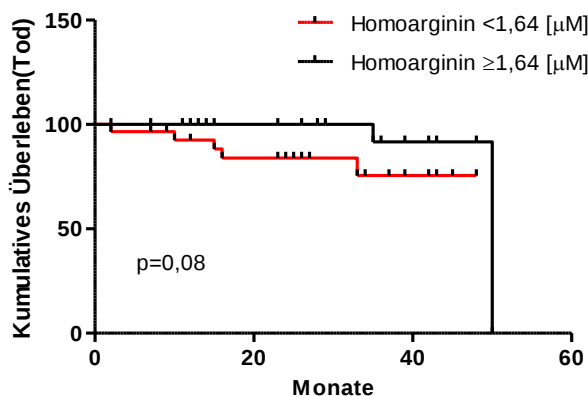


Abb. 34: Überlebenszeitkurve der Studiengruppen 1&2 getrennt nach der medianen Homoarginin-Konzentration. $p = p$ -Wert ermittelt im Logrank-Test.

Mit dem Exakten Test nach Fisher konnte kein Zusammenhang zwischen hohen bzw. niedrigen Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin und aufgetretener bzw. keiner klinischen Verschlechterung (Tod bzw. kein Tod) gefunden werden.

3.5 REACTIVE HYPEREMIA INDEX UND BIOMARKER

Die Korrelationsanalyse der Baseline-Werte ergab signifikant negative Korrelationen für L-Arginin mit den RHI-Werten (Abb. 35) in Studiengruppe 1. Für SDMA und ADMA wurde ein signifikant negativer Zusammenhang mit den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt in Studiengruppe 2 ermittelt (s. Abb. 35). Für die Homoarginin-Konzentrationen und die RHI-Werte war kein signifikanter Zusammenhang ersichtlich.

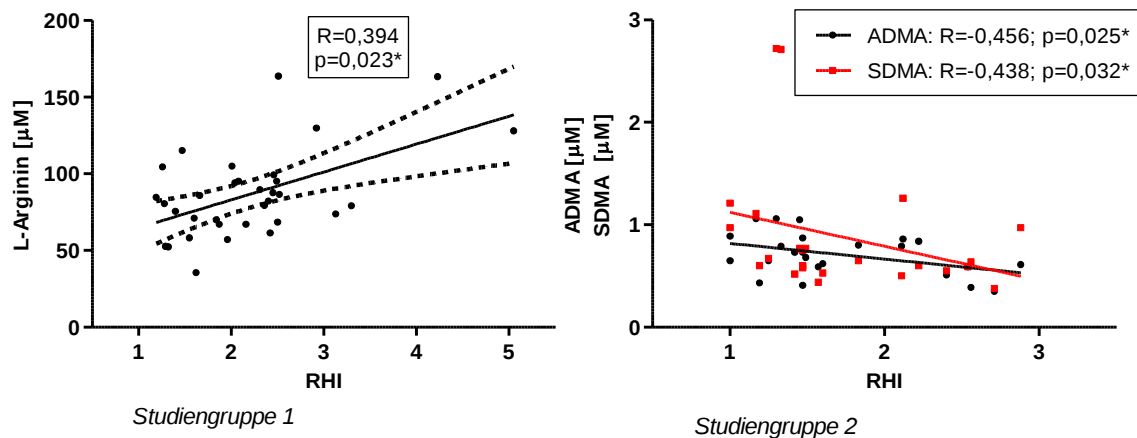


Abb. 35: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationsanalyse nach Spearman zwischen den L-Arginin- bzw. den ADMA- und SDMA-Konzentrationen und den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt für die Studiengruppe 1 bzw. 2. Darstellung der Korrelationsgeraden mit 95%-Konfidenzintervall. R = Spearman-Korrelationskoeffizient, p = p -Wert.

Mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Exaktem Test nach Fisher konnten keine Zusammenhänge zwischen hohen bzw. niedrigen Plasmakonzentrationen der Biomarker und supra- bzw. inframedianen RHI-Werten ermittelt werden (p -Werte $> 0,05$). Der Chi-Quadrat-Test ermittelte einen signifikanten Zusammenhang zwischen supra- bzw. inframedianer SDMA-Konzentration und RHI-Werten ober- bzw. unterhalb des Cutoff-Wertes 1,67 (p -Wert=0,026 in Studiengruppe 1).

Mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten signifikant höhere RHI-Werte bei Patienten mit niedrigeren ADMA- (in Studiengruppe 2, $p=0,011$: s. Abb. 36; im gesamten Patientenkollektiv, $p=0,031$; im gesamten Studienkollektiv, $p=0,026$) und SDMA- Konzentrationen (in Studiengruppe 2, $p=0,024$: s. Abb. 36) ermittelt werden.

Ergebnisse

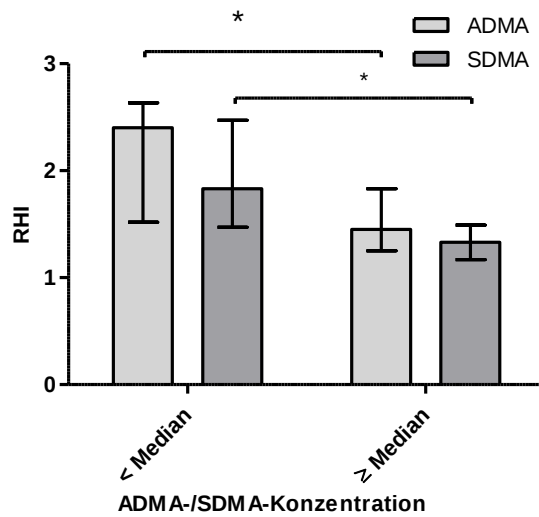


Abb. 36: Balkendiagramm zur Darstellung des RHI nach infra- bzw. supramedianen ADMA- und SDMA-Werten. Abgebildete Ergebnisse der Studiengruppe 2. Angabe der Mediane und IQR (*= p -Wert $\leq 0,05$).

3.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse wurden durch eine hohe Drop-Out-Rate im Ein-Jahresverlauf beeinflusst.

RHI: Die Baseline-Werte therapienaiver Patienten waren signifikant niedriger als von therapierten Patienten und gesunden Probanden. Nach Ausschluss von gesunden Probanden mit RHI-Werten $<1,67$ lag der mediane RHI-Wert der Kontrollgruppe über dem der therapierten Patienten.

Im Vergleich des RHI mit etablierten PH-Prognoseparametern ergaben sich signifikante positive bzw. negative Korrelationen mit der 6-Minuten-Gehstrecke bzw. mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration. Im Trend waren niedrige RHI-Werte mit hohen NYHA-Stadien assoziiert. Mit der Hämodynamik standen die RHI-Werte in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang.

Die Kaplan-Meier-Diagramme zeigten bei hohen RHI-Werten deutliche Trends zu längerem Überleben und längerer Zeitspanne bis zur klinischen Verschlechterung.

Biomarker: Die Baseline-Werte von *SDMA* bzw. *L-Arginin* und *Homoarginin* waren in der gesunden Studiengruppe 3 signifikant niedriger bzw. höher als in den Patientengruppen 1 und 2. Für *ADMA* wurde ein Trend zu niedrigeren Plasmakonzentrationen in der Studiengruppe 3 gegenüber den Patientengruppen ermittelt.

Parameter der Nierenfunktion waren signifikant assoziiert mit den Plasmakonzentrationen von *ADMA*, *SDMA* und *Homoarginin*.

Im Vergleich mit PH-Prognoseparametern gab es eine signifikante Korrelation aller Biomarker mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration (für *SDMA* und *ADMA* in positiver, für *L-Arginin* und *Homoarginin* in negativer Richtung). Für die NYHA-Stadien III und IV wurde ein Zusammenhang mit hohen *ADMA*- und *SDMA*-Plasmakonzentrationen (für *SDMA* signifikant) bzw. niedrigen *L-Arginin*- und *Homoarginin*-Plasmakonzentrationen (für *L-Arginin* nahezu signifikant) ermittelt. Die 6-Minuten-Gehstrecke war signifikant korreliert mit *ADMA*- und *SDMA*-Plasmakonzentrationen (negativ). *L-Arginin* wies zahlreiche statistisch signifikante Korrelationen mit hämodynamischen Parametern (RVSP, CI, SvO₂, PVR) sowie mit der Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität und dem kapillären Kohlendioxid-Partialdruck auf. *Homoarginin* war signifikant korreliert mit dem Tei-Index (negativ).

Für hohe *ADMA*- und *SDMA*-Plasmakonzentrationen ergaben sich im Kaplan-Meier-Diagramm kürzere Überlebenszeiten (für *ADMA* statistisch signifikant). Niedrige *Homoarginin*-Plasmakonzentrationen waren im Trend assoziiert mit kürzerem Überleben.

RHI und Biomarker: Der RHI korrelierte signifikant positiv mit *L-Arginin* und signifikant negativ mit *ADMA* bzw. *SDMA*.

4 DISKUSSION

4.1 EINORDNUNG DER THEMATIK

Die Pulmonal arterielle Hypertonie ist eine seltene und mit einer schlechten Prognose behaftete Erkrankung. Obwohl in den letzten Jahren viele Fortschritte im therapeutischen Bereich erzielt wurden, bleiben erhebliche Einschränkungen der Lebenserwartung und Lebensqualität (Rosenkranz 2014). Bisher gibt es nur wenige (nicht-invasive) Verfahren zur Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und Therapie. Daher ist es von unbedingter Relevanz, weitere Verlaufsparameter und potentielle diagnostische Angriffspunkte zu finden (Khan und Rich 2015). Von besonderer Wichtigkeit in diesem Zusammenhang ist auch ein besseres pathophysiologisches Verständnis. Eine große Rolle spielen hierbei Umbauprozesse und Dysfunktionen im pulmonalen Endothel (Loscalzo 1992).

Ziel dieser Studie war es daher, die Endothelfunktion (als möglichen Parameter des Erkrankungsschweregrades und des Therapieansprechens PAH-spezifischer Medikation) von PAH- und CTEPH-Patienten mit dem EndoPat2000-System und einigen Biomarkern zu untersuchen. Dazu wurden die Baseline-Werte der Patienten mit einer Kontrollgruppe verglichen und die Daten durch Vergleiche mit bereits etablierten Prognoseparametern der Pulmonalen Hypertonie evaluiert. Zusätzlich wurde eine Verlaufsbeurteilung der Parameter unter einer PAH-spezifischen Medikation vorgenommen. Die Patienten wurden am Studieneinschlusstermin in eine bereits therapierte und eine therapienaive Gruppe eingeteilt und über ein Jahr lang in regelmäßigen Studienvisiten beobachtet.

In einer Studie von Peled und Mitarbeitern (Peled et al. 2008) diente das EndoPat2000-System zur nicht-invasiven Erfassung der Endothelfunktion. Sie stellten als erste fest, dass die bei PAH-Patienten gestörte (pulmonale) Endothelfunktion mit dem EndoPat2000-System auch peripher erfasst werden kann. Entwickelt wurde dieses Verfahren ursprünglich zur Detektion koronarvaskulärer Veränderungen. Dazu gibt es bereits einige Studien, welche die Reliabilität der EndoPat2000-Untersuchung und deren Korrelation mit Herz-Kreislauferkrankungen belegen (Xu et al. 2014).

Für die Validierung neuer Biomarker für die Pulmonal arterielle Hypertonie wurden die vier Moleküle ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin untersucht. L-Arginin ist das Vorläufermolekül des NO (Palmer et al. 1988). Die endogenen L-Arginin-Derivate ADMA und SDMA hemmen die L-Arginin-abhängige NO-Synthese (Böger 2006, Hov et al. 2015, Lüneburg et al. 2012, Vallance et al. 1992). In den letzten Jahren hat sich die

endogene und non-proteinogene Aminosäure Homoarginin (Atzler et al. 2015) als vielversprechender Biomarker für das kardiovaskuläre Outcome herausgestellt (März et al. 2010), welche ebenso wie L-Arginin als Substrat für die NO-Synthase dienen kann (Moali et al. 1998). Die Biosynthese und biologischen Aktivitäten von Homoarginin im Menschen sind bisher nur unvollständig erforscht (Kayacelebi et al. 2015b).

Biomarker-Analysen stellen eine einfache und schnelle Methode dar, den Krankheitsverlauf zu überprüfen, jedoch müssen diese bestimmte Kriterien erfüllen. Abgesehen von wirtschaftlichen Aspekten, welche in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden, sollte ein Biomarker molekulare Veränderungen in Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs darstellen (Poste 2011) sowie das Patientenüberleben und Therapieansprechen reflektieren (Pezzuto et al. 2015). Diese Kriterien wurden in den statistischen Auswertungen berücksichtigt.

4.2 DISKUSSION DER STUDIENERGEBNISSE

Die mittels dieser Studie zu überprüfenden Hypothesen waren:

1. Die periphere Endothelfunktion bei PAH-/CTEPH-Patienten ist schlechter als bei gesunden Kontrollprobanden. Dazu wurden Baseline-Werte der Studiengruppen verglichen und die Endothelfunktion mit Prognoseparametern der Pulmonalen Hypertonie korreliert.
2. Die medikamentöse PAH-spezifische Therapie verbessert die Endothelfunktion. Dazu wurde die Endothelfunktion von therapienaiven Patienten über ein Jahr analysiert.

Zur Bewertung der Endothelfunktion wurden der RHI (Ergebnis der EndoPat2000-Messung) sowie die Biomarker ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin untersucht.

4.2.1 These 1: Die periphere Endothelfunktion bei PAH-/CTEPH-Patienten ist schlechter als bei gesunden Kontrollprobanden

4.2.1.1 RHI als Parameter der Endothelfunktion

4.2.1.1.1 Baseline-Werte

Therapienaive Patienten hatten signifikant niedrigere Baseline-RHI-Werte als therapierte Patienten und Kontrollprobanden. Therapierte Patienten hatten ähnliche Werte wie Gesunde; nach Ausschluss von Kontrollprobanden mit RHI-Werten $<1,67$ war der mediane RHI leicht höher als der der therapierten Patienten. Yinon et al. und Peled et al. verwendeten diesen Schwellenwert für den RHI, welcher in einer Risikopopulation für ischämische Herzerkrankungen bestimmt wurde (Peled et al. 2008, Yinon et al. 2006). Werte unterhalb von 1,67 wiesen auf eine endotheliale Dysfunktion hin. In unserer Studie wurde der mediane RHI-Wert der Patientengruppe als Grenzwert verwendet, da so vergleichbar große Gruppen mit statistischer Aussagefähigkeit entstanden sind. Zudem gibt es für die PAH keinen definierten Grenzwert der EndoPat2000-Untersuchung. Alle statistischen Untersuchungen wurden zum Vergleich mit beiden Grenzwerten durchgeführt, wie in Kapitel 3 ersichtlich.

Diese Ergebnisse bestätigen die These, dass bei (therapienaiven) PAH- und CTEPH-Patienten eine systemische endotheliale Dysfunktion vorliegt.

Die Resultate unserer Studie werden gestützt durch die Untersuchung von Peled und Mitarbeitern (Peled et al. 2008). Sie fanden ebenfalls schlechtere RHI-Werte bei den untersuchten Patienten (IPAH, CTEPH, Sklerodermie-assoziierte PAH) im Vergleich zu Gesunden. Jedoch lag in unserer Studie der mediane RHI-Wert der therapierten Patienten nicht signifikant unter dem Wert der Kontrollgruppe. Formal lag bei diesen prävalenten Patienten keine endotheliale Dysfunktion vor. In der Kontrollgruppe gab es Probanden mit einer formalen endothelialen Dysfunktion. Dafür sollen im Folgenden Erklärungsansätze diskutiert werden.

Die Ergebnisse der EndoPat2000-Untersuchung werden von mehreren Faktoren beeinflusst. Dazu gehören kardiovaskuläre Risikofaktoren (Arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus) (Hamburg et al. 2011) und die Einnahme von endothelmodulierenden Medikamenten (Beta-Blocker, ACE-Hemmer, Insulin; (Bruyndonckx et al. 2013); Lipidsenker, antihypertensive Medikamente (Hamburg et al. 2011)). Diese Faktoren konnten für unsere Studie in der gesunden Kontrollgruppe eliminiert werden, während die PH-Patienten nach verschiedenen Therapieschemata weiterbehandelt wurden. Wechselnde Therapieschemata der PAH-spezifischen Medikamente können die Endothelfunktion beeinflussen (Peled et al. 2009).

Schnabel et al. postulierten, dass die Ergebnisse der EndoPat2000-Untersuchung mit dem Nüchtern-Blutglucosewert korrelieren (Schnabel et al. 2011). Unsere Studienteilnehmer wurden angewiesen, eine Nahrungskarenz von zwölf Stunden einzuhalten. Es erfolgte jedoch keine Blutkontrolle der Glucose-Werte.

Die Kontrollprobanden dieser Studie waren verglichen mit der Patientengruppe durchschnittlich zehn Jahre jünger ($p\text{-Wert} \leq 0,05$), wiesen ein signifikant geringeres Rauchverhalten sowie niedrigere BMI-Werte auf. Nach Studienlage wäre zu erwarten gewesen, dass diese Unterschiede zu besseren RHI-Werten in der Kontrollgruppe führen.

So begünstigen laut Hamburg et al. intensives Rauchverhalten und hohe BMI-Werte die Endotheldysfunktion (Hamburg et al. 2008, Hamburg et al. 2011) und rufen schlechtere RHI-Werte hervor. In unserer Studie wurde jedoch keine Korrelation des Rauchverhaltens mit dem RHI ermittelt.

In der Literatur findet sich Evidenz für einen positiven Effekt jüngerer Alters auf die Endothelfunktion. Das Alter ist invers korreliert mit der flussmedierten Vasodilatation (FMD) (Hamburg et al. 2011). Die FMD ist eine Ultraschall-basierte Methode und geeignet zur Erfassung der Endothelfunktion (Anderson et al. 1995) und sie korreliert in ähnlicher

Weise wie die EndoPat2000-Messung mit kardiovaskulären Ereignissen und dem Überleben (Xu et al. 2014). Zudem ist die NO-Bioverfügbarkeit invers korreliert mit dem Alter (Ungvari et al. 2010) und das EndoPat2000-System misst die reaktive Hyperämie, welche durch NO und durch andere Mediatoren vermittelt wird (Xu et al. 2014).

Andererseits fanden Hamburg et al. gegenteilige Ergebnisse, d.h. schlechtere RHI-Werte bei jüngerem Alter (Hamburg et al. 2008). Dies führten sie auf die enge Altersspanne in deren Studie zurück oder auf alterungsbedingte Prozesse in den Gefäßen der Finger, wodurch die reaktive Hyperämie in diesen Gefäßen im Alter vorhanden bleibe (Hamburg et al. 2011). Auch sei denkbar, dass in den Händen existierende arteriovenöse Anastomosen das EndoPat2000-System daran hinderten, die altersbedingten Veränderungen zu registrieren (Hamburg et al. 2011). Der signifikante Altersunterschied zwischen unserer Kontroll- und Patientengruppe kann somit nicht sicher als einseitig verzerrender Faktor gewertet werden.

Zu diskutieren sind auch Überlebens-Phänomene. Prävalente (Studiengruppe 1) Patienten könnten einen Überlebensvorteil besitzen, da sie länger mit der Erkrankung leben und einige Patienten (ohne Überlebensvorteil) bereits verstorben sein können und die Gruppe somit eine besondere Auswahl darstellt. Dieser Ansatz wird von den RHI-Werten und von den vorteilhafteren Werten im 6-Minuten-Gehtest, der Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität sowie der NT-proBNP-Konzentrationsanalyse der prävalenten gegenüber den inzidenten Patienten (Tabelle 8; nicht signifikant) gestützt.

Gegen diese These sprechen jedoch die hämodynamischen Parameter in Tabelle 4. Hier haben therapienaive Patienten vorteilhaftere Werte als therapierte. Auch die PAH-spezifische Therapie der prävalenten Patienten könnte unter Annahme eines Endothelfunktion-verbessernden Effekts der Medikation die besseren RHI-Werte gegenüber der therapienaiven Patientengruppe erklären.

Nicht zuletzt ist zu erwähnen, dass acht gesunde Probanden eine renale Insuffizienz aufwiesen (s. Kapitel 3.2.1.5). Bei neun Probanden lag zudem formal eine endotheliale Dysfunktion vor ($RHI < 1,67$). Auch diese Faktoren könnten die Messergebnisse des EndoPat2000-Systems beeinflusst haben.

Letztlich kann festgestellt werden, dass die Patienten- und die Kontrollgruppe aufgrund der Vielzahl an Einflussfaktoren inhomogene Gruppen für die Endothelfunktionsmessung waren. Nach Ausschluss von Kontrollprobanden mit dysfunktionalem RHI-Wert ($<1,67$) lag der mediane RHI-Wert der Kontrollgruppe jedoch über dem der gesamten Patientengruppe.

Neben der Studie von Peled et al. gibt es in der Literatur weitere Untersuchungen, die unsere These, dass bei der PH eine systemische endotheliale Dysfunktion vorliegt, belegen. Hughes et al. (Hughes et al. 2005), Wolff et al. (Wolff et al. 2007) und Gabrielli et al. (Gabrielli et al. 2011), deren Arbeitsgruppen die FMD bei IPAH-Patienten untersuchten, haben deutlich niedrigere Dilatationsraten (als Reaktion auf eine Okklusion der Arteria brachialis) bei den Patienten gemessen als bei gesunden Kontrollprobanden. Bull et al. beobachteten eine vermehrte Anzahl an zirkulierenden Endothelzellen (CECs) bei Patienten mit Primärer und Sekundärer PH (Bull et al. 2003). Die Bestimmung der CECs sei ein direkter Marker von endothelialen Defekten (Budhiraja et al. 2007). In der Gutenberg-Studie, in welcher 5000 gesunde Probanden untersucht wurden, korrelierten die Ergebnisse der EndoPat2000-Untersuchungen mit dem MR-proADM, CT-pro-Endothelin und NT-proANP, welche Biomarker für die vaskuläre Funktion seien (Schnabel et al. 2012).

Fazit

Unsere Resultate bestätigen, dass bei (therapienaiven) PAH- und CTEPH-Patienten eine systemische endotheliale Dysfunktion vorliegt. Zahlreiche Studien (s.o.) stützen diese These. Die Ergebnisse der Messungen mit dem EndoPat2000-System werden allerdings von diversen Faktoren (Rauchen, Medikamente, Vorerkrankungen) beeinflusst und die Patienten- und Kontrollgruppe waren diesbezüglich inhomogen. Dass dennoch signifikante RHI-Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden ermittelt wurden, weist jedoch auf die Wertigkeit des Systems hin.

4.2.1.1.2 Korrelation mit Prognoseparametern

Um den diagnostischen Wert der Endothelfunktionsmessung beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse der EndoPat2000-Messung mit bereits etablierten PH-Prognosemarkern (NYHA-Klassifikation, 6-Minuten-Gehtest, Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, Kohlendioxid-Partialdruck, NT-proBNP-Konzentration, Parameter der Echokardiografie und der Rechtsherzkatheteruntersuchung) verglichen und korreliert.

NYHA-Stadium, NT-proBNP-Konzentration und 6-Minuten-Gehtest

Es zeigte sich eine deutliche Tendenz zu höheren RHI-Werten in niedrigen NYHA-Stadien, eine signifikant positive Korrelation mit der Gehstrecke sowie ein signifikant inverser Zusammenhang mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration.

Die Arbeitsgruppe um Peled ermittelte ebenfalls eine negative Korrelation des RHI mit dem NYHA-Stadium sowie eine positive Korrelation mit der Gehstrecke (Peled et al. 2008).

Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) waren niedrige FMD-Werte, also eine eingeschränkte Endothelfunktion, ebenfalls mit hohen NYHA-Stadien (Ciccone et al. 2011, Meyer et al. 2005) sowie mit hohen NT-proBNP-Konzentrationen und einer geringen Gehstrecke assoziiert (Ciccone et al. 2011). Pauriah et al. untersuchten eine Population aus Gesunden und Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren. Hier wurde das NT-proBNP als unabhängiger Prädiktor für die Endothelfunktion (=Acetylcholin-abhängige Vasodilatation) ermittelt (Pauriah et al. 2012). Demgegenüber steht eine Untersuchungsreihe der Normalbevölkerung, in welcher kein Zusammenhang der Endo-Pat2000-Messwerte mit der NT-proBNP-Konzentration bestand (Schnabel et al. 2012).

In einer Studie mit PH-Patienten in Assoziation mit angeborenen systemisch-pulmonalen Shunts korrelierte die NT-proBNP-Plasmakonzentration mit der Plasmakonzentration des von Willebrandt Faktor-Antigens (Brun et al. 2009), welches in erhöhter Konzentration durch dysfunktionale Endothelzellen von PAH-Patienten gebildet und freigesetzt wird (Cracowski und Leuchte 2012, Veyradier et al. 2000). Das von Willebrandt Faktor-Antigen ist daher ein Marker der endothelialen Dysfunktion bei PAH (Giannakoulas et al. 2014).

Die aufgeführten Studien weisen auf den Stellenwert der NT-proBNP-Bestimmung im Krankheitsverlauf bei der PH hin und sie stellen einen Zusammenhang von NT-proBNP-Konzentration und Endothelfunktion fest (Ausnahme: Schnabel et al. 2012, s.o.). Auch der ermittelte Zusammenhang von RHI und NYHA-Stadium sowie 6-Minuten-Gehstrecke wurde bestätigt.

Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, Kohlendioxid-Partialdruck, Echokardiografie-Parameter und Parameter der Rechtsherzkatheteruntersuchung

In unseren Analysen der Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, des Kohlendioxid-Partialdrucks sowie der Echokardiografieparameter und invasiven hämodynamischen Parameter konnte keine Korrelation mit dem RHI ermittelt werden.

Wolff et al. konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Pulmonaldrücken und der Endothelfunktion (gemessen als FMD) feststellen (Wolff et al. 2007).

Die folgenden Untersuchungen jedoch stellten z.T. Korrelationen fest. Peled et al. fanden einen inversen Zusammenhang zwischen RHI-Werten und den systolischen pulmonalen Drücken (Peled et al. 2008). Bei Patienten mit Herzinsuffizienz und PH fanden Farrero et al. eine inverse Korrelation zwischen FMD und PVR (Farrero et al. 2014).

Aihara et al. untersuchten Patienten mit interstitieller Pneumonitis/Fibrose und zeigten, dass der RHI mit der Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität und der Gehstrecke korrelierte, aber nicht mit dem Kohlendioxid-Partialdruck (Aihara et al. 2013). Bull et al. und Blann et al. haben herausgefunden, dass erhöhte Mengen an zirkulierenden Endothelzellen bei PH-Patienten mit den Pulmonaldrücken korrelieren (Blann et al. 2005, Bull et al. 2003).

Fazit

Die Ergebnisse hinsichtlich des Zusammenhangs von RHI und Hämodynamik sind inhomogen. In dieser Arbeit wurden keine Korrelationen erfasst; die bisherige Studienlage ist nicht eindeutig. Die Studienergebnisse von Peled et al., Farrero et al., Bull et al. und Blann et al. deuten jedoch darauf hin, dass die pulmonalen Druckverhältnisse mit dem Ausmaß der Endotheldysfunktion korrelieren. Auch die in unserer Studie ermittelte signifikante Korrelation des RHI mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration (als Parameter der kardialen Funktion) unterstützt die Annahme eines Zusammenhangs mit der Hämodynamik.

Die NYHA-Funktionsklasse, die NT-proBNP-Plasmakonzentration und die Gehstrecke korrelierten sowohl in dieser als auch in o.g. Studien mit dem RHI in erwarteter Weise. Das Ausbleiben einer statistisch signifikanten Korrelation bei grafisch deutlich ersichtlichem Zusammenhang einiger Prognoseparameter (NYHA- Stadium, 6-Minuten-Gehstrecke) mit dem RHI könnte auf die geringe Patientenzahl zurückzuführen sein. Die periphere endotheliale Dysfunktion korreliert also mit Parametern der Schwere der Erkrankung. Auch Loscalzo (Loscalzo 1992) stellte fest, dass die endotheliale Dysfunktion bei PPH-Patienten die Wahrscheinlichkeit für ein Krankheitsfortschreiten erhöht.

4.2.1.1.3 Assoziation mit Überleben/TtCW

Hohe RHI-Werte waren im Trend assoziiert mit einer längeren Überlebenszeit. Die Zeit bis zum Eintreten einer klinischen Verschlechterung war im Kaplan-Meier-Diagramm tendenziell länger bei hohen RHI-Werten. Für beide Beobachtungen konnten keine statistisch signifikanten Testergebnisse erzielt werden.

Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, in welcher der RHI und das Überleben bei PAH-Patienten untersucht wurden. Es war ein Trend zur kürzeren Überlebenszeit bzw. Zeit bis zur klinischen Verschlechterung bei endothelialer Dysfunktion zu beobachten. Es wurden jedoch verhältnismäßig wenige Todesfälle registriert, daher sind die Überlebenszeitanalysen kritisch zu bewerten. Da sich jedoch ein Trend zum Endothelfunktion-abhängigen Überleben erkennen ließ, ist es sinnvoll, weitere Analysen mit einem größeren Patientenkollektiv durchzuführen.

Signifikante Korrelationen des RHI-Wertes wurden mit der im 6-Minuten-Gehtest erreichten Gehstrecke erzielt sowie für das NT-proBNP. Die Gehstrecke wurde von Sitbon et al. als prognostisch für das Überleben bei PPH-Patienten bewertet (Sitbon et al. 2002), ebenso wie das NT-proBNP (Nagaya et al. 2000). Hohe RHI-Werte waren in Studien mit unterschiedlichen Patientenkollektiven und Gesunden unabhängige Prädiktoren für Überleben und kardiovaskuläre Ereignisse (Matsuzawa et al. 2013, Xu et al. 2014). Auch eine Studie von Lerman et al. ergab, dass die endotheliale Dysfunktion stark assoziiert ist mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität (Lerman und Zeiher 2005). Weiterhin sagte die FMD kardiovaskuläre Events bei Gesunden vorher (Shechter et al. 2014). Diese Ergebnisse bestätigen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Outcome und RHI-Werten.

Fazit

Unsere Ergebnisse sprechen für einen Zusammenhang zwischen der mittels EndoPat2000-System erfassten Endothelfunktion und dem Überleben bzw. der TtCW. Dies und die Korrelation mit prognostischen Parametern stützt die These, dass der RHI prädiktiv für das Outcome von PAH-Patienten ist, auch wenn die Patientengruppe klein war und im Untersuchungszeitraum wenige Ereignisse (Tod, Clinical Worsening) eingetreten sind.

4.2.1.1.4 Zusammenfassung

Der RHI war bei therapienaiven PAH-Patienten gegenüber gesunden Probanden signifikant niedriger. Dies bestätigt die Annahme, dass bei PAH-Patienten eine endotheliale Dysfunktion vorliegt.

Es zeigten sich deutliche Zusammenhänge des RHI mit PH-Prognoseparametern wie der NT-proBNP-Plasmakonzentration, der 6-Minuten-Gehstrecke und dem NYHA-Stadium. Das EndoPat2000-System hat daher Potential zur Schweregradeinteilung der PAH-Erkrankung. Zudem kann man eine Assoziation des RHI mit dem Outcome der Patienten annehmen. Die Ergebnisse wurden in einem kleinen Patientenkollektiv erhoben, sodass häufig keine statistisch signifikanten Ergebnisse, jedoch deutliche Trends zu beobachten waren.

4.2.1.2 Biomarker als Parameter der Endothelfunktion

4.2.1.2.1 Baseline-Werte

Zum Baseline-Zeitpunkt wurden für SDMA signifikant niedrigere bzw. für L-Arginin und Homoarginin signifikant höhere Plasmakonzentrationen bei Gesunden gegenüber den therapienaiven und therapierten Patienten gemessen. Für ADMA wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen ermittelt. Diese Ergebnisse wurden – außer für ADMA – in der Literatur weitestgehend bestätigt. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Biomarker diskutiert. Der Schwerpunkt liegt dabei auf ADMA.

ADMA

ADMA inhibiert die NO-Synthase (Vallance et al. 1992), wodurch eine endotheliale Dysfunktion und kardiovaskuläre Ereignisse bedingt werden (Sibal et al. 2010, Stühlinger et al. 2003).

Hohe ADMA- Werte könnten durch eine Hypoxie-bedingte geringere DDAH-Aktivität (Stühlinger et al. 2003) zustande kommen. Auch in unserer Studie hatten die Patienten im Mittel eine pulmonalvenöse Sauerstoff-Sättigung von 63%, wodurch ein gewisser Grad an Gewebshypoxie ausgedrückt wird (Kielstein et al. 2005). Zudem sei es denkbar, dass hohe ADMA-Konzentrationen die pulmonale Gefäßschädigung reflektieren (Kielstein et al. 2005), da Endothelzellen große Mengen an ADMA freisetzen können (Böger 2003, Böger et al. 2000).

ADMA ist erhöht bei Patienten mit systemischen Gefäßerkrankungen (Böger 1997). Wenn bei der PH von einer systemischen Endotheldysfunktion ausgegangen wird, müsste analog die ADMA-Konzentration erhöht sein. Pullamsetti und Mitarbeiter zeigten sowohl im Ratten- (Monocrotalin-induzierte PAH-Ratten) als auch im Humanmodell (I-PAH-Patienten), dass erhöhte SDMA- und ADMA-Konzentrationen vorlagen (Pullamsetti et al. 2005). Die Ergebnisse unserer Studie folgten der These, jedoch nicht signifikant.

Mäuse, die demgegenüber eine Überexpression der DDAH-1 aufweisen, seien geschützt vor endothelialer Dysfunktion (Dayoub et al. 2008). Bei IPAH-Patienten (Kielstein et al. 2005, Pezzuto et al. 2015), bei CTEPH-Patienten (Skoro-Sajer et al. 2007) und bei Patienten mit schwerer Pulmonaler Hypertonie und angeborenen Herzerkrankungen (Gorenflo et al. 2001) waren die ADMA-Konzentrationen erhöht gegenüber Gesunden. Böger postulierte, dass hohe bzw. niedrige ADMA-Konzentrationen im Plasma zwischen Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung und Gesunden unterscheiden können (Böger 2006). Diese Beobachtungen konnten wir in unserem Studienkollektiv nicht bestätigen.

Jedoch zeichnete sich eine Tendenz zu den höchsten ADMA-Konzentrationsbereichen in der Studiengruppe 2 und den niedrigsten Werten in der Studiengruppe 3 ab.

Bei PAH-Patienten assoziiert mit chronischer Herzerkrankung waren die ADMA-Level erhöht gegenüber Gesunden und gegenüber Patienten mit chronischer Herzerkrankung ohne PAH (Fang et al. 2015). Auch Cooke (Cooke 2005) und Böger (Böger 2006) bestätigen, dass erhöhte ADMA-Konzentrationen eine schlechte endotheliale Funktion, welche mit der PAH assoziiert ist (Loscalzo 1992), anzeigen.

Unsere Studienresultate stimmten nicht mit den oben diskutierten überein. Es wurden keine signifikant unterschiedlichen ADMA-Konzentrationen in den einzelnen Studiengruppen, jedoch richtungsweisende kleine Konzentrationsunterschiede festgestellt. Dabei muss beachtet werden, dass einige Faktoren die ADMA-Konzentration beeinflussen können.

ADMA-Konzentrationen sind erhöht bei Patienten mit höherem Alter (Miyazaki et al. 1999), essentieller arterieller Hypertonie (Surdacki et al. 1999), Diabetes mellitus Typ II (Abbasi et al. 2001) und Hypercholesterinämie (Böger et al. 1998). Zudem werden die ADMA-Konzentrationen beeinflusst von ACE-Hemmern, Angiotensinrezeptor-Blockern (Delles et al. 2002) sowie antidiabetischen Medikamenten (Asagami et al. 2002, Stühlinger et al. 2002). Diese verzerrenden Faktoren konnten nur in der Kontrollgruppe eliminiert werden, das Patientenkollektiv war in dieser Hinsicht sehr unterschiedlich charakterisiert. Das Alter, die Komorbiditäten und die bestehende Medikation der Patienten könnten der Diskrepanz zwischen den hier ermittelten und den Literatur-Daten zugrunde liegen.

Darüber hinaus wurden die ADMA-Konzentrationen im Plasma bestimmt und nicht direkt im umgebenden Gewebe der pathologisch veränderten Lungengefäße. Es gibt jedoch Hinweise, dass die unmittelbar lokalen ADMA-Konzentrationen höher sind als in der Peripherie (im Plasma). Brouns et al. demonstrierten, dass bei Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall mit zerebrovaskulärer Erkrankung die ADMA-Konzentrationen im Liquor erhöht waren, während durch kardiale Emboli bedingte ischämische Insulte keine ADMA-Konzentrationserhöhung im Liquor mit sich brachten (Brouns et al. 2009). Es sollte daher in Betracht gezogen werden, dass die in dieser Studie ermittelten ADMA-Konzentrationen im Plasma niedriger sein könnten als die Konzentrationen direkt im umgebenden Gewebe der Lungengefäße.

SDMA

Erhöhte SDMA-Konzentrationen wirken synergistisch mit ADMA in der Inhibition der endothelialen NO-Synthase (Pullamsetti et al. 2005). Bode-Böger et al. erklärten, dass SDMA die L-Arginin-Bioverfügbarkeit für die NO-Synthase limitiert und somit eine endotheliale Dysfunktion induziert werde (Bode-Böger et al. 2006). Dies erklärt die Rolle von SDMA für die Endothelfunktion und macht die in der vorliegenden Studie beim Patientenkollektiv ermittelten signifikant höheren SDMA-Werte gegenüber gesunden Probanden nachvollziehbar.

L-Arginin

L-Arginin ist das Substrat der NO-Synthase (Vallance et al. 1992). L-Arginin-Gaben bei Angina Pectoris –Patienten bzw. bei Monocrotalin-induzierten PH-Ratten senkten den Endothelin 1-Spiegel und verbesserten die Endothelfunktion (Piatti et al. 2003, Sasaki et al. 2004). Die gleichzeitige Inkubation von Endothelzellen mit L-Arginin und SDMA machte den Effekt von SDMA rückgängig (Bode-Böger et al. 2006). Demnach hätte L-Arginin eine vasoprotektive Wirkung und könnte den Einfluss von SDMA reversieren (Bode-Böger et al. 2006, Böger 2006).

In der vorliegenden Studie wurden erhöhte Werte in der Kontrollgruppe ermittelt. Diese Resultate stützen die These, dass es bei einer PH-Erkrankung zu einem L-Arginin-Konzentrationsabfall und somit einer Verschlechterung der Endothelfunktion kommt.

Homoarginin

Über Homoarginin im Zusammenhang mit der PH bzw. der Endothelfunktion gibt es bisher wenig Evidenz (Pilz et al. 2015). In der 4D- (Patienten mit Diabetes mellitus Typ II und Hämodialyse) und in der LURIC-Studie (Patienten, die eine Koronarangiografie erhielten) war das Homoarginin assoziiert mit Markern der Endothelfunktion (März et al. 2010). Atzler et al. zufolge könne Homoarginin die Endothelfunktion verbessern (Atzler et al. 2015). In der 4D-Studie war der mittlere Homoarginin-Wert bei 1,2µM und in der LURIC-Studie bei 2,6µM (Enescu 2010). Der mediane Wert, der in unserer Arbeit ermittelt wurde, betrug 2,33µM bei Gesunden (Normbereich: 2-3 µM (Atzler et al. 2015, Meinitzer et al. 2007)). Im Vergleich mit der LURIC-Studie erscheint ein Wert von 2,6µM für ein Patientenkollektiv, das kardiovaskulär beeinträchtigt ist, hoch. Dies verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Festlegung eines allgemeinen Homoarginin-Wertebereiches, welcher nicht zuletzt durch die Nierenfunktion beeinflusst wird.

Die Ergebnisse unserer Studie und der genannten Untersuchungen indizieren, dass Homoarginin mit der Endothelfunktion positiv im Zusammenhang steht. Letztlich ist der

Kenntnisstand über Homoarginin jedoch noch nicht ausgereift. Einerseits wird ihm die Möglichkeit zugeschrieben, die L-Arginin-abhängige NO-Synthese zu reduzieren (Moali et al. 1998, van der Zwan et al. 2013), andererseits könne Homoarginin die Arginase inhibieren und somit die L-Arginin- und auch die NO-Konzentrationen erhöhen (Pilz et al. 2015).

Fazit

Die SDMA-Plasmakonzentrationen waren im Patientenkollektiv - wie erwartet - signifikant höher als bei gesunden Probanden. Dieser Zusammenhang wird auch von anderen in der Literatur veröffentlichten Studien bestätigt.

L-Arginin war bei gesunden Probanden signifikant erhöht gegenüber dem Patientenkollektiv. Diese Resultate und weitere Untersuchungen (s.o.) stützen die These, dass es bei einer PAH-Erkrankung zu einem L-Arginin-Konzentrationsabfall und somit einer Verschlechterung der Endothelfunktion kommt.

Homoarginin verhielt sich in unserer Studie wie L-Arginin. Homoarginin ist zwar noch ein wenig erforschter Biomarker, jedoch lassen unsere und auch andere Untersuchungen einen günstigen Effekt von Homoarginin auf die Endothelfunktion erwarten.

Hinsichtlich ADMA stimmten unsere Resultate nicht mit anderen Studienergebnissen überein. Es wurden keine statistisch signifikant unterschiedlichen ADMA-Konzentrationen in den einzelnen Studiengruppen, jedoch richtungsweisende kleine Konzentrationsunterschiede festgestellt (höchste Plasmakonzentrationen in Studiengruppe 2, niedrigste Konzentrationen in Studiengruppe 3). Das Alter, die Komorbiditäten und die Medikation der Patienten könnten die Diskrepanz zwischen unseren und den Literatur-Daten erklären. Zudem sollte in Betracht gezogen werden, dass die in dieser Studie ermittelten ADMA-Konzentrationen im Plasma niedriger sein könnten als die Konzentrationen im unmittelbar umgebenden Gewebe der Lungengefäße. Nicht zuletzt erfolgt an dieser Stelle noch einmal der Hinweis auf das kleine Studienkollektiv.

4.2.1.2.2 Korrelation mit Prognoseparametern

ADMA

Es konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen ADMA-Konzentrationen und dem NYHA-Stadium festgestellt werden, jedoch lag eine Tendenz zu niedrigeren ADMA-Konzentrationen in niedrigen NYHA-Klassen vor. Ähnlich fanden auch Tutarel et al. in einer Studienpopulation von Patienten mit angeborenen Herzerkrankungen, dass ADMA ein besserer Wert als das NT-proBNP war, um zwischen den NYHA-Klassen zu unterscheiden (Tutarel et al. 2012).

Zwischen ADMA und der Gehstrecke sowie der NT-proBNP-Plasmakonzentration lag eine statistisch signifikante Korrelation vor. Auch in einer Studie mit Patienten mit chronischer systolischer Herzinsuffizienz war ADMA positiv assoziiert mit dem NT-proBNP (Wilson Tang et al. 2008). Dimitroulas et al. fanden ebenso einen starken Trend, jedoch keine signifikante positive Korrelation von ADMA und NT-proBNP bei PAH-Patienten assoziiert mit systemischer Sklerose (Dimitroulas et al. 2008). Außerdem waren hier die ADMA-Konzentrationen negativ korreliert mit dem 6-Minuten-Gehtest (Dimitroulas et al. 2008).

Für die Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität und den Kohlendioxid-Partialdruck gab es in unserer Studie keinen statistischen Zusammenhang. Ebenfalls gab es keine Korrelation zwischen ADMA und den Parametern der Rechtsherzkatheteruntersuchung sowie der Echokardiografie. Andere Studien mit IPAH-Patienten (Kielstein et al. 2005, Pezzuto et al. 2015), mit Patienten mit PAH assoziiert mit chronischen Herzerkrankungen (Fang et al. 2015) und mit CTEPH-Patienten (Skoro-Sajer et al. 2007) beobachteten Zusammenhänge zwischen ADMA und hämodynamischen Parametern. Eine ADMA-Infusion bei Gesunden induzierte höhere PVR (Kielstein et al. 2005). ADMA hat also offensichtlich das Potential, auch die Hämodynamik zu repräsentieren. Jedoch war in unserer Studie keine derartige Tendenz erkennbar. Auch Kielstein et al. stellten fest, dass zwischen ADMA und prognostischen Markern Korrelationen bestehen, aber die physiologische Rolle von ADMA bei der PH im Detail immer noch unklar ist (Kielstein et al. 2005).

SDMA

Es wurden signifikant schlechtere SDMA-Werte bei höheren NYHA-Stadien ermittelt. Auch Meinitzer et al. stellten eine Assoziation der NYHA-Klasse mit der SDMA-Plasmakonzentration bei Koronarangiografie-Patienten fest (Meinitzer et al. 2011).

Außerdem bestand eine signifikante Korrelation sowohl mit der 6-Minuten-Gehstrecke als auch mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration. Bei Patienten mit chronischer systolischer Herzinsuffizienz (Wilson Tang et al. 2008) und bei Patienten, die eine Koronarangiografie erhielten (Meinitzer et al. 2011), war SDMA ebenfalls positiv assoziiert mit dem NT-proBNP.

Es bestand kein Zusammenhang mit der Hämodynamik. Bei Patienten mit kardiogenem Schock nach einem Myokardinfarkt war SDMA hingegen invers korreliert mit dem mPAP und dem PVR (Nicholls et al. 2007).

Insgesamt gibt es bisher wenige verlässliche Studien, welche SDMA mit Prognoseparametern der PH korrelieren. SDMA wies Tendenzen auf, dass ein Zusammenhang mit der Hämodynamik besteht, jedoch ist die Tendenz nicht so stark wie für ADMA.

L-Arginin

Beyer et al. fanden in einer Kohorte von IPAH-Patienten eine starke Korrelation der L-Arginin-Konzentration mit der NYHA-Klasse (Beyer et al. 2008). Dieser Trend wurde in unserer Studie ebenfalls aufgezeigt, war jedoch knapp nicht statistisch signifikant. Dies ist wahrscheinlich auf die kleine Fallzahl im Studienkollektiv zurückzuführen. Mit dem 6-Minuten-Gehtest konnte kein Zusammenhang gefunden werden. Demgegenüber stehen weitere Ergebnisse von Beyer et al., welche einen signifikanten Zusammenhang darstellen. Es bestand jedoch eine Korrelation zwischen L-Arginin und der NT-proBNP-Plasmakonzentration. In einem Fall-Report eines CTEPH-Patienten war das L-Arginin ebenfalls invers korreliert mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration (Ogata et al. 2010).

Als einziger der in dieser Studie untersuchten Biomarker korrelierte das L-Arginin signifikant mit der Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, dem Kohlendioxid-Partialdruck, dem RVSP und mit Daten der Rechtsherzkatheteruntersuchung (Herzindex, Gemischtvenöse Sauerstoffsättigung, Pulmonalvaskulärer Widerstand). Die Korrelation mit Parametern der invasiven Hämodynamik wurde bestätigt bei Studiengruppen mit PPH-Patienten (Sitbon et al. 2002) und IPAH-Patienten (Beyer et al. 2008). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass L-Arginin einen prognostischen Wert hat. Nicht zuletzt durch den statistischen Zusammenhang, der zwischen L-Arginin und dem NT-proBNP sowie den hämodynamischen Parametern (vor allem Pulmonalvaskulärer Widerstand und Herzindex) bestand, wurde dies belegt (Sitbon et al. 2002).

Homoarginin

Im Gegensatz zu unserer Studie fanden Atzler et al. bei Patienten im NYHA-Stadium III oder IV signifikant niedrigere Homoarginin-Werte (Atzler et al. 2015). Unsere Werte gingen in die gleiche Richtung, aber sie waren nicht signifikant. Pilz et al. und Vogl et al. bestätigen mit ihren Studien über Koronarangiografie- und Claudicatio intermittens-Patienten die inverse Korrelation mit dem NT-proBNP, die bei unseren Studienpatienten ermittelt wurde (Pilz et al. 2011, Vogl et al. 2015). Außerdem lag eine statistisch signifikante Korrelation mit dem Tei –Index vor. Laut Atzler et al. ist Homoarginin jedoch mit weiteren Parametern der Herzinsuffizienz assoziiert (Atzler et al. 2015).

Als Cutoff-Werte wurden jeweils die medianen Plasmakonzentrationen der Patientenpopulation definiert. Hier ist es notwendig, durch größere Langzeitstudien verlässliche Grenzwerte zu definieren. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Korrelationen sollten zudem kritisch bewertet werden, da meist signifikante Zusammenhänge lediglich in Subpopulationen auftraten und nicht im gesamten Studienkollektiv.

In der Literatur finden sich gehäuft Zusammenhänge der Biomarker-Plasmakonzentrationen und der Nierenfunktion. Entsprechend korrelierten in unserer Studie ADMA, SDMA und Homoarginin mit der Glomerulären Filtrationsrate und ADMA und SDMA mit dem Kreatinin. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung ist ADMA prognostisch für die Progression (Eiselt et al. 2014). SDMA wird hauptsächlich renal eliminiert (Meinitzer et al. 2011, Memon et al. 2013) und sei ein sensiblerer Marker der Nierenfunktion als alle anderen bekannten Marker für die GFR-Schätzung (Bode-Böger et al. 2006). Ebenso wird Homoarginin renal sezerniert (Enescu 2010). Unsere Ergebnisse unterstreichend korrelierten SDMA (Kielstein et al. 2006, Lüneburg et al. 2012) und Homoarginin (März et al. 2010) auch in anderen Studien mit der Nierenfunktion. Laut Atzler et al. kann durch eine Nierenfunktionsstörung die Homoarginin-Konzentration sinken (Atzler et al. 2015). Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die Bewertung der Biomarker-Konzentrationen im Plasma unter Beachtung der Nierenparameter erfolgen sollte.

Fazit

Die in unserer Studie ermittelten Zusammenhänge zwischen ADMA bzw. SDMA und der 6-Minuten-Gehstrecke, der NT-proBNP-Plasmakonzentration sowie des NYHA-Stadiums werden durch andere Studien gestützt. Dagegen fanden wir jedoch keinen statistischen Zusammenhang zwischen ADMA bzw. SDMA und hämodynamischen Parametern. Zusammen genommen können ADMA und SDMA als potentielle Biomarker für den Schweregrad von PAH-Erkrankten angesehen werden.

L-Arginin zeigte sich als guter Parameter der Hämodynamik. Zudem wies er in unserer und in weiteren Studien Assoziationen mit dem NYHA-Stadium sowie der NT-proBNP-Plasmakonzentration auf.

Homoarginin war signifikant mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration und dem Tei-Index sowie diskret mit dem NYHA-Stadium assoziiert. Die Literatur bestätigt diese Ergebnisse in anderen Studienpopulationen.

Alle Biomarker sollten unter Beachtung der Nierenparameter bewertet werden.

4.2.1.2.3 Assoziation mit Überleben/TtCW

ADMA

Niedrige ADMA-Konzentrationen waren mit längerem Überleben assoziiert. Für die TtCW war eine Tendenz zu längerer ereignisfreier Zeit bei niedrigen ADMA-Konzentrationen ersichtlich. ADMA war in dieser Studie der einzige untersuchte Biomarker, welcher einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Überlebenszeit aufwies.

In anderen Studien war ADMA bei IPAH-Patienten ebenfalls negativ korreliert mit dem Überleben (Kielstein et al. 2005, Pezzuto et al. 2015). Die mediane Follow-Up-Zeit in der Untersuchungsreihe von Kielstein et al. betrug 26 Monate. In unserer Studie korrelierte ADMA mit dem Überleben, obwohl die mittlere Dauer bis zum letzten Follow-Up-Zeitpunkt nur 15 Monate betrug. Das spricht für eine starke Aussagekraft von ADMA. Auch bei CTEPH-Patienten war das Überleben bei ADMA-Konzentrationen oberhalb eines Grenzwertes von 0,64 (in dieser Studie: 0,65) schlechter als mit Werten unterhalb (Skoro-Sajer et al. 2007) und die Arbeitsgruppe um Böger (Böger et al. 2011) erklärte ADMA als unabhängigen Risikofaktor für den Tod bei pAVK-Patienten.

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Aussage, dass ADMA prognostisch für das Überleben ist. Auch die Tendenz zur Prognosefähigkeit hinsichtlich der klinischen Verschlechterung wird durch weitere Studien belegt, in denen ADMA bei verschiedenen Patientenpopulationen assoziiert war mit kardiovaskulären Erkrankungen (Böger et al. 2011, Hov et al. 2015, Kiechl et al. 2009, Sibal et al. 2010).

SDMA

Für inframediane SDMA-Konzentrationen zeigten sich Trends zu längeren Überlebenszeiten sowie längeren Zeitintervallen bis zur klinischen Verschlechterung.

Diese Ergebnisse werden von anderen Studien bekräftigt, denn SDMA war assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen in der Allgemeinbevölkerung (Kiechl et al. 2009) und bei Schlaganfallpatienten (Lüneburg et al. 2012). Bei Patienten, welche eine Koronarangiografie erhielten, war SDMA assoziiert mit kardiovaskulärer Mortalität und mit der Gesamtmortalität (Meinitzer et al. 2011). Auch bei Patienten mit einer pAVK war SDMA assoziiert mit der Mortalität, aber diese Zusammenhänge seien stark beeinflusst durch die enge Relation zwischen SDMA und der Nierenfunktion (Böger et al. 2011).

Da in dieser Studie keine statistisch signifikanten Resultate für SDMA als prognostischen Faktor für das Überleben und die klinische Verschlechterung bei PAH- und CTEPH-Patienten vorlagen, lässt sich auch in Anbetracht der Aussage von Böger 2011 keine finale Aussage diesbezüglich machen.

L-Arginin

Die Kaplan-Meier-Kurven hinsichtlich des Todes und der TtCW überlagerten sich. Es zeichnete sich eine Tendenz zu kürzerem Überleben bei hohen L-Arginin-Werten ab. In anderen Studien wurde ein Zusammenhang von L-Arginin und Outcome bestätigt, jedoch in entgegengesetzter Richtung (besseres Outcome bei höheren L-Arginin-Konzentrationen).

Bei Patienten mit pAVK war L-Arginin assoziiert mit kardiovaskulären Ereignissen (Vogl et al. 2015). L-Arginin-Injektionen bei Ratten mit ischämischer hinterer Extremität (Jin und D'Alecy 1995) und bei Monocrotalin-induzierten PH-Ratten (Ou et al. 2010) konnten das Überleben verbessern. Auch bei Patienten mit Sepsis-assoziiertem akuten Leberversagen war die L-Arginin-Plasmakonzentration ein früher Prädiktor für das Überleben (Brenner et al. 2012). Reduzierte L-Arginin-Plasmalevel waren assoziiert mit höherer Mortalität bei Patienten mit Sichelzellanämie und PH (Morris et al. 2005).

Homoarginin

Bei hohen Homoarginin-Werten zeichnete sich ein Trend für längere Zeiten bis zum Eintreten des Todes bzw. der klinischen Verschlechterung ab.

Viele andere Studienergebnisse erhärteten diese Resultate: Niedrige Homoarginin-Werte waren in verschiedenen Patientenkollektiven assoziiert mit erhöhter kardiovaskulärer (Enescu 2010, März et al. 2010) und Gesamtmortalität (Enescu 2010, März et al. 2010, Pilz et al. 2015, Pilz et al. 2011, Vogl et al. 2015). Demgegenüber fanden Hov et al. eine positive Korrelation von Homoarginin mit dem kardiovaskulären Risiko in einer Population mit chronischen Nierenerkrankungen. Dies sei auf die eingeschränkte Nierenfunktion zurückzuführen, die das Homoarginin stark beeinflusse (Hov et al. 2015). Auch in unserer Studie gab es eine Korrelation von Homoarginin mit Parametern der Nierenfunktion, daher sollte die Interpretation der Homoarginin-Werte kritisch unter Einbeziehung der renalen Funktion erfolgen.

Fazit

ADMA zeigte sich in unserer Studie analog zu anderen Untersuchungen als prognostisch für das Überleben. Auch kann ein Zusammenhang mit der Zeit zur klinischen Verschlechterung angenommen werden.

SDMA und *Homoarginin* waren in den Kaplan-Meier-Diagrammen mit dem Überleben assoziiert (nicht signifikant), jedoch können diese aufgrund ihrer starken Beeinflussung durch die Nierenfunktion nur eingeschränkt bewertet werden.

L-Arginin war in unserer Studie nicht prognostisch für das Outcome der Patienten.

4.2.1.2.4 Zusammenfassung

SDMA, L-Arginin und Homoarginin zeigten signifikante Plasmakonzentrationsunterschiede zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe.

Alle Biomarker, vor allem ADMA und SDMA wiesen Zusammenhänge mit PH-Prognoseparametern auf. L-Arginin war zudem stark assoziiert mit der Hämodynamik. Die Abhängigkeit von ADMA, SDMA und Homoarginin von der Nierenfunktion muss unbedingt beachtet werden. Vor allem die Aussagekraft von ADMA, SDMA und Homoarginin wird dadurch beeinträchtigt.

Als signifikant prognostisch für das Überleben der Patienten stellte sich ADMA heraus. SDMA und Homoarginin waren im Trend ebenfalls assoziiert mit der Überlebenszeit.

ADMA ist der meist erforschte und ein vielversprechender Biomarker. In unserer Studie bestätigte sich dies nur teilweise. Die fehlende Korrelation mit der Hämodynamik sowie der fehlende signifikante Konzentrationsunterschied zwischen Patienten und Gesunden könnten auf das kleine Studienkollektiv zurückzuführen sein. Bestärkt wird diese Überlegung dadurch, dass unsere Ergebnisse zumindest im Trend denen der Literatur folgen.

4.2.1.3 Zusammenhang von RHI und Biomarkern

ADMA, SDMA und L-Arginin

SDMA und ADMA waren invers, L-Arginin positiv mit dem RHI assoziiert (statistisch signifikant).

ADMA inhibiert die endothelabhängige Vasodilatation in vitro (Stühlinger et al. 2003, Vallance et al. 1992) und beeinträchtigt somit die Endothelfunktion und ist erhöht bei Patienten mit systemischen Gefäßerkrankungen (Böger et al. 1997). Die inverse Korrelation zwischen ADMA und dem RHI ist daher nachvollziehbar. Eine gleichsinnige Korrelation von RHI und ADMA fanden weitere Autoren bei Gesunden bzw. Probanden mit kardiovaskulärer Erkrankung (Cooke 2000, Ghebremariam et al. 2015, Juonala et al. 2007).

Diese Arbeit ist nach heutigem Kenntnisstand die erste Studie mit PH-Patienten, in der ADMA mit dem RHI korreliert wurde. Weitere Studien über andere Krankheitsbilder, in denen die Quantifizierung der Endothelfunktion nicht anhand des RHI, sondern der FMD erfolgte (Böger et al. 1998, Stühlinger et al. 2003), stützen unsere Ergebnisse.

Die Studienlage zum Zusammenhang von SDMA und L-Arginin und Parametern der Endothelfunktion ist weniger umfassend. Yilmaz et al. ermittelten keine Korrelation für L-Arginin und eine inverse Korrelation für SDMA mit der FMD bei Patienten mit Proteinurie und normaler GFR (Yilmaz et al. 2008). Bei chronisch nierenkranken Patienten wurden

Diskussion

Korrelationen zwischen der FMD und SDMA (Memon et al. 2013) sowie L-Arginin (Chen et al. 2015) ermittelt. Allerdings sei SDMA nicht wie ADMA ein direkter Inhibitor der NOS, der Einfluss von SDMA auf das Endothel könne jedoch ebenso wichtig sein wie der von ADMA (Memon et al. 2013). In der Normalbevölkerung war L-Arginin positiv korreliert mit der FMD in den Vorderarm-Widerstandsgefäßen (Lind et al. 2009). Diese Studien geben Hinweise, dass ein Zusammenhang auch zwischen L-Arginin sowie SDMA und der FMD besteht. Jedoch sollte vor allem die Rolle des SDMA noch weiter erforscht werden. Die renale Eliminierung des SDMA erschwert unsere Studienauswertungen, da viele der Patienten (und einige Kontrollprobanden) eine eingeschränkte Nierenfunktion aufwiesen.

Homoarginin

Homoarginin wies in der vorliegenden Studie keinen Zusammenhang mit dem RHI auf.

Homoarginin ist ein weniger effektives Substrat der NOS als L-Arginin; die K_m -Werte des Homoarginin sind 10-mal höher (Bretscher et al. 2003). Dies könnte erklären, dass Homoarginin nicht mit dem RHI korreliert, denn es hat weniger Auswirkungen auf die NO-Synthase. Vogl et al. führten zudem an, dass dem Homoarginin eine breiter gefächerte Rolle im Metabolismus zukomme als die Modulierung der Endothelfunktion (Vogl et al. 2015). In einer Studie mit schwangeren Frauen stellten Valtonen et al. fest, dass Homoarginin mit der FMD assoziiert war (Valtonen et al. 2008).

Es gibt bisher wenige Untersuchungen zu diesem Thema. Eine verlässliche Aussage bezüglich eines Zusammenhangs zwischen dem RHI und dem Homoarginin kann zurzeit nicht formuliert werden.

Fazit

Vor allem ADMA, aber auch SDMA und L-Arginin stehen in Zusammenhang mit dem RHI. Erhöhte ADMA- und SDMA-Werte bzw. niedrige L-Arginin-Werte begünstigen eine endotheliale Dysfunktion, die wiederum mit niedrigen RHI-Werten verbunden ist. Dieser Zusammenhang verdeutlicht noch einmal die Rolle der Endothelfunktion in der Pathogenese der PAH.

4.2.2 These 2: Die medikamentöse PAH-spezifische Therapie verbessert die Endothelfunktion

4.2.2.1 RHI als Parameter der Endothelfunktion

Zur Prüfung der These, ob die RHI-Werte therapieabhängig reagieren, wurden die Verlaufswerte der EndoPat2000-Untersuchung betrachtet. Hierfür wurden die Daten von zunächst therapienaiven Patienten verwendet, die nach der ersten Studienvisite eine Therapieeinleitung erfuhren. Zu erwarten war, dass die RHI-Werte sich daraufhin verbessern, also anstiegen. Für diese Versuchsreihe wurden nur Patienten analysiert, die mindestens zur ersten und zur letzten Studienvisite untersucht werden konnten. Daher ist der Stichprobenumfang auf fünfzehn Patienten geschrumpft.

In der Verlaufsbeurteilung des RHI fiel ein deutlicher, jedoch statistisch nicht signifikanter Anstieg bis zum 6-Monats-Messzeitpunkt auf. Bis zum letzten Messzeitpunkt war daraufhin ein signifikanter Abfall zu verzeichnen. Es gab also einen messbaren Effekt der Therapieeinleitung im Sinne einer RHI-Veränderung.

Die jedoch schwankenden Verlaufswerte ließen einige Fragen aufkommen: Deutet der RHI-Verlauf insgesamt auf eine klinische Veränderung im Sinne einer Krankheitsprogression hin, welche dann auch durch den Verlauf des NT-proBNP und der Gehstrecke erklärbar sein müsste? Analog zu dem RHI-Anstieg konnten bessere Werte im 6-Minuten-Gehtest und der NT-proBNP-Konzentration am zweiten Follow-Up verzeichnet werden. Diese könnten als „Vorboten“ für eine RHI-Besserung gelten. Auch andere Autoren bewerteten das NT-proBNP als unabhängigen Prädiktor für die Therapieantwort bei PH-Patienten (Andreassen et al. 2006, Foris et al. 2013, Galie et al. 2008a). Wenn man diesem Ansatz folgt, dann gibt es in unserer Studie eine zeitliche Verzögerung zwischen den Veränderungen der PH-Parameter und des RHI (RHI-Abfall vom dritten bis zum vierten Follow-Up; Gehstrecken-Abnahme und NT-proBNP-Konzentrationsanstieg vom zweiten bis zum dritten Follow-Up).

Eine alternative Erklärung für den Werteabfall nach dem dritten Follow-Up könnte eine Abschwächung des Therapieerfolges oder ein verändertes Therapieschema sein. Darüber hinaus könnten auch Werteverfälschungen durch Komorbiditäten und veränderte Begleittherapeutika (endothelmodulierende Medikamente) für den uneinheitlichen RHI-Verlauf verantwortlich sein. Für eine genauere Beurteilung war die Stichprobe zu klein und auch die Verlaufswerte zu unvollständig. Bei einer Analyse von Patienten, die ausschließlich zu allen Follow-Ups erschienen sind, wäre die Stichprobe zu klein (= sechs therapienaive Patienten) geworden, um die Ergebnisse noch bewerten zu können.

Diskussion

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nach der Therapieeinleitung zu einer Veränderung der Werte kam. Jedoch war es nicht möglich, eine verlässliche Bestimmung des Ausmaßes und der Richtung dieser Veränderung vorzunehmen. Es sollten ähnliche Studien durchgeführt werden mit Patienten, die gleiche Therapieschemata haben. Die vorliegende Studie kann nur Aussagen zur PAH-spezifischen Therapieeinleitung im Allgemeinen machen.

In der Literatur waren nur wenige vergleichbare Untersuchungen zu finden. Bei männlichen Patienten mit Diabetes mellitus Typ II konnte durch tägliche Sildenafil-Gabe eine Verbesserung der Endothelfunktion (gemessen an der FMD und der Endothelin-1-Konzentration) erreicht werden (Aversa et al. 2008). El-Sayed und Amin zeigten an Mäusen, dass der chronische Gebrauch (Studienzeitraum vier Wochen) von PDE-5-Hemmern protektiv auf das Endothel wirkt (El-Sayed und Amin 2015). Auch Ayala et al. fanden heraus, dass PDE5-Hemmer der endothelialen Dysfunktion vorbeugen (Ayala et al. 2007). PDE5-Hemmer, welche häufig Teil der PAH-spezifischen Therapie in dieser Studie waren, hatten also auch in anderen Studien einen messbaren Effekt auf das Endothel. Die Arbeitsgruppen um Wolff und Gabrielli fanden eine Korrelation der pulmonalen Druckveränderungen nach inhalativer Iloprost-Gabe mit der FMD (Gabrielli et al. 2011, Wolff et al. 2007). Dies lässt darauf schließen, dass das periphere Endothel das Therapieansprechen im Lungenkreislauf wiedergeben kann. Um Therapieeffekte genauer beurteilen zu können, müssen einzelne Therapieschemata untersucht werden; dazu sind größere Stichproben und feste Therapieschemata für die einzelnen Patientengruppen erforderlich.

Fazit

Es kann festgehalten werden, dass diese Studie eine Veränderung der RHI-Werte nach Therapieeinleitung bei PAH- und CTEPH-Patienten ermittelt hat. Das Patientenkollektiv war jedoch zu klein und die Patientenmerkmale (Komorbiditäten, Begleittherapieschema, PAH-spezifische Therapie) zu inhomogen, um eine verlässliche Aussage machen zu können.

4.2.2.2 Biomarker als Parameter der Endothelfunktion

Zur Prüfung der These, ob therapieabhängige Veränderungen der Biomarker-Konzentrationen vorlagen, wurden die Verlaufswerte der therapienaiven Patienten betrachtet. Die Konzentrationen aller Biomarker stiegen tendenziell an und fielen bis zur letzten Studienvisite wieder ab. Für Homoarginin und L-Arginin war die Steigung signifikant.

Eine Therapiewirkung auf das Endothel hätte erwarten lassen, dass die ADMA- und SDMA-Konzentrationen sinken und die L-Arginin- und Homoarginin-Konzentrationen steigen. Für Homoarginin und L-Arginin gab es erwartungsgemäß zunächst starke Anzeichen für einen Anstieg als Reaktion auf die Therapie.

ADMA und SDMA sind jedoch, entgegen den Erwartungen, nach der Therapieeinleitung gestiegen. Mögliche Erklärungen hierfür wären eine eventuelle Verzögerung der Werteveränderungen oder Werte-Verfälschungen.

Der ADMA-Verlauf stimmte auch nicht mit den Ergebnissen anderer Studien überein. So waren in einer Studie mit PAH-Patienten assoziiert mit angeborenen Herzerkrankungen die ADMA-Level nach sechs Monaten einer Sildenafil-Therapie signifikant niedriger (Fang et al. 2015). Der Einfluss von ET-Rezeptorantagonisten auf endogene Dimethylarginine ist im Kontext der PAH noch nicht im Detail verstanden (Pullamsetti et al. 2005). ET-Rezeptor-Antagonisten konnten jedoch bei chronischer Herzinsuffizienz einem ADMA-Anstieg vorbeugen (Ohnishi et al. 2002).

Die Veränderungen der Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin sind sehr vage. Analog zum RHI-Verlauf kann auch für die Biomarker keine eindeutige Tendenz der Verlaufswerte festgelegt werden. Fraglich bleibt auch, inwieweit die Biomarker von den PAH-spezifischen Medikamenten beeinflusst werden und nach welchem Zeitraum messbare Veränderungen zu registrieren sind.

Fazit

Circa bis zum dritten Messzeitpunkt erfolgte eine Veränderung der RHI- und Biomarker-Werte. Anschließend befanden sich die gemessenen Werte annähernd auf dem Ausgangsniveau. Es scheint also einen Therapieeffekt auf die hier untersuchten Parameter der Endothelfunktion zu geben, eine anhaltende gleichsinnige Veränderung der Werte konnte jedoch nicht festgestellt werden. Dazu beigetragen hat sicherlich die geringe Patientenzahl bzw. die geringe Follow-Up-Rate und die Inhomogenität der Gruppe hinsichtlich der Art der PAH und der Art der Therapie.

4.3 FEHLERQUELLEN UND LIMITATIONEN DER STUDIE

Probandenauswahl

Die Auswahl der Patienten orientierte sich an den in Abschnitt 2.1.1 genannten Einschlusskriterien. Viele Patienten hatten kardiovaskuläre Komorbiditäten, welche den RHI beeinflusst haben könnten. Eine mögliche Reduktion dieser Verzerrung wäre durch den Ausschluss von Patienten mit Diabetes mellitus, koronarer Herzkrankheit, arteriellem Hypertonus und Hypercholesterinämie denkbar, jedoch ist aus Tabelle 5 ersichtlich, dass nahezu jeder Patient an einer der aufgeführten Erkrankungen litt. Ein Ausschluss von Patienten mit Komorbiditäten ist daher unrealistisch und würde darüber hinaus das Patientenprofil der PAH- und CTEPH-Erkrankten verfälschen. Außerdem erhielten die meisten Patienten unterschiedliche Therapieschemata, welche sich auch im Studienverlauf veränderten. Viele nahmen weitere Endothel-beeinflussende Medikamente ein (ACE-Hemmer, Beta-Blocker etc.), welche die Endothelfunktion sowie die Plasmakonzentrationen der Biomarker beeinflusst haben könnten. In einer Studie von Wilson Tang (Wilson Tang et al. 2008) hatten Patienten mit einer Herzinsuffizienz niedrigere ADMA-Werte unter Beta-Blocker-Einnahme.

Des Weiteren war das Matching mit der Kontrollgruppe nicht lückenlos; es gab Unterschiede im Rauchverhalten, hinsichtlich des BMI sowie des Alters. Auch wies die Patienten-Population in sich ein inhomogenes Rauchverhalten auf. Zudem nimmt die Nierenfunktion u.a. auf die Biomarker Einfluss (s.o). Die Analysen sind daher kritisch zu bewerten und es sollten in kommenden Studien Probanden und Patienten mit normaler Nierenfunktion eingeschlossen werden und es sollte ein Matching bezüglich der Nierenparameter erfolgen.

Durchführung

Während der Durchführung der Studie waren die Follow-Up-Raten geringer als geplant. Nur ca. die Hälfte der anfangs eingeschlossenen therapienaiven Patienten erschienen auch zum Messzeitpunkt nach einem Jahr. Die Drop-Out-Rate war also sehr hoch und hatte maßgeblichen Einfluss auf die Studienergebnisse. Die zeitlichen Abstände zwischen den Studienvisiten variierten zwischen den einzelnen Patienten. Fehler bzw. Abweichungen bei der Durchführung der Untersuchungen, Laboranalysen und Tests konnten trotz festgelegter Standards nicht ausgeschlossen werden. Es lagen nicht von allen Patienten alle Daten jeder Studienvisite vor. Der Beobachtungszeitraum dieser Studie war vor allem hinsichtlich der Überlebenszeitanalysen knapp (die mediane historische Überlebenszeit von unbehandelten PPH-Patienten betrug laut D'Alonzo et al. 2,8 Jahre

(D'Alonzo et al. 1991)). Ebenfalls kritisch zu bewerten waren die subjektiven Patientenaussagen hinsichtlich der Nüchternperiode und des Rauchverhaltens. Es wurde keine Bestimmung der Glucose-Werte im Blut durchgeführt, um die Nahrungskarenz zu überprüfen.

Statistik

Diese Studie wurde durchgeführt mit einer kleinen Patientenzahl, jedoch war diese im Vergleich zu anderen Studien zur PH ähnlich (im Vergleich: Studie von Peled und Mitarbeitern (2008): 54 Patienten, 21 Kontrollprobanden). Weiß behauptete: „Je kleiner der Stichprobenumfang ist, desto eher wird die Nullhypothese beibehalten“ (Weiß 2013). Daher ist es möglich, dass in dieser Studie nur aufgrund des geringen Stichprobenumfangs Ergebnisse nicht signifikant waren. Es ist jedoch schwierig, größere Stichproben zu untersuchen, da die jährliche Inzidenz der PPH bei 1-2 pro 1.000.000 Personen liegt (Olschewski und Seeger 2002). Die Rekrutierung therapienaiver Patienten war ein zusätzlich erschwerendes Kriterium. Nicht zuletzt ist auch ein Selektionsbias (Weiß 2013) zu erwähnen. Die Studienteilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis und konnte auch verweigert werden. So wurden z.B. sehr kranke Patienten ausgeschlossen, die sich zusätzliche Studienuntersuchungen nicht zumuten wollten. Auch während der Studiendurchführung gab es Ausscheider („Drop Outs“ (Weiß 2013)). Es war keine aussagekräftige Analyse aufgeteilt nach der PH-Klasse möglich, da es zu wenige CTEPH-Patienten im Studienkollektiv gab. Darüber hinaus waren die Korrelationsgeraden z.T. stark von Ausreißer-Werten verzerrt. Diese Werte wurden jedoch bewusst nicht ausgeschlossen, um die Patientenzahl nicht weiter zu reduzieren.

Zusammenfassend ist die hohe Drop-Out-Rate bei kleiner Patientenzahl als womöglich stärkster Störfaktor der Studie zu benennen.

4.4 AUSBLICK UND SCHLUSSFOLGERUNG

Angeregt durch die Studie von Peled et al. 2008 war das Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob der RHI gemessen mit dem EndoPat2000-System als Verlaufs- und Schweregrad-Parameter bei PAH- und CTEPH-Patienten geeignet ist. Zusätzlich wurde auch die Eignung der vier Biomarker ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin analysiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der RHI als auch die Biomarker Potential für die Diagnostik der PAH und CTEPH haben. Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Untersuchungen von Peled et al. Es gab Hinweise für eine prognostische Wertigkeit des RHI hinsichtlich des Clinical Worsening. ADMA war assoziiert mit dem Überleben. Für SDMA, L-Arginin und Homoarginin gab es hier diskrete Zusammenhänge. Alle Biomarker und der RHI korrelierten mit der NT-proBNP-Konzentration (und mit weiteren Prognose-Parametern).

Am Einschlussdatum gab es signifikante Konzentrationsunterschiede der Biomarker zwischen Patienten und Kontrollprobanden, was auf eine Erhöhung der Werte im Krankheitsprozess der PAH/CTEPH hinweist. Für ADMA wurde hier kein statistisch signifikantes Ergebnis ermittelt, jedoch weisen weitere Studien auf ein solches hin.

Das Therapieansprechen konnte in dieser Studie nicht vollends bewertet werden. Trotz knapper Datenlage war jedoch ersichtlich, dass es nach der Therapieeinleitung messbare Veränderungen der RHI- und Biomarker-Werte gab.

Bei dieser Studie handelte es sich um eine prospektive Untersuchung. Angelehnt an die Resultate sollten weitere Studien folgen, welche die aufgezeigten Tendenzen in einem optimierten Studiendesign (s. Abschnitt 4.3) weiter hinterfragen. Vor allem die Reaktion auf die Therapieeinleitung gibt Anlass, weiter und expliziter erforscht zu werden. Hierzu könnten Untersuchungen einzelner festgelegter Therapieschemata (Mono-, Kombinationstherapien) sinnvoll sein. Insbesondere müsste die therapienaive Studiengruppe wachsen und zuverlässig engmaschig visitiert werden. Zur Ausweitung des Studienkollektivs wären Multicenter-Studien hilfreich. Außerdem sollten die Einschlusskriterien kritisch gewählt werden (Rauchverhalten, Nierenparameter). Eine Blutglucose-Kontrolle wäre sinnvoll, um die Nüchternheit der Studienteilnehmer zu verifizieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Pulmonal arterielle Hypertonie ist eine seltene Erkrankung mit schlechter Prognose. Durch das Zusammenspiel von Proliferation, Inflammation und insbesondere endothelialer Dysfunktion kommt es zu erhöhten Druckverhältnissen im Lungen-Kreislauf, welche zu Rechtsherzinsuffizienz und schließlich zum Tod führen können.

Bisher gibt es nur wenige (nicht-invasive) Verfahren zur Diagnostik, Verlaufsbeurteilung und Therapie. Daher wurden in dieser Arbeit ein nicht-invasives Verfahren (EndoPat2000-System) und vier kardiovaskuläre Biomarker (ADMA, SDMA, L-Arginin, Homoarginin), von denen vor allem ADMA als Inhibitor der NO-Synthase eine hohe Anerkennung als kardiovaskulärer Prädiktor besitzt, zur Beurteilung der Endothelfunktion im Kontext der PAH und CTEPH untersucht. Dazu wurden Baseline-Werte der Patienten mit gesunden Kontrollprobanden verglichen und die Endothelfunktion mit Prognoseparametern der Pulmonalen Hypertonie korreliert. Außerdem wurde der Therapieerfolg PAH-spezifischer Medikamente (in Hinblick auf die Endothelfunktion) in einem prospektiven Studiendesign untersucht, in dieser Studie erstmals mit dem EndoPat2000-System. Anfangs therapienaive Patienten wurden dazu über ein Jahr lang in regelmäßigen Studienvisiten beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die mit dem *EndoPat2000-System* (Messwert RHI) gemessene periphere Endothelfunktion wie erwartet bei therapienaiven Patienten gegenüber gesunden Probanden schlechter war. Der RHI korrelierte statistisch signifikant mit PH-Prognoseparametern (6-Minuten-Gehstrecke, NT-proBNP-Plasmakonzentration). Hohe RHI-Werte waren (nicht signifikant) assoziiert mit einer längeren Überlebenszeit. In der Untersuchung des Therapieeffekts PAH-spezifischer Medikamente auf den RHI zeigte eine Verlaufsbeurteilung der therapienaiven Patientengruppe eine deutliche Veränderung der Messwerte nach der Therapieeinleitung, die jedoch mit dem vorhandenen Datenmaterial nicht hinreichend interpretiert werden konnte.

Die *Biomarkeranalysen* ergaben für SDMA, L-Arginin und Homoarginin bei Gesunden gegenüber sowohl therapierten als auch therapienaiven Patienten bessere Werte. Für ADMA ergaben sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den Studiengruppen. Alle vier Biomarker korrelierten mit der NT-proBNP-Plasmakonzentration (und mit weiteren Prognoseparametern). L-Arginin wies als einziger Biomarker einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit Daten der invasiven Hämodynamik auf. ADMA war in der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse signifikant mit dem Überleben assoziiert.

Zusammenfassung

Im Verlauf wurde bei therapienaiven Patienten eine signifikante Verbesserung der L-Arginin- und Homoarginin-Werte nach Therapieeinleitung festgestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl das EndoPat2000-System als auch die kardiovaskulären Biomarker Potential für die Diagnostik der PAH und CTEPH aufwiesen. Vor allem die Reaktionen auf die Therapieeinleitung geben Anlass, weiter und expliziter erforscht zu werden.

6 SUMMARY

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare disease with a poor prognosis. Proliferation, inflammation and especially endothelial dysfunction contribute to increased pulmonary artery pressure, which may result in a right heart failure and finally lead to death. Currently only few (noninvasive) clinical methods of diagnosis, progress evaluation and treatment are available. In this context this research analyzed a noninvasive procedure (measurements with EndoPat2000 system) and four cardiovascular biomarkers (ADMA, SDMA, L-arginine, homoarginine) to determine the endothelial function of patients with PAH and CTEPH. In particular, ADMA as inhibitor of the NO synthase gained wide acceptance as cardiovascular predictor.

Baseline results of the patient group and of a healthy control group were compared and the correlation between endothelial function and prognostic parameters of pulmonary hypertension was analyzed. In addition, in a prospective study design, the therapeutic success (related to the endothelial function) of PAH-specific medication was evaluated. This study was the first to use results of EndoPat2000 in this context.

We were able to show that – as expected – the peripheral endothelial function, determined with EndoPat2000 (measured value “RHI”), of treatment-naïve patients was worse than of healthy controls. The RHI correlated significantly with PH prognostic parameters (six-minute walk distance, NT-proBNP plasma concentration). High RHI values were associated with long survival times (not statistically significant).

The progress evaluation of the impact of PAH-specific medication on the RHI showed significant changes after therapy start for the treatment-naïve patient group, but this could not be substantiated sufficiently with the available amount of data.

The analysis of SDMA, L-arginine and homoarginine yielded better values for healthy patients compared to treatment-naïve and also to treated patients. ADMA-levels were very similar in each study group (no statistically significant differences). All of the four biomarkers correlated with the NT-proBNP plasma level (and other parameters). L-arginine was the only biomarker showing a significant correlation with invasive hemodynamics. The survival analysis (Kaplan-Meier) showed a significant correlation between ADMA and survival.

For treatment-naïve patients a significant improvement of L-arginine and homoarginine values could be observed after therapy start.

In summary, both the EndoPat2000 system and the investigated cardiovascular biomarkers have substantial potential for clinical diagnostics of patients with PAH and CTEPH. Especially the reactions at therapy start give reason to and demand for further investigations.

7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen

- Abb. 1: *Versuchsaufbau der Fingerplethysmographie*
- Abb. 2: *Darstellung der reinen PAT-Signale in der Prä-Okklusionsphase*
- Abb. 3: *Ergebnis der automatischen Analyse durch die EndoPat2000-Software*
- Abb. 4: *Balkendiagramm zur Darstellung der absoluten Häufigkeitsverteilung des Studienkollektivs nach Studiengruppe*
- Abb. 5: *Balkendiagramm zur Darstellung der absoluten Häufigkeiten nach NYHA-Stadium*
- Abb. 6: *Balkendiagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Zeitspanne vom Einschlussdatum zu den Zeitpunkten der Messwiederholungen*
- Abb. 7: *Balkendiagramm zur Darstellung der Anzahl der Patienten zu Zeitpunkten der Messwiederholungen nach Studiengruppe*
- Abb. 8: *Balkendiagramm zur Darstellung der Gehstrecke im Verlauf*
- Abb. 9: *Balkendiagramm zur Darstellung der NT-proBNP-Konzentrationen im Verlauf*
- Abb. 10: *Box-Whisker-Plots zur Darstellung der RHI-Werte je Studiengruppe zum Baseline-Zeitpunkt*
- Abb. 11: *Balkendiagramm zur Darstellung der RHI-Verteilung nach NYHA-Klasse (Studiengruppe 1)*
- Abb. 12: *Balkendiagramm zur Darstellung der RHI-Verteilung nach NYHA-Klasse (Studiengruppe 2)*
- Abb. 13: *Balkendiagramm zur Darstellung der RHI-Verteilung nach NYHA-Klasse (Studiengruppe 3)*
- Abb. 14: *Balkendiagramm zur Darstellung der Gehstrecke nach RHI-Werten*
- Abb. 15: *Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der Gehstrecke zum Baseline-Zeitpunkt (Studiengruppe 1)*
- Abb. 16: *Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der Gehstrecke zum Baseline-Zeitpunkt (Studiengruppe 2)*
- Abb. 17: *Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der Gehstrecke zum Baseline-Zeitpunkt (Studiengruppe 3)*

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 18: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der NT-proBNP-Konzentration zum Baseline-Zeitpunkt (Studiengruppe 1)
- Abb. 19: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der NT-proBNP-Konzentration zum Baseline-Zeitpunkt (Studiengruppe 2)
- Abb. 20: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen RHI und der NT-proBNP-Konzentration zum Baseline-Zeitpunkt (Studiengruppe 3)
- Abb. 21: Balkendiagramm zur Darstellung der RHI-Werte im Verlauf
- Abb. 22: Überlebenszeitkurven bis zur klinischen Verschlechterung der Studiengruppe 2 getrennt nach dem RHI-Wert 1,87 bzw. 1,67
- Abb. 23: Box-Whisker-Plots zur Darstellung der ADMA- und SDMA-Konzentrationen je Studiengruppe zum Baseline-Zeitpunkt
- Abb. 24: Box-Whisker-Plots zur Darstellung der L-Arginin- und Homoargininkonzentrationen je Studiengruppe zum Baseline-Zeitpunkt
- Abb. 25: Balkendiagramm zur Darstellung der SDMA- und L-Arginin-Konzentrationen nach NYHA-Klasse (Studiengruppe 2)
- Abb. 26: Balkendiagramm zur Darstellung der SDMA- und L-Arginin-Konzentrationen nach NYHA-Klasse (Studiengruppen 1&2)
- Abb. 27: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen ADMA und der Gehstrecke zum Baseline-Zeitpunkt
- Abb. 28: Streudiagramm zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen SDMA und der Gehstrecke zum Baseline-Zeitpunkt
- Abb. 29: Balkendiagramm zur Darstellung des Kohlendioxid-Partialdruckes nach supra- bzw. inframedianen L-Arginin-Werten
- Abb. 30: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationsanalysen nach Spearman zwischen ADMA bzw. SDMA bzw. L-Arginin bzw. Homoarginin und der NT-proBNP-Konzentration zum Baseline-Zeitpunkt für das gesamte Patientenkollektiv
- Abb. 31: Balkendiagramme zur Darstellung der Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin im Verlauf
- Abb. 32: Überlebenszeitkurve der Studiengruppen 1&2 getrennt nach der medianen ADMA- Konzentration
- Abb. 33: Überlebenszeitkurven bis zum Eintreten des Clinical Worsening der Studiengruppe 2 getrennt nach der medianen SDMA- Konzentration

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 34: Überlebenszeitkurve der Studiengruppen 1&2 getrennt nach der medianen Homoarginin- Konzentration*
- Abb. 35: Streudiagramme zur Darstellung der Korrelationsanalyse nach Spearman zwischen den L-Arginin- bzw. den ADMA- und SDMA-Konzentrationen und den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt für die Studiengruppe 1 bzw. 2*
- Abb. 36: Balkendiagramm zur Darstellung des RHI nach infra- bzw. supramedialen ADMA- und SDMA-Werten*

Tabellen

Tabelle 1:	<i>Klinische Klassifikation der PH nach Nizza 2013</i>
Tabelle 2:	<i>Weitere Parameter zur Bestimmung von ADMA, SDMA und L-Arginin</i>
Tabelle 3:	<i>Baseline-Charakteristika der Studienpopulation</i>
Tabelle 4:	<i>Hämodynamische Parameter aus der Rechtsherzkatheteruntersuchung</i>
Tabelle 5:	<i>Begleiterkrankungen der Studienpatienten</i>
Tabelle 6:	<i>PAH-spezifische Medikation des Studienkollektivs</i>
Tabelle 7:	<i>Zum Baseline-Zeitpunkt erhobene serologische Werte</i>
Tabelle 8:	<i>Etablierte PH-Prognoseparameter zum Baseline-Zeitpunkt</i>
Tabelle 9:	<i>RHI-Werte zum Baseline-Zeitpunkt nach Studiengruppe und PH-Klasse</i>
Tabelle 10:	<i>Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt</i>
Tabelle 11:	<i>Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt</i>
Tabelle 12:	<i>Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den RHI-Werten zum Baseline-Zeitpunkt</i>
Tabelle 13:	<i>Darstellung während der Studienzeit aufgetretener Ereignisse</i>
Tabelle 14:	<i>Plasmakonzentrationen von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin zum Baseline-Zeitpunkt nach Studiengruppe und PH-Klasse</i>
Tabelle 15:	<i>Angabe der medianen Plasmakonzentrationen (Minimum-Maximum) von ADMA, SDMA, L-Arginin und Homoarginin nach NYHA-Stadium für das gesamte Patientenkollektiv</i>
Tabelle 16:	<i>Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den Biomarkern zum Baseline-Zeitpunkt</i>
Tabelle 17:	<i>Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den Biomarkern zum Baseline-Zeitpunkt</i>
Tabelle 18:	<i>Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman mit den Biomarkern zum Baseline-Zeitpunkt</i>
Tabelle 19:	<i>Darstellung der Monate vom Studieneinschlussdatum bis zum Eintreten einer klinischen Verschlechterung bzw. des Todes</i>

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADC	L-Arginin-Decarboxylase
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGAT	Arginin-Glyzin-Amidino-transferase
AGXT2	Alanin Glyoxylat Aminotransferase 2
AHT	Arterieller Hypertonus
ALK-1	Activin receptor-like kinase 1
BMI	Body Mass Index
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor- 2
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAV1	Caveolin 1
CEC	Zirkulierende Endothelzellen
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHF	Chronische Herzinsuffizienz
CI	Herzindex
COPD	Chronic obstructive lung disease
CRF	Kardiale Risikofaktoren
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
CT-pro-Endothelin	C-terminales pro-Endothelin
CW	Clinical Worsening
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DHCA	Deep hypothermic circulatory arrest
dl	Deziliter
DLCO	Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität
DM	Diabetes mellitus
EDRF	Endothelium-derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ENG	Endoglin
ERA	Endothelinrezeptor-Antagonisten

Abkürzungsverzeichnis

ERS	European Respiratory Society
ESC	European Society of Cardiology
ESI	Elektrosprayionisation
EVB	Erythrozytenverteilungsbreite
FMD	Flussmedierte Vasodilatation
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
Hb	Hämoglobin-Konzentration
HC	Hypercholesterinämie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Hkt	Hämatokrit
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
HR-CT	Hochauflösende Computertomografie
IL-1 /-6	Interleukin-1 /-6
IPAH	Idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie
IQR	Interquartilabstand
i.v.	Intravenös
KHK	Koronare Herzkrankheit
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
kPa	Kilopascal
KCNK3	Kalium-Kanal Subfamilie K Mitglied 3
L	Liter
LC-MS/MS	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie mit Massenspektrometriedkopplung
L-NMMA	Monomethylarginin
LVF	Linksventrikuläre Funktion
m	Meter
m ²	Quadratmeter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol

Abkürzungsverzeichnis

mPAP	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck
MR-proADM	Mid Regional pro-Adrenomedullin
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Massenspektrometer
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NYHA	New York Heart Association
NT-proANP	N-terminales pro atriales natriuretisches Peptid
NT-proBNP	N-terminales pro B-natriuretisches Peptid
O ₂	Sauerstoff
o.g.	oben genannt
p	p-Wert
paCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PAF	Platelet Activating Factor
PAH	Pulmonal arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonal-arterieller Druck
PAT	Peripherer arterieller Tonus
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCH	Pulmonalkapilläre Hämangiomatose
PCWP	Pulmonal-kapillärer Verschlussdruck
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PEA	Pulmonale Endartherektomie
PG	Prostaglandinderivat(e)
pH	pH-Wert
PH	Pulmonale Hypertonie
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PPH	Primäre Pulmonale Hypertonie
PPHN	Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
PVOD	Pulmonale venookklusive Erkrankung
PVR	Pulmonalvaskulärer Widerstand
R	Spearman-Korrelationskoeffizient
RAP	Rechtsatrialer Druck
RHI	Reactive Hyperemia Index
rpm	Umdrehungen pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

RVSP	Right ventricular systolic pressure
s.	Siehe
s.c.	Subkutan
sec	Sekunde
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
sGC	lösliche Guanylatzyklase
Smad9	Mothers against decapentaplegic homolog 9
SvO2	Gemischtvenöse Sättigung
TAPSE	Tricuspid annular plane systolic excursion
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNF	Tumornekrosefaktor
TtCW	Time to Clinical Worsening
TTE	Transthorakale Echokardiografie
u.a.	unter anderem
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHF	Vorhofflimmern
V/P-Szintigrafie	Ventilations-Perfusions-Szintigrafie
WHO	World Health Organization
z.T.	zum Teil
μL	Mikroliter
μmol	Mikromol

9 LITERATURVERZEICHNIS

Zeitschriften:

- Abbasi F, Asagmi T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, Stuehlinger M, Tsao PS (2001) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 88(10):1201-1203.
- Aihara K, Handa T, Nagai S, Tanizawa K, Ikezoe K, Watanabe K, Chihara Y, Harada Y, Yoshimura C, Oga T, Ozasa N, Uno K, Chin K, Mishima M (2013) Impaired endothelium-dependent vasodilator response in patients with pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 107(2):269-275.
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrange D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 26(5):1235–1241.
- Andreassen AK, Wergeland R, Simonsen S, Geiran O, Guevara C, Ueland T (2006) N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as an indicator of disease severity in a heterogeneous group of patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol.* 98(4):525-529.
- Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS (2002) Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 51(7):843–846.
- Atzler D, Schwedhelm E, Choe CU (2015) L-homoarginine and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 18(1):83-88.
- Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Fabbri A, Spera G, Fini M, Rosano GMC (2008) Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association.* 25(1):37–44.
- Ayala JE, Bracy DP, Julien BM, Rottman JN, Fueger PT, Wasserman DH (2007) Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice. *Diabetes.* 56(4):1025–1033.
- Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, Koerner SK, Langleben D, Keller CA, Murali S, Uretsky BF, Clayton LM, Jobsis MM, Blackburn SD, Shortino D, Crow JW (1996) A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 334(5):296-301.
- Beyer J, Kolditz M, Ewert R, Rubens C, Opitz C, Schellong S, Hoeffken G, Halank M (2008) L-arginine plasma levels and severity of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Vasa.* 37(1):61-67.
- Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Heibel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F (2005)

- Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost.* 93(2):228-235.
- Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, Reinecke H (2006) Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol.* 17(4):1128-1134.
- Böger RH (2003) The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res.* 59(4):824–833.
- Böger RH (2006) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med.* 38(2):126–136.
- Böger RH (2007) The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr.* 137(6 Suppl 2):1650s-1655s.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP (1998) Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Novel Risk Factor for Endothelial Dysfunction: Its Role in Hypercholesterolemia. *Circulation.* 98(18):1842–1847.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frolich JC (1997) Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation.* 95(8):2068–2074.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Tsao PS, Lin PS, Chan JR, Cooke JP (2000) An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J Am Coll Cardiol.* 36(7):2287–2295.
- Böger RH, Endres HG, Schwedhelm E, Darius H, Atzler D, Lüneburg N, von Stritzky B, Maas R, Thiem U, Benndorf RA, Diehm C (2011) Asymmetric dimethylarginine as an independent risk marker for mortality in ambulatory patients with peripheral arterial disease. *J Intern Med.* 269(3):349-361.
- Brenner T, Fleming TH, Rosenhagen C, Krauser U, Mieth M, Bruckner T, Martin E, Nawroth PP, Weigand MA, Bierhaus A, Hofer S (2012) L-arginine and asymmetric dimethylarginine are early predictors for survival in septic patients with acute liver failure. *Mediators Inflamm.* 2012:210454.
- Bretscher LE, Li H, Poulos TL, Griffith OW (2003) Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel N5-(iminoalkyl)- and N5-(iminoalkenyl)-ornithines. *J Biol Chem.* 278(47):46789-46797.
- Brouns R, Marescau B, Possemiers I, Sheorajpanday R, De Deyn PP (2009) Dimethylarginine levels in cerebrospinal fluid of hyperacute ischemic stroke patients are associated with stroke severity. *Neurochem Res.* 34(9):1642-1649.
- Brun H, Holmstrøm H, Thaulow E, Damås JK, Yndestad A, Aukrust P, Ueland T (2009) Patients with Pulmonary Hypertension Related to Congenital Systemic-to-Pulmonary Shunts are Characterized by Inflammation Involving Endothelial Cell Activation and Platelet-mediated Inflammation. *Congenit Heart Dis.* 4(3):153-159.
- Bruyndonckx L, Radtke T, Eser P, Vrints CJ, Ramet J, Wilhelm M, Conraads VM (2013) Methodological considerations and practical recommendations for the application

- of peripheral arterial tonometry in children and adolescents. *Int J Cardiol.* 168(4):3183–3190.
- Budhiraja R, Parthasarathy S, Quan SF (2007) Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine.* 3(4):409–415.
- Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM (2004) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation.* 109(2):159–165.
- Bull TM, Golpon H, Hebbel RP, Solovey A, Cool CD, Tuder RM, Geraci MW, Voelkel NF (2003) Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb Haemost.* 90(4):698-703.
- Chen J, Hamm LL, Mohler ER, Hudaihed A, Arora R, Chen CS, Liu Y, Browne G, Mills KT, Kleinpeter MA, Simon EE, Rifai N, Klag MJ, He J (2015) Interrelationship of Multiple Endothelial Dysfunction Biomarkers with Chronic Kidney Disease. *PLoS One.* 10(7):e0132047.
- Choe CU, Atzler D, Wild PS, Carter AM, Boger RH, Ojeda F, Simova O, Stockebrand M, Lackner K, Nabuurs C, Marescau B, Streichert T, Muller C, Luneburg N, De Deyn PP, Benndorf RA, Baldus S, Gerloff C, Blankenberg S, Heerschap A, Grant PJ, Magnus T, Zeller T, Isbrandt D, Schwedhelm E (2013) Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation.* 128(13):1451-1461.
- Ciccone MM, Iacoviello M, Puzzovivo A, Scicchitano P, Monitillo F, De Crescenzo F, Caragnano V, Sassara M, Quistelli G, Guida P, Favale S (2011) Clinical correlates of endothelial function in chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 100(6):515-521.
- Cogan JD, Pauciulo MW, Batchman AP, Prince MA, Robbins IM, Hedges LK, Stanton KC, Wheeler LA, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Nichols WC (2006) High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 174(5):590-598.
- Cooke JP (2000) Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(9):2032-2037.
- Cooke JP (2005) ADMA: its role in vascular disease. *Vascular medicine (London, England).* 10 Suppl 1:S11-17.
- Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF, Tuder RM (1999) Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol.* 155(2):411-419.
- Cracowski JL, Leuchte HH (2012) The potential of biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol.* 110(6 Suppl):32s-38s.
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al. (1991) Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med.* 115(5):343-349.

- Dayoub H, Rodionov RN, Lynch C, Cooke JP, Arning E, Bottiglieri T, Lentz SR, Faraci FM (2008) Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibits asymmetric dimethylarginine-induced endothelial dysfunction in the cerebral circulation. *Stroke*. 39(1):180-184.
- Delles C, Schneider MP, John S, Gekle M, Schmieder RE (2002) Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1-receptor blockade reduce the levels of asymmetrical N(G), N(G)-dimethylarginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens*. 15(7 Pt 1):590–593.
- Dimitroulas T, Giannakoulas G, Sfetsios T, Karvounis H, Dimitroula H, Koliakos G, Settas L (2008) Asymmetrical dimethylarginine in systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology (Oxford)*. 47(11):1682-1685.
- Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M (2003) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 22(2):358-363.
- Eiselt J, Rajdl D, Racek J, Vostry M, Rulcova K, Wirth J (2014) Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: a one-year follow-up study. *Kidney Blood Press Res*. 39(1):50-57.
- El-Sayed M-IK, Amin HA-KA (2015) Mechanism of endothelial cyto-protective and thrombo-resistance effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil in male rabbit. *Archives of medical science : AMS*. 11(1):190–198.
- Enescu O (2010) Is homoarginine level associated with high cardiovascular risk and mortality? *Maedica (Buchar)*. 5(3):227.
- Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP (2006) NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 5(9):755-768.
- Fang Z-F, Huang Y-Y, Tang L, Hu X-Q, Shen X-Q, Tang J-J, Zhou S-H (2015) Asymmetric Dimethyl-L-Arginine is a Biomarker for Disease Stage and Follow-Up of Pulmonary Hypertension Associated with Congenital Heart Disease. *Pediatr Cardiol*.
- Farrero M, Blanco I, Batlle M, Santiago E, Cardona M, Vidal B, Castel MA, Sitges M, Barbera JA, Perez-Villa F (2014) Pulmonary hypertension is related to peripheral endothelial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 7(5):791-798.
- Fauzi AR (2000) Primary pulmonary hypertension. World Health Organization. *Med J Malaysia*. 55(4):529-537; quiz 538.
- Foris V, Kovacs G, Tscherner M, Olschewski A, Olschewski H (2013) Biomarkers in pulmonary hypertension: what do we know? *Chest*. 144(1):274-283.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288(5789):373-376.
- Gabrielli LA, Castro PF, Godoy I, Mellado R, Bourge RC, Alcaïno H, Chiong M, Greig D, Verdejo HE, Navarro M, Lopez R, Toro B, Quiroga C, Díaz-Araya G, Lavandero S, Garcia L (2011) Systemic Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction is

- Associated With an Attenuated Acute Vascular Response to Inhaled Prostanoid in Pulmonary Artery Hypertension Patients. *J Card Fail.* 17(12):1012–1017.
- Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, Oudiz RJ, Simonneau G, Safdar Z, Shapiro S, White RJ, Chan M, Beardsworth A, Frumkin L, Barst RJ (2009a) Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 119(22):2894-2903.
- Galie N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, Klepetko W, McGoon MD, McLaughlin VV, Preston IR, Rubin LJ, Sandoval J, Seeger W, Keogh A (2013) Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62(25 Suppl):D60-72.
- Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G (2005) Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 353(20):2148-2157.
- Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G (2009b) Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J.* 30(20):2493-2537.
- Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M (2015) 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J.* 46(4):903-975.
- Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ (2008a) 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.* 117(23):3010-3019.
- Galie N, Rubin L, Hoeper M, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer G, Chiossi E, Kusic-Pajic A, Simonneau G (2008b) Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 371(9630):2093-2100.
- Ghebremariam YT, Cooke JP, Khan F, Thakker RN, Chang P, Shah NH, Nead KT, Leeper NJ (2015) Proton pump inhibitors and vascular function: A prospective cross-over pilot study. *Vasc Med.* 20(4):309-316.
- Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Simonneau G, Wilkins MR, Fritsch A, Neuser D, Weimann G, Wang C (2013a) Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 369(4):319-329.

- Ghofrani HA, Galie N, Grimminger F, Grunig E, Humbert M, Jing ZC, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ (2013b) Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 369(4):330-340.
- Giannakoulas G, Mouratoglou SA, Gatzoulis MA, Karvounis H (2014) Blood biomarkers and their potential role in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. a systematic review. *Int J Cardiol.* 174(3):618-623.
- Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE (2001) Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 37(4):489–492.
- Grimminger F, Weimann G, Frey R, Voswinckel R, Thamm M, Bolkow D, Weissmann N, Muck W, Unger S, Wensing G, Schermuly RT, Ghofrani HA (2009) First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 33(4):785-792.
- Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ (2008) Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 117(19):2467-2474.
- Hamburg NM, Palmisano J, Larson MG, Sullivan LM, Lehman BT, Vasan RS, Levy D, Mitchell GF, Vita JA, Benjamin EJ (2011) Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: the Framingham heart study. *Hypertension.* 57(3):390-396.
- Hoeper MM, Huscher D, Ghofrani HA, Delcroix M, Distler O, Schweiger C, Grunig E, Staehler G, Rosenkranz S, Halank M, Held M, Grohe C, Lange TJ, Behr J, Klose H, Wilkens H, Filusch A, Germann M, Ewert R, Seyfarth HJ, Olsson KM, Opitz CF, Gaine SP, Vizza CD, Vonk-Noordegraaf A, Kaemmerer H, Gibbs JS, Pittrow D (2013) Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. *Int J Cardiol.* 168(2):871-880.
- Hov GG, Aasarod KI, Sagen E, Asberg A (2015) Arginine, dimethylated arginine and homoarginine in relation to cardiovascular risk in patients with moderate chronic kidney disease. *Clin Biochem.* 48(10-11):646-651.
- Hughes R, Tong J, Oates C, Lordan J, Corris PA (2005) Evidence for systemic endothelial dysfunction in patients and first-order relatives with pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 128(6 Suppl):617s.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 43(12 Suppl S):13s-24s.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier J-F, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G (2006) Pulmonary Arterial Hypertension in France. *Am J Respir Crit Care Med.* 173(9):1023-1030.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jais X, Montani D, Souza

- R, Simonneau G (2010) Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 122(2):156-163.
- Jeffery TK, Morrell NW (2002) Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. 45(3):173-202.
- Jin JS, D'Alecy LG (1995) Stimulation of endogenous nitric oxide pathway by L-arginine reduces declamp mortality and attenuates hypertension associated with aortic cross-clamp-induced hindlimb ischemia in rats. *Hypertension*. 26(3):406-412.
- Juonala M, Viikari JS, Alfthan G, Marniemi J, Kahonen M, Taittonen L, Laitinen T, Raitakari OT (2007) Brachial artery flow-mediated dilation and asymmetrical dimethylarginine in the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation*. 116(12):1367-1373.
- Kayacelebi AA, Langen J, Weigt-Usinger K, Chobanyan-Jurgens K, Mariotti F, Schneider JY, Rothmann S, Frolich JC, Atzler D, Choe CU, Schwedhelm E, Huneau JF, Lucke T, Tsikas D (2015a) Biosynthesis of homoarginine (hArg) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) from acutely and chronically administered free L-arginine in humans. *Amino Acids*.
- Kayacelebi AA, Willers J, Pham VV, Hahn A, Schneider JY, Rothmann S, Frolich JC, Tsikas D (2015b) Plasma homoarginine, arginine, asymmetric dimethylarginine and total homocysteine interrelationships in rheumatoid arthritis, coronary artery disease and peripheral artery occlusion disease. *Amino Acids*.
- Khan SS, Rich JD (2015) Novel Technologies and Devices for Monitoring and Treating Pulmonary Arterial Hypertension. *Can J Cardiol*. 31(4):478–488.
- Kiechl S, Lee T, Santer P, Thompson G, Tsimikas S, Egger G, Holt DW, Willeit J, Xu Q, Mayr M (2009) Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis*. 205(1):261-265.
- Kielstein JT, Bode-Böger SM, Hesse G, Martens-Lobenhoffer J, Takacs A, Fliser D, Hoepfer MM (2005) Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(7):1414–1418.
- Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Böger SM, Cooke JP, Fliser D (2006) Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function--a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 21(9):2446-2451.
- Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, Channick R, Darteville P, Jansa P, Lang I, Madani MM, Ogino H, Pengo V, Mayer E (2013) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 62(25 Suppl):D92-99.
- Kurzyna M, Dabrowski M, Bielecki D, Fijalkowska A, Pruszczyk P, Opolski G, Burakowski J, Florczyk M, Tomkowski WZ, Wawrzynska L, Szturmowicz M, Torbicki A (2007) Atrial septostomy in treatment of end-stage right heart failure in patients with pulmonary hypertension. *Chest*. 131(4):977-983.
- Lerman A, Zeiher AM (2005) Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. 111(3):363–368.

- Lind L, Larsson A, Teerlink T (2009) L-Arginine is related to endothelium-dependent vasodilation in resistance and conduit arteries in divergent ways-The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Atherosclerosis*. 203(2):544-549.
- Loscalzo J (1992) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 327(2):117-119.
- Lüneburg N, Harbaum L, Hennigs JK (2014a) The endothelial ADMA/NO pathway in hypoxia-related chronic respiratory diseases. *Biomed Res Int*. 2014:501612.
- Lüneburg N, Lieb W, Zeller T, Chen MH, Maas R, Carter AM, Xanthakis V, Glazer NL, Schwedhelm E, Seshadri S, Ikram MA, Longstreth WT, Jr., Fornage M, König IR, Loley C, Ojeda FM, Schillert A, Wang TJ, Sticht H, Kittel A, König J, Benjamin EJ, Sullivan LM, Bernges I, Anderssohn M, Ziegler A, Gieger C, Illig T, Meisinger C, Wichmann HE, Wild PS, Schunkert H, Psaty BM, Wiggins KL, Heckbert SR, Smith N, Lackner K, Lunetta KL, Blankenberg S, Erdmann J, Munzel T, Grant PJ, Vasan RS, Boger RH (2014b) Genome-wide association study of L-arginine and dimethylarginines reveals novel metabolic pathway for symmetric dimethylarginine. *Circ Cardiovasc Genet*. 7(6):864-872.
- Lüneburg N, von Holtzen RA, Topper RF, Schwedhelm E, Maas R, Boger RH (2012) Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function. *Clin Sci (Lond)*. 122(3):105-111.
- MacAllister RJ, Rambašek MH, Vallance P, Williams D, Hoffmann KH, Ritz E (1996) Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 11(12):2449-2452.
- Mangoni AA (2009) The emerging role of symmetric dimethylarginine in vascular disease. *Adv Clin Chem*. 48:73–94.
- März W, Meinitzer A, Drechsler C, Pilz S, Krane V, Kleber ME, Fischer J, Winkelmann BR, Böhm BO, Ritz E, Wanner C (2010) Homoarginine, Cardiovascular Risk, and Mortality. *Circulation*. 122(10):967-975.
- Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sumida H, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Matsubara J, Kurokawa H, Fujisue K, Konishi M, Akiyama E, Suzuki H, Nagayoshi Y, Yamamuro M, Sakamoto K, Iwashita S, Jinnouchi H, Taguri M, Morita S, Matsui K, Kimura K, Umemura S, Ogawa H (2013) Peripheral endothelial function and cardiovascular events in high-risk patients. *J Am Heart Assoc*. 2(6):e000426.
- McLaughlin VV, McGoon MD (2006) Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 114(13):1417-1431.
- Meinitzer A, Kielstein JT, Pilz S, Drechsler C, Ritz E, Boehm BO, Winkelmann BR, März W (2011) Symmetrical and Asymmetrical Dimethylarginine as Predictors for Mortality in Patients Referred for Coronary Angiography: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Clin Chem*. 57(1):112-121.
- Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Roob JM, Sundl I, Halwachs-Baumann G, März W (2007) Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 384(1-2):141–148.

- Memon L, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Kotur-Stevuljevic J, Simic-Ogrizovic S, Giga V, Dopsaj V, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S (2013) Assessment of endothelial dysfunction: the role of symmetrical dimethylarginine and proinflammatory markers in chronic kidney disease and renal transplant recipients. *Dis Markers*. 35(3):173-180.
- Meyer B, Mortl D, Strecker K, Hulsmann M, Kulemann V, Neunteufl T, Pacher R, Berger R (2005) Flow-mediated vasodilation predicts outcome in patients with chronic heart failure: comparison with B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol*. 46(6):1011-1018.
- Michel T, Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 100(9):2146-2152.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T (1999) Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 99(9):1141-1146.
- Moali C, Boucher J-L, Sari M-A, Stuehr DJ, Mansuy D (1998) Substrate Specificity of NO Synthases: Detailed Comparison of L-Arginine, Homo-L-arginine, Their N ω -Hydroxy Derivatives, and N ω -Hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry*. 37(29):10453-10460.
- Mocumbi AO, Thienemann F, Sliwa K (2015) A global perspective on the epidemiology of pulmonary hypertension. *Can J Cardiol*. 31(4):375-381.
- Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*. 329(27):2002–2012.
- Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr., Gladwin MT (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*. 294(1):81-90.
- Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Kakishita M, Fukushima K, Okano Y, Nakanishi N, Miyatake K, Kangawa K (2000) Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 102(8):865-870.
- Nicholls SJ, Wang Z, Koeth R, Levison B, DeFraino B, Dzavik V, Griffith OW, Hathaway D, Panza JA, Nissen SE, Hochman JS, Hazen SL (2007) Metabolic profiling of arginine and nitric oxide pathways predicts hemodynamic abnormalities and mortality in patients with cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Circulation*. 116(20):2315-2324.
- Ogata H, Takahashi T, Ishikawa K, Ishibashi T, Maruyama Y, Watanabe M, Edo K (2010) Effects of oral supplementation of L-arginine in the treatment of pulmonary hypertension secondary to pulmonary embolism: a case report. *Fukushima J Med Sci*. 56(2):135-138.
- Ohnishi M, Wada A, Tsutamoto T, Fujii M, Matsumoto T, Yamamoto T, Takayama T, Wang X, Kinoshita M (2002) Endothelin stimulates an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine, in experimental heart failure. *Clin Sci (Lond)*. 103 Suppl 48:241s-244s.

- Ou ZJ, Wei W, Huang DD, Luo W, Luo D, Wang ZP, Zhang X, Ou JS (2010) L-arginine restores endothelial nitric oxide synthase-coupled activity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(6):E1131-1139.
- Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 153(3):1251–1256.
- Pauriah M, Khan F, Lim TK, Elder DH, Godfrey V, Kennedy G, Belch JJ, Booth NA, Struthers AD, Lang CC (2012) B-type natriuretic peptide is an independent predictor of endothelial function in man. *Clin Sci (Lond).* 123(5):307-312.
- Peled N, Bendayan D, Shitrit D, Fox B, Yehoshua L, Kramer MR (2008) Peripheral endothelial dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 102(12):1791-1796.
- Peled N, Shitrit D, Fox BD, Shlomi D, Amital A, Bendayan D, Kramer MR (2009) Peripheral arterial stiffness and endothelial dysfunction in idiopathic and scleroderma associated pulmonary arterial hypertension. *J Rheumatol.* 36(5):970-975.
- Pengo V, Lensing AW, Prins MH, Marchiori A, Davidson BL, Tiozzo F, Albanese P, Biasiolo A, Pegoraro C, Iliceto S, Prandoni P (2004) Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med.* 350(22):2257-2264.
- Pezzuto B, Badagliacca R, Poscia R, Ghio S, D'Alto M, Vitulo P, Mule M, Albera C, Volterrani M, Fedele F, Vizza CD (2015) Circulating biomarkers in pulmonary arterial hypertension: Update and future direction. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation.* 34(3):282–305.
- Piatti P, Fragasso G, Monti LD, Setola E, Lucotti P, Fermo I, Paroni R, Galluccio E, Pozza G, Chierchia S, Margonato A (2003) Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms: correlation with asymmetric dimethylarginine levels. *Circulation.* 107(3):429-436.
- Pilz S, Meinitzer A, Gaksch M, Grübler M, Verheyen N, Drechsler C, Hartaigh B, Lang F, Alesutan I, Voelkl J, März W, Tomaschitz A (2015) Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. *Amino Acids.* 1-11.
- Pilz S, Meinitzer A, Tomaschitz A, Drechsler C, Ritz E, Krane V, Wanner C, Boehm BO, März W (2011) Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart.* 97(15):1222-1227.
- Popolo A, Adesso S, Pinto A, Autore G, Marzocco S (2014) L-Arginine and its metabolites in kidney and cardiovascular disease. *Amino Acids.* 46(10):2271-2286.
- Poste G (2011) Bring on the biomarkers. *Nature.* 469(7329):156–157.
- Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, Jansa P, Jing ZC, Le Brun FO, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BK, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G (2013) Macitentan and

- morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 369(9):809-818.
- Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinckel R, Haredza P, Klepetko W, Aigner C, Fink L, Muyal JP, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT (2005) Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 19(9):1175–1177.
- Rose-Jones LJ, McLaughlin VV (2015) Pulmonary hypertension: types and treatments. *Curr Cardiol Rev.* 11(1):73-79.
- Rosenkranz S (2014) Cor pulmonale and pulmonary hypertension. Update after the world conference in Nice. *Herz.* 39(1):58-65.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 346(12):896-903.
- Sasaki S, Asano M, Ukai T, Nomura N, Maruyama K, Manabe T, Mishima A (2004) Nitric oxide formation and plasma L-arginine levels in pulmonary hypertensive rats. *Respir Med.* 98(3):205-212.
- Schnabel RB, Schulz A, Wild PS, Sinning CR, Wilde S, Eleftheriadis M, Herkenhoff S, Zeller T, Lubos E, Lackner KJ, Warnholtz A, Gori T, Blankenberg S, Munzel T (2011) Noninvasive vascular function measurement in the community: cross-sectional relations and comparison of methods. *Circ Cardiovasc Imaging.* 4(4):371-380.
- Schnabel RB, Wild PS, Schulz A, Zeller T, Sinning CR, Wilde S, Kunde J, Lubos E, Lackner KJ, Warnholtz A, Gori T, Blankenberg S, Munzel T (2012) Multiple endothelial biomarkers and noninvasive vascular function in the general population: the Gutenberg Health Study. *Hypertension.* 60(2):288-295.
- Schwedhelm E, Maas R, Tan-Andresen J, Schulze F, Riederer U, Böger RH (2007) High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 851(1-2):211–219.
- Sessa WC (1994) The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res.* 31(3):131-143.
- Shechter M, Shechter A, Koren-Morag N, Feinberg MS, Hiersch L (2014) Usefulness of brachial artery flow-mediated dilation to predict long-term cardiovascular events in subjects without heart disease. *Am J Cardiol.* 113(1):162-167.
- Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH (2010) The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rev.* 6(2):82–90.
- Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R (2013) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 62(25 Suppl):D34-41.

- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54(1 Suppl):S43-54.
- Sitbon O, Humbert M, Nunes H, Parent F, Garcia G, Herve P, Rainisio M, Simonneau G (2002) Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol.* 40(4):780–788.
- Skoro-Sajer N, Mittermayer F, Panzenboeck A, Bonderman D, Sadushi R, Hitsch R, Jakowitsch J, Klepetko W, Kneussl MP, Wolzt M, Lang IM (2007) Asymmetric dimethylarginine is increased in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 176(11):1154–1160.
- Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, Tsao PS (2002) Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA.* 287(11):1420–1426.
- Stühlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP (2003) Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 108(8):933–938.
- Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC (1999) Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 33(4):652-658.
- Tran CT, Leiper JM, Vallance P (2003) The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl.* 4(4):33-40.
- Tsikas D, Kayacelebi AA (2014) Do homoarginine and asymmetric dimethylarginine act antagonistically in the cardiovascular system? *Circ J.* 78(8):2094-2095.
- Tutarel O, Denecke A, Bode-Boger SM, Martens-Lobenhoffer J, Lovric S, Bauersachs J, Schieffer B, Westhoff-Bleck M, Kielstein JT (2012) Asymmetrical dimethylarginine--more sensitive than NT-proBNP to diagnose heart failure in adults with congenital heart disease. *PLoS One.* 7(3):e33795.
- Ungvari Z, Kaley G, Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A (2010) Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences.* 65(10):1028–1041.
- Vallance P, Leiper J (2004) Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(6):1023–1030.
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 339(8793):572–575.
- Valtonen P, Laitinen T, Lyyra-Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Viikari JS, Heiskanen N, Vanninen E, Punnonen K, Heinonen S (2008) Serum L-homoarginine

concentration is elevated during normal pregnancy and is related to flow-mediated vasodilatation. *Circ J.* 72(11):1879-1884.

van der Zwan LP, Davids M, Scheffer PG, Dekker JM, Stehouwer CD, Teerlink T (2013) L-Homoarginine and L-arginine are antagonistically related to blood pressure in an elderly population: the Hoorn study. *J Hypertens.* 31(6):1114-1123.

Veyradier A, Nishikubo T, Humbert M, Wolf M, Sitbon O, Simonneau G, Girma JP, Meyer D (2000) Improvement of von Willebrand factor proteolysis after prostacyclin infusion in severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 102(20):2460-2462.

Vogl L, Pohlhammer J, Meinitzer A, Rantner B, Stadler M, Peric S, Hammerer-Lercher A, Klein-Weigel P, Fraedrich G, Kronenberg F, Kollerits B (2015) Serum concentrations of L-arginine and L-homoarginine in male patients with intermittent claudication: a cross-sectional and prospective investigation in the CAVASIC Study. *Atherosclerosis.* 239(2):607-614.

Wilson Tang WH, Tong W, Shrestha K, Wang Z, Levison BS, Delfraino B, Hu B, Troughton RW, Klein AL, Hazen SL (2008) Differential effects of arginine methylation on diastolic dysfunction and disease progression in patients with chronic systolic heart failure. *Eur Heart J.* 29(20):2506-2513.

Wolff B, Lodziewski S, Bollmann T, Opitz CF, Ewert R (2007) Impaired peripheral endothelial function in severe idiopathic pulmonary hypertension correlates with the pulmonary vascular response to inhaled iloprost. *Am Heart J.* 153(6):1088.e1081–1088.e1087.

Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y (2009) Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.* 37(1):153-168.

Xu Y, Arora RC, Hiebert BM, Lerner B, Sz wajcer A, McDonald K, Rigatto C, Komenda P, Sood MM, Tangri N (2014) Non-invasive endothelial function testing and the risk of adverse outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 15(7):736–746.

Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, Qureshi AR, Carrero JJ, Caglar K, Eyileten T, Cakir E, Oguz Y, Vural A, Yenicesu M, Lindholm B, Stenvinkel P, Axelsson J (2008) ADMA levels correlate with proteinuria, secondary amyloidosis, and endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 19(2):388-395.

Yinon D, Lowenstein L, Suraya S, Beloosesky R, Zmora O, Malhotra A, Pillar G (2006) Pre-eclampsia is associated with sleep-disordered breathing and endothelial dysfunction. *Eur Respir J.* 27(2):328-333.

Monografien:

Olschewski H, Seeger W (2002) *Pulmonary Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, treatment, and development of a pulmonary-selective therapy*, 1. Auflage, UNI-MED SCIENCE, Bremen.

Weiß C (2013) *Basiswissen Medizinische Statistik*, 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin.

Internetquellen:

Itamar Medical Ltd. (o.J. b) EndoPAT - Common questions. Caesarea, Israel [Online im Internet.] URL: <http://www.itamar-medical.com/EndoPAT%E2%84%A2/FAQ> [Stand: 23.07.2015].

Handbücher:

Itamar Medical Ltd. (o.J. a) EndoPat2000 User Manual – Software Version 3.2.4., Caesarea, Israel.

10 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer (Klinikdirektor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) für die Möglichkeit danken, dass ich diese Arbeit durchführen konnte.

Herrn Dr. med. Hans Klose danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Pulmonale Hypertonie, für die Übertragung der Studie, für die organisatorische und fachliche Unterstützung und nicht zuletzt für das Korrekturlesen und für die wertvollen Anregungen.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. med. Lars Harbaum danken für sein stetiges Engagement und für seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Studie. Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Dr. rer. nat. Nicole Lüneburg für die Korrekturen, ihren fachkundigen Rat bei statischen Fragestellungen und für ihre Hilfe bei der Organisation während des Untersuchungszeitraums.

Herzlichen Dank an beide für zahlreiche Treffen, die mir sehr halfen, meine Arbeit strukturiert voranzubringen.

Ein großes „Danke“ geht an die Mitarbeiter der Pneumologischen Ambulanz und Station, vor allem an die Studienkoordinatorinnen Frau Anja Paulsen und Frau Ute Dickschas, die mir bei der praktischen Durchführung der Studie stets zur Seite standen.

Ebenfalls unentbehrlich war die Unterstützung im Labor des Instituts für klinische Pharmakologie und Toxikologie, vor allem von Frau Anna Steenpaß und Frau Mariola Kastner.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei allen Patienten und freiwilligen Probanden, ohne die diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

11 LEBENSLAUF

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: