

Aus der Klinik für Innere Medizin V
Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

Mutationen des Gerinnungssystems bei Patienten mit pulmonal arterieller Hypertonie und chronisch thrombembolischer pulmonaler Hypertonie

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

2022

vorgelegt von

Jana Melina Detzler

Geboren am 23.08.1990 in Saarlouis

Tag der Promotion: 07.11.2022
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. med. Heinrike Wilkens
Prof. Dr. med. Hermann Eichler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung.....	7
<i>1.1 Einleitung und Fragestellung.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2 Patienten und Methodik</i>	<i>8</i>
<i>1.3 Ergebnisse</i>	<i>9</i>
<i>1.4 Schlussfolgerung</i>	<i>10</i>
<i>1.5 Summary</i>	<i>11</i>
<i>1.6 Patients and methods.....</i>	<i>12</i>
<i>1.7 Results</i>	<i>13</i>
<i>1.8 Conclusion.....</i>	<i>14</i>
2 Einleitung.....	16
<i>2.1 Pulmonale Hypertonie.....</i>	<i>16</i>
2.1.1 Allgemeines	16
2.1.2 Einteilung.....	17
2.1.3 Diagnostik	21
<i>2.2 Pulmonal arterielle Hypertonie</i>	<i>22</i>
2.2.1 Allgemeines	22
2.2.2 Pathomechanismus	23
2.2.3 Therapie und Prognose.....	24
<i>2.3 Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie</i>	<i>26</i>
2.3.1 Allgemeines	26
2.3.2 Pathomechanismus	26
2.3.3 Therapie und Prognose.....	27
<i>2.4 Thrombophilie.....</i>	<i>29</i>
<i>2.5 Faktor-V-Leiden.....</i>	<i>31</i>
<i>2.6 Prothrombin G2010A</i>	<i>33</i>
<i>2.7 Methylentetrahydrofolatreduktase C677T und A1298C.....</i>	<i>35</i>
<i>2.8 PAI 4G/5G.....</i>	<i>38</i>
<i>2.9 Fragestellung.....</i>	<i>39</i>
3 Patienten und Methodik.....	41
<i>3.1 Patienten.....</i>	<i>41</i>
3.1.1 Zusammensetzung der Studienpopulation	41
3.1.2 Einteilung.....	41
<i>3.2 Diagnostik</i>	<i>42</i>
3.2.1 DNS-Extraktion	42
3.2.2 Real Time PCR.....	43
3.2.3 Pyrosequenzierung mittels Pyromark Q96.....	49
3.2.4 Schmelzkurvenanalyse	55

3.2.5	Geräte und Materialien	59
3.2.6	Rechtsherzkatheter	60
3.2.7	Einteilung nach Operabilität	62
3.2.8	Echokardiographie	63
3.2.9	6-Minuten-Gehstrecke, WHO-FC und Lungenfunktion	64
3.2.10	Verlaufsuntersuchung	65
3.2.11	NT-pro BNP, Kreatinin und Gamma-GT	65
3.2.12	Klinische Daten der Patienten aus Amsterdam	66
3.2.13	Statistische Auswertung	66
4	Ergebnisse	67
4.1	<i>Allgemeines und Studienpopulation</i>	67
4.2	<i>Deskriptive Statistik der Gruppen</i>	68
4.2.1	Zusammensetzung der PAH-Patienten aus Amsterdam und Homburg	71
4.3	<i>Vergleich der Mutationen zwischen PAH und CTEPH</i>	72
4.3.1	MTHFR C677T, MTHFR A1298C und Compound-Heterozygotie	72
4.3.2	Unterschiede von MTHFR C677T, MTHFR A1298 C und der Compound-Heterozygotie unter den Zentren	75
4.3.3	FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G	78
4.3.4	Unterschiede von FVL, Prothrombin G2010A und PAI-1 4G/5G unter den Zentren	82
4.4	<i>Unterschiede der Patienten mit PAH unter den Zentren</i>	84
4.4.1	MTHFR C677T, MTHFR A1298C und Compound-MTHFR bei Patienten mit PAH	84
4.4.2	FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G bei Patienten mit PAH	87
4.4.3	Zusammenfassung der Unterschiede der Mutationen zwischen Patienten aus Homburg und aus Amsterdam	90
4.5	<i>Einfluss der Polymorphismen auf die Letalität bei CTEPH</i>	92
4.5.1	Einfluss von MTHFR C677T, A1298C und der Compound-Heterozygotie ...	92
4.5.2	Einfluss von FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G	95
4.6	<i>Einfluss der Polymorphismen auf die Letalität bei PAH</i>	98
4.6.1	Einfluss von MTHFR C677T, MTHFR A1298C und Compound-Heterozygotie	98
4.6.2	Einfluss von Prothrombin G2010A, FVL und PAI-1 4G/5G	100
4.7	<i>Vergleich der Mutationshäufigkeit zwischen CTEPH-Patienten mit peripherer und zentraler Verteilung der Gefäßläsionen</i>	103
5	Diskussion	109
5.1	<i>Epidemiologie der Mutationen innerhalb Europas</i>	109
5.1.1	MTHFR C677T und A1298C	109
5.1.2	Faktor-V-Leiden	114
5.1.3	Prothrombin G2010A	115
5.1.4	PAI 4G/5G	116
5.2	<i>Unterschiede der Mutationen zwischen PAH und CTEPH</i>	117
5.2.1	MTHFR A1298C, C677T und Compound-Heterozygotie	117
5.2.2	Faktor-V-Leiden	122
5.2.3	Das Faktor-V-Leiden-Paradox	125
5.2.4	Prothrombin	129

5.2.5 PAI 4G/5G.....	133
5.3 Einfluss der Mutationen auf die Letalität.....	137
5.4 Einfluss auf den Verteilungstyp der Gefäßveränderungen bei Patienten mit CTEPH	141
5.5 Schlusswort.....	147
6 Tabellenverzeichnis	148
7 Abbildungsverzeichnis	150
8 Abkürzungsverzeichnis	152
9 Literaturverzeichnis.....	154
10 Danksagung	167
11 Lebenslauf.....	168

1 Zusammenfassung

1.1 Einleitung und Fragestellung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine progressive Erkrankung, bei der es bedingt durch verschiedene Pathomechanismen zu einer Steigerung des Druckes im pulmonalen Kreislauf kommt.

Insgesamt leidet etwa 1% der Weltbevölkerung an einer PH. In den westlichen Ländern stellen Linksherzerkrankungen die häufigste Ursache dar. In Afrika südlich der Sahara und anderen Endemiegebieten der Schistosomiasis ist diese die häufigste Ursache.

Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) und die chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) stellen mit einer Inzidenz von jeweils etwa 1-4 pro eine Million Einwohner sehr seltene Unterformen dieser Erkrankung dar, deren Pathomechanismen bis heute noch nicht abschließend verstanden sind. Die PH führt zu einer Reihe von Umbaumechanismen der Lungengefäße, die schließlich zu einem Circulus vitiosus führen.

Klinisch ist die Symptomatik besonders zu Beginn unspezifisch. Belastungsdyspnoe, rezidivierende Synkopen, thorakale Schmerzen oder allgemeine Leistungsminderung werden häufigeren Erkrankungen zugeschrieben.

Die Prognose der PH ist unbehandelt sehr schlecht und trotz vieler neuer Verbesserungen der Therapie in den letzten Jahren bleibt sie in den meisten Fällen nicht heilbar.

Die Aktivierung des Gerinnungssystems hat eine besondere pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung der Erkrankung. Bei der PAH finden sich im Rahmen der vaskulären Umbauvorgänge häufig kleinere Thrombosen und Gefäßokklusionen der kleinen Lungengefäße. Bei der CTEPH sind Thrombosen und rezidivierende Lungenembolien der Auslöser der Erkrankung.

Die Faktor-V-Leiden und die Prothrombinmutation G2010A stellen die häufigsten genetischen Risikofaktoren einer Thrombembolie in Deutschland dar. Die PAI-1 4G/5G-Mutation, die MTHFR C677T-Mutation ebenso wie die MTHFR A1298C-Mutation stellen sehr weit verbreitete Polymorphismen dar, die besonders beim Vorliegen weiterer Risikofaktoren mit einem vermehrten Auftreten von Thrombembolien assoziiert sind.

Während für andere bekannte Auslöser von Thrombembolien wie das Antiphospholipidsyndrom eine erhöhte Prävalenz unter Patienten mit einer PAH oder CTEPH nachgewiesen wurde, deutet die bisherige Studienlage für die Faktor-V-Leiden- und die Prothrombinmutation G2010A darauf hin, dass sie keinen Risikofaktor einer PH darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit gängiger hereditärer Risikofaktoren von Thrombembolien unter Patienten mit einer CTEPH und Patienten mit einer PAH in einer Studie mit einer möglichst großen Fallzahl zu untersuchen.

Untersucht wurde hierbei das Vorliegen der Faktor-V-Leiden-Mutation, der Prothrombinmutation G2010A, der MTHFR C677T- und A1298C-Mutation sowie des PAI-1 4G/5G-Polymorphismus.

1.2 Patienten und Methodik

Die Patientenpopulation setzt sich aus drei Untergruppen zusammen. Die erste Untergruppe besteht aus Patienten mit einer PAH, die im UMC Amsterdam angebunden und betreut sind und Blutproben zu genetischen Tests zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt haben. Wir erhielten 82 DNS Proben zur weiteren Analyse. Die zweite Gruppe sind Patienten, die im Universitätsklinikum des Saarlandes in der PH-Ambulanz betreut werden. Hierunter finden sich alle Formen einer PH, wobei die häufigsten Formen die PAH und die PH bei Lungenerkrankungen darstellen. Die Proben dieser Gruppe wurden zwischen 2009 und 2012 gesammelt und asserviert.

Die dritte Gruppe besteht aus Patienten, die in der Pneumologie des Universitätsklinikums des Saarlandes stationär zur Abklärung einer PH aufgenommen wurden und in diesem Rahmen routinemäßig ein Thrombophiliescreening erhalten haben. Hierbei handelt es sich überwiegend um Patienten mit einer nachgewiesenen CTEPH oder Patienten, bei denen initial der Verdacht einer CTEPH bestand. Untersucht wurden hierbei die Faktor-V-Leiden-Mutation, die Prothrombinmutation G20210A, die PAI-1 4G/5G-Mutation sowie die MTHFR C677T- und A1298C-Mutation.

Die Ergebnisse des Screenings der Patienten aus Gruppe drei wurden zwischen 2012 und 2017 gesammelt, zusätzlich wurden die Proben aus Gruppe eins und zwei auf die gleichen Mutationen untersucht. Hierzu wurde nach Extraktion der DNS aus Vollblut eine Pyrosequenzierung der Mutationen durchgeführt. Bei den Patienten der Gruppe 3 wurde die Faktor-V-Leiden-, die PAI-1 4G/5G- und die Prothrombinmutation mittels Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen.

Insgesamt wurden 593 Patienten in die Studie eingeschlossen. Zusätzlich zur Genetik wurden klinische Daten der Patienten erhoben sowie eine Verlaufskontrolle zur Ermittlung der Letalität durchgeführt. Die Verlaufskontrolle erfolgte 2015 und für die später eingeschlossenen Patienten 2017/18.

Die insgesamt 593 Patienten wurden nach der Nizza-Klassifikation von 2013 gruppiert. Die beiden häufigsten Formen stellen hierbei Patienten mit einer PAH mit insgesamt 152 Patienten und mit einer CTEPH mit 234 Patienten dar.

1.3 Ergebnisse

Bei den PAH-Patienten fanden sich etwa zwei Drittel weibliche Patienten, während unter den CTEPH-Patienten eine gleichmäßige Verteilung zwischen beiden Geschlechtern vorlag. Insgesamt wiesen die meisten Patienten aus beiden Gruppen eine ausgeprägte Symptomatik entsprechend Klasse 3-4 der funktionellen Klassen der WHO auf. Die mittleren pulmonal arteriellen Drücke der Patienten mit PAH waren im Mittel um etwa 9 mmHg höher als unter den Patienten mit einer CTEPH.

Vergleicht man die Patienten mit PAH und CTEPH bezüglich des Vorliegens der Mutationen, finden sich unter der Gruppe mit CTEPH mehr Patienten mit einer Faktor-V-Leiden-Mutation (10,53%) und Prothrombinmutation (8,3%) als unter den Patienten mit einer PAH (Faktor-V-Leiden 3,95% und Prothrombinmutation 2,63%). Die Verteilung der PAI-1 4G/5G-Mutation sowie der MTHFR-Mutationen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen PAH- und CTEPH-Patienten. Beim Vergleich der Proben nach ihrer Herkunft, aufgeteilt in Proben aus Amsterdam, Homburger Routinediagnostik und Homburger PH-Ambulanz, fanden sich Unterschiede der genetischen Profile.

Die Prothrombin- und die Faktor-V-Leiden-Mutationen waren unter den beiden aus Homburg stammenden Patientengruppen deutlich häufiger als unter den Patienten aus Amsterdam. Die heterozygote Faktor-V-Leiden-Mutation lag mit 14,29% bei den routinemäßig untersuchten Patienten über dem Anteil der Patienten der Ambulanz (2,78%) und den Patienten aus Amsterdam (0%). Eine ähnliche Verteilung zeigte sich auch beim Prothrombin, hier waren 8,57% der Routinepatienten heterozygote Mutationsträger, während sich in Amsterdam 1,23% heterozygote Mutationsträger und unter den Patienten der PH-Ambulanz keine Mutationsträger fanden. Der Anteil an Mutationsträgern der MTHFR A1298C- und C677T-Mutationen war unter den Proben aus Amsterdam geringer als unter den Proben aus Homburg.

Es wurde eine Verlaufsuntersuchung zu zwei festen Zeitpunkten durchgeführt. Diese erfolgten je nach Einschluss in die Studie nach 1-5 Jahren. Hierbei waren 6,84% (16 von 234) der CTEPH-Patienten verstorben, unter den Patienten mit einer PAH lag der Anteil mit 28,95% (44 von 152) deutlich höher. Die homozygote MTHFR A1298C-Mutation zeigte sich häufiger unter den verstorbenen CTEPH-Patienten. Ansonsten bestand unter den PAH- und

den CTEPH-Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenden und den Verstorbenen.

Bei den CTEPH-Patienten wurde die Erkrankung bei 153 Patienten als operabel eingestuft, während bei 81 Patienten ein zu peripheres Verteilungsmuster vorlag, sodass eine pulmonale Thrombendarteriektomie nicht möglich war.

Patienten mit einem peripheren und einem zentralen Verteilungsmuster wiesen keine Unterschiede der genetischen Profile auf.

1.4 Schlussfolgerung

Die Studie zeigte eine gleiche Verteilung der MTHFR C677T- und A1298C-Mutationen sowie der PAI-1 4G/5G-Mutation zwischen PAH und CTEPH. Die Häufigkeit der drei Mutationen entspricht in der vorliegenden Arbeit außerdem den Werten, die sich in großen Studien in einer gesunden Bevölkerung finden.

Die Faktor-V-Leiden- und die Prothrombinmutation dagegen lagen bei Patienten mit einer CTEPH häufiger vor als bei Patienten mit einer PAH. Der Unterschied zeigte sich signifikant. (Faktor-V-Leiden: 3,95% heterozygot unter PAH und unter CTEPH 10,53% heterozygot sowie 0,44% homozygot, $p=0,046$; Prothrombin 2,63% heterozygot unter PAH und 8,3% unter CTEPH, $p=0,027$)

Die Prävalenz der Faktor-V-Leiden- und der Prothrombinmutation ist in Deutschland etwas höher als in den Niederlanden. Da viele PAH-Patienten aus den Niederlanden und alle CTEPH-Patienten aus Deutschland stammen, sind die unterschiedlichen Prävalenzen zwischen PAH und CTEPH teilweise durch die unterschiedliche Probenherkunft zu erklären. Die Häufigkeit beider Mutationen lag allerdings auch über den Referenzwerten innerhalb Deutschlands. Besonders für die Prothrombinmutation scheint ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer CTEPH vorzuliegen. Unter den CTEPH-Patienten fanden sich 8,3% Mutationsträger, der Wert liegt etwa 4-mal höher als der Referenzwert, der innerhalb einer gesunden Kohorte in Deutschland zu erwarten wäre ($\approx 2\%$).

Die Faktor-V-Leiden-Mutation fand sich etwas häufiger unter Patienten mit einer CTEPH als unter PAH-Patienten. Der Wert lag leicht über den Werten, die in der Literatur in einer gesunden Referenzgruppe beschrieben sind, allerdings deutlich unter den Werten, die sich für Patienten nach Thrombembolien finden.

Betrachtet man nur isolierte Lungenembolien und keine Thrombosen, findet sich die Faktor-V-Leiden-Mutation bei etwa 9% der Patienten nach Lungenembolie in der Literatur, was dem von uns gefundenen Wert unter CTEPH-Patienten entspricht.

Sowohl unter CTEPH-Patienten als auch unter den PAH-Patienten fanden sich 23% Mutationsträger, die gleichzeitig für MTHFR C677T und A1298C heterozygot sind. Der Wert entspricht den Referenzwerten, die in der Literatur für gesunde Kontrollgruppen angegeben werden.

Der Anteil an homozygoten Mutationsträgern der MTHFR A1298C- und C677T-Mutation war unter den Proben aus Amsterdam deutlich geringer als unter den Patienten aus Homburg. Da regionale Unterschiede diese Differenz nicht erklären, könnte das Ergebnis auf einen geringeren Anteil an MTHFR-Mutationen unter Patienten mit einer idiopathischen und hereditären PAH hindeuten.

Unter den Patienten mit einer PAH fand sich eine deutlich höhere Sterblichkeit als unter den Patienten mit einer CTEPH.

Die Häufigkeit der Mutationen unterschied sich unter überlebenden und verstorbenen CTEPH Patienten nicht signifikant. Unter den überlebenden und verstorbenen CTEPH-Patienten fand sich lediglich für die MTHFR A1298C-Mutation ein signifikanter Unterschied ($p=0,036$). Unter den Verstorbenen lagen mehr Mutationsträger vor als unter den Überlebenden, allerdings handelte es sich bei den Verstorbenen um eine kleine Untergruppe ($N=16$).

Bei 34,62% der Patienten mit einer CTEPH lag ein zu peripheres Verteilungsmuster vor, sodass eine pulmonale Thrombendarieriektomie nicht durchgeführt werden konnte. Vergleicht man die Patienten mit einem peripheren Muster und einer zentralen und damit operablen Verteilung bezüglich der fünf Mutationen, fand sich kein Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten Mutationen keinen Einfluss auf die Verteilung der Läsionen bei CTEPH zeigen.

1.5 Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a progressive disease and it is caused by various pathomechanisms, that cause an increase in pulmonary pressure.

About 1% of the global population is affected by PH. The most common cause in the western countries are left heart diseases that usually cause only a moderate increase in pulmonary pressure. In sub-saharan Africa, schistosomiasis is the most common cause.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) and chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) are rare subforms. The incidence of both forms is about 1-4 per million and the exact pathomechanism isn't completely understood.

The disease leads to a number of pathomechanisms in pulmonary arteries that lead to a vicious circle.

Initial clinical symptoms are unspecific, including exertional dyspnoea, recurrent syncope, thoracic pain as well as global disability, and are therefore often attributed to more common diagnoses.

PH has a poor prognosis if not treated. It stays an incurable ailment despite a number of current improvements in therapy during the last years.

Thromboembolism seems to have a pathophysiologic relevance in PH. Patients with PAH often show small thromboembolism and occlusions of small pulmonary vessels.

Furthermore, thromboembolism is the leading pathomechanism in CTEPH. Two frequent polymorphisms that affect the factor V and the prothrombin gene (factor V Leiden and prothrombin G2010A) are presumed to be the most common cause of hereditary thromboembolism in Germany.

The PAI 4G/5G mutation, the MTHFR C677T and the MTHFR A1298C mutations are three additional polymorphisms that are related to an increased prevalence of thromboembolic events, especially in combination with other risk factors.

For some known risk factors of thromboembolism like the antiphospholipid syndrome, an increased prevalence for patients with PAH or CTEPH is known. Studies implemented so far could not show any correlation between the factor V Leiden or the prothrombin mutation and PH.

We intended to examine the frequency of common genetic thromboembolic risk factors in patients with CTEPH and PAH and to generate a high sample size.

We examined the frequency of the factor V Leiden mutation, the prothrombin mutation G2010A, the MTHFR C677T and MTHFR A1298A mutations and the PAI-1 4G/5G polymorphism.

1.6 Patients and methods

The study population is assembled of three patient groups. The first group contains patients with a PAH that are under the care of the University Medical Center Amsterdam. These patients

agreed to donate blood samples for genetic research. We received 82 probes for further analyses from Amsterdam.

The second group are patients, who are treated in the outpatient department of the Medical University of Saarland with PH. In these group, all kinds of PH can be found although patients with PAH and PH due to lung diseases or hypoxemia are most frequent. These probes were collected during 2009 and 2012.

The third group are in-patients of the Saarland University Medical Center that received a medical clarification of PH. In these cases, genetic testing of common hereditary reasons of thrombophilia was made routinely. This group contains mostly CTEPH patients or patients in which CTEPH was suspected.

We tested all patients for the factor V Leiden mutation, the prothrombin mutation G2010A, the PAI-1 4G/5G and the MTHFR C677T and MTHFR A1298C mutations.

The results of group 3 were collected during 2012 and 2017. PAI-1 4G/5G and the MTHFR C677T and MTHFR A1298C mutations were analyzed by pyrosequencing. The DNA was extracted from whole blood. For the factor V Leiden mutation and the prothrombin mutation G2010A, a melting curve analysis was used.

At the same time, the patients of the first and second groups were analyzed for the same mutations by pyrosequencing.

To summarize, we included 593 patients in the study. Additionally, to the genetic results, we collected clinical parameters and performed a follow-up to estimate the lethality.

The follow up was made in 2015 and for the patients that were included later in 2017/2018.

All 593 patients were divided into different PH subtypes according to the Nice classification of 2013. The most common subtypes were PAH with 152 patients and CTEPH including 234 patients.

1.7 Results

Two-thirds of the PAH patients were female whereas the CTEPH patients showed the same gender distribution. Most patients showed heavy symptoms and were categorized in WHO functional classes 3 or 4. The mean pulmonary arterial pressure (mPAP) was on average 9mmHg higher compared to the CTEPH patients. Patients with CTEPH showed a higher prevalence for the factor V Leiden mutation (10,53%) and the prothrombinmutation (8,3%) compared to the patients with PAH (factor V Leiden 3,95% and Prothrombin 2,63%).

The PAI-1 4G/5G mutation and the MTHFR C677T and A1298T mutation showed no significant difference between PAH and CTEPH.

Comparing the different origins of the probes we found a higher prevalence of the factor V Leiden and prothrombin mutation among the patients from Homburg than among the patients from Amsterdam. Factor V Leiden was also more frequent among the patients that were screened routinely for the mutations (14,29%) than among the outpatients (2,78%) and the patients from Amsterdam (0%). We found a similar distribution for prothrombin. 8,57% of the routinely screened patients carried the heterozygotic mutation. In Amsterdam, we found 1,23% and no mutations among the outpatients. The homozygote MTHFR C677T and A1298C mutations were less common in the probes from Amsterdam.

We made a follow-up at two different dates that were set between 1-5 years after including the patients in our study. We found 6,84% (16 of 234) of the CTEPH patients were dead. In PAH patients we found an even higher rate of 28,95% (44 of 152). The homozygote MTHFR A1298C Mutation was more frequent in the deceased but no other significant difference of the 5 mutations between survivors and deceased in CTEPH and PAH was found.

153 of the CTEPH patients were classified as operable whereas 81 patients showed a peripheral distribution. In those patients, a thrombectomy was not recommended. When comparing the operable and inoperable patients we found no difference in the examined mutations.

1.8 Conclusion

The study showed an equal distribution of MTHFR C677T, A1298C and PAI-1 4G/5G in PAH and CTEPH patients. Furthermore, the results were equivalent to the prescribed prevalence within a healthy population. Prothrombin and factor V Leiden were more frequent under CTEPH patients than under PAH patients, the difference was significant. (Factor V Leiden: 3,95% heterozygotic under PAH and under CTEPH 10,53% heterozygotic and 0,44% homozygotic, $p=0,046$; Prothrombin 2,63% heterozygotic under PAH and 8,3% under CTEPH, $p=0,027$)

Both, the prothrombin and the factor V Leiden mutation show a lower prevalence in the Netherlands than in Germany. Moreover, all our CTEPH patients are Germans and all our patients from the Netherlands are suffering from PAH.

Consequently, the different destinations may explain partly the higher occurrence of the mutations under CTEPH patients. But indeed, the prevalence we found in our study was higher than the reference values in Germany prescribed so far. Especially prothrombin may be a risk

factor for CTEPH. We found 8,3% mutations under CTEPH patients, which is 4 times higher than prescribed in a healthy German population (≈ 2).

Factor V Leiden was more frequent under CTEPH patients than under PAH patients but the ratio we found where lower than the values recorded for a population with a history of thromboembolism. Considering only pulmonary embolism without deep venous thrombosis, the mutation is only found in about 9%, which is close to our results.

The CTEPH such as the PAH group showed 23% of patients heterozygous for both mutations. A similar ratio can be found in a healthy cohort.

The patients from Amsterdam showed a lower ratio of homozygote MTHFR A1298C and C677T mutations than the patients from Homburg. As local differences may not explain this result, a lower ratio within patients with an idiopathic or hereditary PAH may be presumed.

Patients with PAH showed a higher lethality than CTEPH patients. The mutations showed an equal distribution among PAH patients who survived after the follow-up and those who died. No significant differences were detected.

Considering the CTEPH patients, only for the MTHFR A1298C mutation a significant difference was found ($p=0,036$). We found more mutations under the patients who survived than under the deceased but the deceased are only a small subgroup ($N=16$).

34,62% of the CTEPH Patients showed a peripheral distribution of their embolism so that a thrombectomy was impossible. Those with a peripheral distribution showed no difference to the patients with a more central occlusion in all 5 mutations. This shows, that the mutations we examined in this study show no influence on the pattern of pulmonary lesions in CTEPH.

2 Einleitung

2.1 Pulmonale Hypertonie

2.1.1 Allgemeines

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine seltene, lebensgefährliche Erkrankung, die trotz vieler Verbesserungen der Therapie in den letzten 30 Jahren in vielen Fällen noch immer eine schlechte Prognose aufweist. Fasst man alle Unterformen der PH zusammen, kann man weltweit von einer Prävalenz von etwa 1% ausgehen. (HOEPER et al., 2013b)

Die PH ist definiert als eine Erhöhung des Druckes der Arteria pulmonalis in Ruhe. Der Referenzwert hierbei ist der pulmonal arterielle Mitteldruck (mPAP). Seit 1973 galt ein Wert von $\geq 25\text{mmHg}$ als krankheitsdefinierend, 2018 wurde dieser Grenzwert auf einen mPAP $\geq 20\text{mmHg}$ herabgesetzt. (ROSENKRANZ et al., 2019; SKORO-SAJER, LANG, 2018)

Der mPAP setzt sich aus dem Druck im linken Vorhof (PLA) summiert mit den Druckdifferenzen im Verlauf des pulmonalen Gefäßsystems zusammen (arteriell (a), kapillär (k), venös (v)). (OLSCHEWSKI, OLSCHEWSKI, 2011)

$$mPAP = PLA + \Delta Pa + \Delta Pk + \Delta Pv$$

Neben einer Erhöhung des Druckes im pulmonalen Gefäßsystem selbst können Erkrankungen des linken Herzens, die den linksatrialen Druck erhöhen, eine Erhöhung des mPAP bewirken. Der linksatriale Druck kann nicht direkt mittels Rechtsherzkatheter gemessen werden, daher wird der pulmonal kapilläre Wedgedruck (PCWP) oder der pulmonal arterielle Verschlussdruck (PAOP) als Näherung verwendet. Sie entsprechen annähernd dem Druck im linken Atrium. (OLSCHEWSKI, OLSCHEWSKI, 2011)

Es gibt drei Möglichkeiten zur Messung des linksatrialen Druckes. Zur Bestimmung des PCWPs wird der Katheter bis auf Kapillarebene vorgeschoben, bis der Katheter selbst das Lumen verschließt. Ein weiteres Verfahren besteht in der Messung des PAOP. Hierbei wird ein Ballonkatheter in eine Pulmonalarterie eingeführt und das Lumen durch Dilation des Ballons verschlossen. Erkrankungen des linken Herzens führen zu einer Erhöhung des linksatrialen Druckes und so zu einem erhöhten PCWP bzw. PAOP.

Eine weitere Möglichkeit eine Linksherzerkrankung als Ursache eines erhöhten mPAP nachzuweisen, besteht in der Messung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes

(LVEDP). Hierfür ist allerdings die Durchführung eines Linksherzkatheters notwendig. (GALIÈ et al., 2015; HOEPER et al., 2013a; ROSENKRANZ, PRESTON, 2015)

So können Linksherzerkrankungen von anderen Ursachen der PH differenziert werden.

Der pulmonale Perfusionswiderstand (pulmonary vascular resistance; PVR) errechnet sich aus dem Abfall des Druckes im Verlauf der Lungenstrombahn und dem Herzzeitvolumen:

$$PVR = \frac{mPAP - PCWP}{HZV}$$

Wie wir heute wissen, führen verschiedene Pathomechanismen zur Erhöhung des pulmonalen Mitteldruckes.

Der Auslöser kann eine Obliteration, wie sie zum Beispiel bei Embolien auftritt, mechanischer Stress, eine chronische Inflammation oder chronische Hypoxie sein. Auch eine genetische Prädisposition ist ein Risikofaktor einer PH.

Histologisch zeigt sich eine Hypertrophie der Muskularis und des Endothels. Dieses sogenannte vaskuläre Remodelling führt im weiteren Verlauf zu einer Vasokonstriktion und zur Ausbildung von Mikrothrombosen. Diese Mechanismen führen letztlich zu einem Circulus vitiosus und es kommt zu einer progredienten Druckerhöhung. (OLSCHEWSKI, OLSCHEWSKI, 2011)

Die PH kann sowohl Folge einer vorbestehenden Grunderkrankungen, aber auch idiopathisch bedingt sein. Da sich die vielen Formen nicht nur in der Pathogenese, sondern auch in der Therapie erheblich unterscheiden, ist eine gezielte Diagnostik und Einteilung wichtig.

2.1.2 Einteilung

1973 fand die erste WHO-Konferenz zur PH in Genf statt. Hier wurde eine Unterteilung in primäre pulmonale Hypertonie und sekundäre pulmonale Hypertonie beschlossen.

Unter „sekundärer“ PH wurden Formen zusammengefasst, bei denen sich der pulmonale Hypertonus im Rahmen eines bekannten Auslösers ausbildet, während dieser bei der „primären“ PH fehlt.

Diese Einteilung ist nach dem aktuellen Wissensstand jedoch stark vereinfacht, da mittlerweile viele Auslöser bekannt sind, die alleine oder in Kombination eine PH verursachen. Außerdem muss von einer genetischen Prädisposition ausgegangen werden, die eine Einteilung in sekundär und primär nicht ohne Weiteres zulässt. Daher wurde 1998 in der 2. WHO-Konferenz in Evian eine genauere Einteilung in fünf Gruppen festgelegt. (RICH, 1998b)

Tabelle 1: Übersicht der Einteilung nach Evian (RICH, 1998b)

Einteilung nach Evian	
1	Pulmonal arterielle Hypertonie
2	PH bei Linksherzerkrankungen
3	PH bei Lungenerkrankungen
4	Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie
5	Andere Formen

Die zweite Gruppe stellt hierbei eine Sonderform dar, da der hohe pulmonale Druck durch einen erhöhten Druck im linken Ventrikel bedingt ist. Man spricht daher von einer postkapillären PH. Die anderen Formen entstehen dagegen durch eine Pathologie des Lungengefäßbettes und werden unter dem Begriff der präkapillären PH zusammengefasst. Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) und die chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH), die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, gehören zu den präkapillären Formen.

In der Evian-Konferenz wurde auch eine Einteilung der Schweregrade der Symptomatik in funktionelle Klassen etabliert (WHO-FC). Diese an die Einteilung der New York Heart Association (NYHA) bei Herzinsuffizienz angelehnte Klassifizierung in vier Gruppen ist bis heute ein guter Prognosefaktor und spielt bei Therapieentscheidungen eine wichtige Rolle. (OLSCHEWSKI, OLSCHEWSKI, 2011)

Tabelle 2: Einteilung in funktionelle Klassen gemäß der WHO

WHO-FC I	Patienten mit PH ohne Einschränkung der körperlichen Aktivität.
WHO-FC II	Patienten mit PH und einer leichten Einschränkung der körperlichen Aktivität.
WHO-FC III	Patienten mit PH mit deutlicher Einschränkung der körperlichen Aktivität bereits bei leichter Belastung, aber ohne Beschwerden in Ruhe.
WHO-FC IV	Patienten mit PH mit Unfähigkeit, irgendwelche Tätigkeiten ohne Symptome durchzuführen. Symptome können bereits in Ruhe vorhanden sein.

Nach Prof. Dr. Horst Olschewski, Prof Dr. Andrea Olschewski: Pulmonale Hypertonie

Die Einteilung von Evian ist in ihren Grundzügen bis heute erhalten geblieben. In den danach folgenden Weltsymposien in Venedig 2004, Dana Point 2008, Nizza 2013 und Nizza 2018, wurde sie weiter angepasst. Die aktuell gültige Klassifikation ist die Nizza-Klassifikation von 2018, die in Tabelle 3 zusammengefasst ist.

Tabelle 3: Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach Nizza 2018 (SIMONNEAU et al., 2019)

1. PAH
1.1. Idiopathische PAH
1.2. Hereditäre PAH
1.3. Durch Medikamente und Toxine vermittelte PH
1.4. PH assoziiert mit
1.4.1 Bindegewebserkrankungen
1.4.2 HIV-Infektion
1.4.3 Portaler Hypertension
1.4.4 Angeborene Herzfehler
1.4.5 Schistosomiasis
1.5. PAH bei Patienten mit Ansprechen auf Calciumkanalblocker
1.6. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose
1.7. Persistierende PH des Neugeborenen
2. PH infolge von Erkrankungen des linken Herzens
2.1. PH bedingt durch linksventrikuläre Dysfunktion mit erhaltener Ejektionsfraktion
2.2. PH durch linksventrikuläre Dysfunktion mit reduzierter Ejektionsfraktion
2.3. Herzklappenerkrankung
2.4. Kongenitale/erworbene Kardiovaskuläre Erkrankungen, die zu einer postkapillären PH führen
3. PH durch Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
3.2. Restriktive Lungenerkrankungen
3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischt obstruktiv/restriktivem Muster
3.4. Hypoxie ohne Lungenerkrankung
3.5. Entwicklungsstörungen der Lunge
4. PH durch pulmonal arterielle Obstruktion
4.1. CTEPH
4.2. Andere Obstruktion der Pulmonalarterien
5. PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus
5.1. Hämatologische Erkrankungen
5.2. Systemische und Metabolische Erkrankungen
5.3. Andere
5.4. Komplexe angeborene Herzerkrankungen

2.1.3 Diagnostik

Eine typische Anamnese eines Patienten mit PH umfasst unspezifische Symptome wie Belastungsdyspnoe, trockener Husten, Synkopen, Palpitationen oder thorakale Schmerzen. In der körperlichen Untersuchung zeigen sich Zeichen der Rechtsherzbelastung wie gestaute Halsvenen, ein Systolikum links parasternal als Zeichen der Trikuspidalinsuffizienz und ein betonter zweiter Herzton. Im fortgeschrittenen Stadium zeigen sich Zeichen der rechtskardialen Insuffizienz mit Aszites und peripheren Ödemen. (LESCHKE et al., 2009)

Im EKG zählen hierzu ein Rechtslagetyp, ein SIQIII-Typ sowie ein kompletter oder inkompletter Rechtsschenkelblock. Präterminale T-Negativierungen in den Brustwandableitungen (V1-V4) sind Zeichen der Rechtsherzhypertrophie. (KOPEC, 2019)

Im Röntgenthorax findet sich eine Rechtsherzhypertrophie sowie ein prominentes Pulmonalissegment. Die Spiroergometrie zeigt typischerweise eine verminderte maximale Sauerstoffaufnahme sowie eine Ventilations-Perfusions-Verteilungsstörung. (LÜCKE et al., 2019)

Die Dopplerechokardiographie stellt eine geeignete Screeninguntersuchung dar und sollte besonders bei Patienten mit prädisponierenden Erkrankungen wie Sklerodermie regelmäßig erfolgen. Hierbei kann mithilfe der modifizierten Bernoulli-Gleichung über die maximale Geschwindigkeit der Trikuspidal-/ Pulmonalisinsuffizienz sowie durch Schätzen des Druckes im rechten Vorhof der pulmonal arterielle Druck abgeschätzt werden. Außerdem kann die Echokardiografie bereits Hinweise auf eine ursächliche linkskardiale Erkrankung aufzeigen.

Zur Diagnosesicherung sollte ein Rechtsherzkatheter erfolgen. Hierbei kann neben der genauen Messung des mPAP durch Bestimmung des PCWP auch eine Einteilung in prä- oder postkapillär erfolgen. (GALIÈ et al., 2015) Als Grenzwert wird hier ein PCWP von 15 mmHg angesetzt. Bei höheren Werten wird von einer linkskardialen Ursache ausgegangen.

Zum Ausschluss einer CTEPH gehört auch eine Perfusionsszintigraphie zum Algorithmus der Diagnostik, da sich bei etwa 30% der CTEPH-Patienten keine klinisch auffällige Lungenembolie in der Anamnese findet und die Perfusionsszintigraphie den Goldstandard zum Ausschluss einer Embolisation der Lungenarterien darstellt. (TUNARIU et al., 2007)

In der Regel schließt sich bei auffälligem Befund eine Angiographie der Pulmonalarterien an. Hier kann nachgewiesen werden, in welchen Gefäßabschnitten die Okklusionen lokalisiert sind, da eine Endarteriektomie mit Entfernung der Thromben bis auf Subsegmentebene möglich ist. Bei sehr distalen Verteilungsmustern können andere Therapien erwogen werden.

Ein CT kann Aufschlüsse über das Vorliegen einer Lungengerüsterkrankung oder eines Emphysems geben. Ergänzend können serologische Testungen (z. B. HIV, Schistosomiasis etc.) sowie eine Basisdiagnostik (Lungenfunktion, Blutgasanalyse, Routinelaborwerte, Schilddrüsenwerte, Diagnostik auf Kollagenose, Abdomensonographie) und eine gründliche Anamnese wie z. B. Medikamenten- oder Toxinanamnese, Hinweise auf die Genese aufzeigen. Bleibt die Diagnostik unauffällig oder ergeben sich Hinweise auf eine familiäre Häufung, sollte auch eine genetische Untersuchung zum Ausschluss einer hereditären Ursache angestrebt werden. (GALIE et al., 2009; GALIE et al., 2015; MORRELL et al., 2019)

2.2 Pulmonal arterielle Hypertonie

2.2.1 Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit stellen Patienten mit einer PAH die zweitgrößte Patientengruppe dar. Diese Gruppe wird in der Klasse 1 nach Nizza zusammengefasst und setzt sich aus der idiopathischen pulmonal arteriellen Hypertonie (IPAH), der hereditären pulmonal arteriellen Hypertonie (HPAH), der durch Medikamente und Toxine vermittelten PH und den assoziierten Formen zusammen. (GALIÈ et al., 2015)

Unter den PAH-Patienten des Patientenkollektivs dieser Arbeit ist die IPAH die größte Untergruppe. Sie ist dadurch definiert, dass sich keine andere Ursache der PH finden lässt. Die Inzidenz der PAH beträgt etwa 2 pro 1 Million Einwohner. Damit stellt sie eine sehr seltene Erkrankung dar. (HUMBERT et al., 2006)

Die IPAH stellt für die PAH bezüglich des Pathomechanismus eine Art Modellkrankheit dar. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer (1:1,7) und typischerweise erkranken Patienten in jungen Jahren mit einer Häufung zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. (RICH et al., 1987)

Noch in den 80er-Jahren lag die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung einer IPAH bei 2,8 Jahren. (D'ALONZO et al., 1991)

Diese sehr schlechte Prognose der oft jungen Patienten konnte in den letzten Jahrzehnten durch eine Verbesserung der therapeutischen Ansätze verlängert werden. So zeigt sich für Frauen heute eine 5-Jahres-Überlebensrate über 60% und für Männer über 50%. (GALL et al., 2017)

Wenn sich zwei Erkrankte in einem Familienstammbaum finden, sollte auch an eine hereditäre Ursache gedacht werden. Die wichtigsten Mutationen als Ursache der HPAH stellen hier die Mutation im Bone Morphogenetic Proteine Receptor 2-Gen (BMP2), die Mutation des activin

receptor like kinase-Gen (ALK) sowie Mutationen des Endoglingens dar. (MACHADO et al., 2015; MORRELL et al., 2019)

Es gibt unterschiedliche Toxine und Medikamente, die zur Entstehung einer PAH führen können. Hierzu zählen vor allem Appetitzügler. Ebenso geht Amphetaminkonsum mit einer erhöhten Inzidenz einher.

1981 kam es außerdem durch den Vertrieb eines illegal mit Anilin denaturierten Speiseöls zu einem epidemieartigen Auftreten. (GELPÍ et al., 2002)

In den 60er-Jahren kam es zu einem Anstieg der Inzidenz der PAH in Deutschland, der in Zusammenhang mit dem neu zugelassenen Appetitzügler Aminorex (Menocil) gebracht werden konnte. Das Epinephrin ähnliche Amphetamin führte 1-3 Jahre nach Zulassung zu einem plötzlichen Anstieg der Inzidenz der PAH um mehr als das 20fache. Aminorex wurde schließlich vom Markt genommen, wodurch es zu einem deutlichen Rückgang der Fallzahlen kam. (ABENHAIM et al., 1996; FISHMAN, 1999; FOLLATH et al., 1971)

Patienten, die mindestens drei Monate Appetitzügler eingenommen haben, weisen ein Chancenverhältnis (odds ratio; OR) von 23,1 auf, an einer PAH zu erkranken. (ABENHAIM et al., 1996) Da die Inzidenz der Patienten, die unter der Einnahme von Appetitzügler eine PH entwickeln, zwar höher ist als die der Normalbevölkerung, aber insgesamt nur eine kleine Anzahl der Patienten nach Einnahme eine PH entwickeln, wird hier von einer multifaktoriellen Genese und möglicherweise genetischen Prädisposition ausgegangen. (ABENHAIM et al., 1996)

Unter der Gruppe der assoziierten PAH werden Formen zusammengefasst, die durch einen schwachen Risikofaktor ausgelöst werden, sodass angenommen werden muss, dass auch hier eine zusätzliche Disposition vorliegt, die zur Entstehung der Erkrankung beiträgt. Hierzu zählen Kollagenosen, eine Infektion mit HIV, portale Hypertension, angeborene kleinere Herzfehler, bei denen eine rein „mechanische“, sekundäre PH unwahrscheinlich erscheint, sowie die vor allem im Amazonas und der Subsahara verbreiteten Schistosomiasis, die weltweit betrachtet die häufigste Ursache der PH darstellt. (PAPAMATHEAKIS et al., 2014)

2.2.2 Pathomechanismus

Der genaue Pathomechanismus der PAH ist noch nicht vollständig bekannt, aber man geht von einem Missverhältnis von vasodilatativen und vasokonstriktiven Mediatoren, bedingt durch eine Endotheldysfunktion, aus. (RICH, 1998a)

Vasodilatative Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin werden vermindert produziert. Stattdessen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von vasokonstriktiven

Mediatoren wie Thromboxan oder Endothelin. (LANGLEBEN et al., 1999) Die resultierende Vasokonstriktion führt schließlich zu einem Gefäßremodelling, das typischerweise mit einer Hypertrophie der Media beginnt und bei Fortschreiten auch zu einer Proliferation der Intima und Adventitia führt. (FISHMAN, 1998) Im weiteren Verlauf entstehen durch Hyperkoagulabilität, verminderte Fibrinolyse und Endotheldysfunktion kleinere Mikroembolien, die zu einer Gefäßokklusion führen. (GAINE, RUBIN, 1998)

Histologisch imponieren In-situ-Thrombosen der Gefäße und plexiforme Läsionen.

Plexiforme Läsionen sind dünnwandige und dilatierte arterielle Gefäßkonvolute, die sich im Krankheitsverlauf ausbilden. Sie entstehen durch eine Migration von glatten Muskelzellen aus der Gefäßmedia in die Intima. Durch Verlust ihrer Myofilamente entstehen aus ihnen sogenannte Myofibroblasten, die Kollagen an das Interstitium abgeben. Die Myofibroblasten bilden im Verlauf erneut vermehrt Myofilamente aus. Es kommt zu einer zunehmenden Intimaproliferation aus muskelähnlichen Zellen, eingebettet in eine extrazelluläre Matrix. (SMITH et al., 1990) Neben plexiformen Läsionen stellen In-situ-Thrombosen einen häufigen histopathologischen Befund der PAH dar. Besonders das Vorkommen plexiformer Läsionen scheint mit einem schweren Verlauf zu korrelieren. Pietra et al. konnte zeigen, dass Patienten mit histologischem Nachweis plexiformer Läsionen deutlich höhere pulmonal vaskuläre Widerstände und ein deutlich kürzeres Langzeitüberleben zeigen als Patienten mit vornehmlich In-situ-Thrombosen. (PIETRA et al., 1989)

2.2.3 Therapie und Prognose

Neben supportiven Maßnahmen wie moderatem Training, Langzeitsauerstofftherapie, Impfungen gegen Pneumokokken, Influenza und SARS-COV-2 sowie Vermeidung von Schwangerschaften stehen mittlerweile eine Vielzahl an Medikamenten zur Verfügung.

Neuere Studien zeigen eine 3-Jahres-Überlebensrate von 68%. Dies stellt zwar bereits eine deutliche Verbesserung zum Stand vor Einführung der ersten Medikamente dar, Ziel sollte es dennoch sein, die Langzeitprognose durch eine frühere Diagnose, neuere pharmazeutische Ansätze und weitere Therapieoptimierung weiter zu verbessern. (GALL et al., 2017)

Für eine kleine Patientengruppe stellen Calciumantagonisten eine Therapieoption dar. Das Ansprechen sollte daher im Rechtsherzkatheter (RHK) getestet werden. Hierbei wird NO, ein Prostazyklin-Analagon oder Adenosin verabreicht. Wenn der mPAP um mindestens 10mmHg und unter insgesamt 40mmHg abfällt, sollte ein Therapieversuch mit Amlodipin, Nifedipin oder Diltiazem erfolgen. Bei gutem Ansprechen zeigen diese Patienten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 95%. (RICH et al., 1992) Auch wenn diese Therapie nur für 10-25% der

Patienten mit einer PAH in Frage kommt, sollte ein Reagibilitätstest im RHK erfolgen. (RICH et al., 1992; SITBON et al., 2005)

In den letzten 30 Jahren haben sich fünf Substanzklassen zur Therapie der PAH etabliert. Phosphodiesterasehemmer wie Sildenafil oder Tadalafil führen zu einer Erhöhung des intrazellulären zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) und bewirken so eine Relaxation der glatten Muskulatur. (GALIÈ et al., 2005; GALIÈ et al., 2015)

Eine weitere Substanzklasse stellen die Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ERA) dar. Sie umfasst aktuell die drei Präparate Bosentan, Ambrisentan und Macitentan. Diese Substanzgruppe blockiert den Endothelinrezeptor und hemmt so die Wirkung des Endothelin 1. Endothelin 1 bewirkt an der glatten Muskulatur über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor eine starke Vasokonstriktion. (MOTTE et al., 2006)

Bei besonders schwerer Symptomatik (WHO FC III-IV) stellen die Prostazyklin-Analoga die dritte Therapiemöglichkeit dar. Prostazyklin stellt einen starken Vasodilatator dar, der über einen G-Protein-gekoppelten Membranrezeptor eine Vasodilatation der glatten Muskulatur bewirkt. (RUAN et al., 2010)

Der erste Vertreter dieser Klasse, Epoprostenol, macht wegen seiner kurzen Halbwertszeit eine kontinuierliche Gabe per infusionem notwendig. Treprostinil besitzt eine deutlich längere Halbwertszeit, was eine subkutane, inhalative und neuerdings auch orale Verabreichung ermöglicht. Ebenfalls erst wenige Jahre verfügbar ist Riociguat, ein Wirkstoff, der als Stimulator der Guanylatzyklase die Bildung von cGMP bewirkt. (MACAULAY et al., 2016)

Ein ebenfalls neues Medikament ist der orale Prostacyclin-Rezeptoragonist Selexipag. Der Agonist vermittelt eine Vasodilatation über einen membranständigen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor, die der Wirkung von endotheliale Prostazyklin entspricht. (SITBON et al., 2015)

Neben einer Monotherapie haben sich Kombinationstherapien, beispielsweise aus einem Phosphodiesterasehemmer und einem ERA oder Riociguat durchgesetzt. Bei schweren Verläufen kann eine Dreifach-Therapie aus einem intravenösem Prostazyklin-Analogen zusammen mit ein Phosphodiesterasehemmer und einem ERA begonnen werden. (COGHLAN et al., 2017; LÜCKE et al., 2019)

Bei Patienten mit einer PAH wird außerdem eine Antikoagulation mit einem Vitamin-K-Antagonisten empfohlen. (GRÜNIG, 2009)

Als Ultima Ratio stellt eine Lungentransplantation eine letzte Therapieoption für PAH-Patienten dar. Jedoch ist die Sterblichkeit auf der Warteliste aus Mangel an Spenderorganen sehr hoch. (SULTAN et al., 2018)

Es gibt einige experimentelle Therapieansätze, die möglicherweise in den kommenden Jahren neue Therapien für PAH-Patienten ermöglichen. Hierunter zählt besonders die Zelltherapie mit endothelialen Progenitorzellen und mesenchymalen Stammzellen. Beide Ansätze haben antiproliferative, antiinflammatorische und vasodilatative Effekte auf die pulmonalen Gefäße und verhindern das endotheliale Remodelling und damit die Progredienz der Erkrankung. (FUKUMITSU, SUZUKI, 2019; YANG et al., 2013)

Ebenfalls vielversprechend sind die neuen Ansätze der Gentherapie, die im Tiermodell positive Ergebnisse zeigen. Eine Möglichkeit besteht darin, durch Einbringen eines Gens, beispielsweise mittels Virusvektor, eine Hochregulation der Prostacyclinsynthese zu erzielen. Hierdurch wird Prostazyklin freigesetzt und eine Vasodilatation erzielt. (KAWAKAMI et al., 2007)

2.3 Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie

2.3.1 Allgemeines

Patienten mit einer CTEPH stellen die zweite Patientengruppe dieser Arbeit dar. Die CTEPH entsteht durch Obstruktion des pulmonal arteriellen Gefäßsystems.

Neben einer im Rechtsherzkatheter gesicherten präkapillären PH erfordert die Diagnose einer CTEPH den Nachweis eines Perfusionsmismatch in der Perfusions-Ventilationsszintigraphie oder den Nachweis pulmonal arterieller Thromben in einer computertomographischen Angiographie, Magnetresonanzangiographie oder Pulmonalisangiographie. Die Diagnose darf nur bei Persistenz der Befunde unter mindestens 3-monatiger Antikoagulation gestellt werden. (WILKENS et al., 2018)

Die CTEPH hat eine Sonderstellung unter den Formen der präkapillären PH, da mit der pulmonalen Thrombendarteriektomie (PEA) eine kausale, operative Therapie mit guten Langzeitergebnissen zur Verfügung steht. (KLEPETKO et al., 2004)

2.3.2 Pathomechanismus

Die CTEPH ist mit einer Prävalenz von etwa 4 pro 1 Million Einwohner eine sehr seltene Erkrankung und betrifft Männer und Frauen gleichermaßen. (HOEPER et al., 2016; PEPKE-ZABA et al., 2011)

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt 63 Jahre. Etwa 75% der Patienten entwickeln die Erkrankung nach einer symptomatischen Lungenembolie, während bei den Übrigen die initiale Thrombosierung klinisch stumm verläuft. (PEPKE-ZABA et al., 2011)

Man geht umgekehrt davon aus, dass etwa 3% der überlebenden Patienten nach einer durchgemachten symptomatischen Lungenembolie eine CTEPH entwickeln. Diese Zahlen ergeben sich aus systematischen Nachuntersuchungen von Patienten nach stattgehabter Lungenembolie. (ENDE-VERHAAR et al., 2017; MARTINEZ et al., 2018; PENGO et al., 2004)

Bei den meisten dieser Patienten kommt es nach der Lungenembolie zu einer persistierenden Symptomatik. Ein kleinerer Teil entwickelt erst nach einer Phase mit deutlicher klinischer Verbesserung erneut progrediente Dyspnoe.

Bei Patienten mit einer CTEPH besteht meist eine lange Latenzzeit von etwa anderthalb Jahren zwischen Beginn der Symptomatik und Diagnosestellung, wobei Patienten nach Lungenembolie etwas früher diagnostiziert werden. (HELD et al., 2014; PEPKE-ZABA et al., 2011) Die meisten Patienten befinden sich zum Diagnosezeitpunkt bereits in WHO-FC III-IV. Normalerweise wird der Embolus nach einer Lungenembolie durch die körpereigene Fibrinolyse mit der Zeit aufgelöst. Bei Patienten mit einer CTEPH versagt diese physiologische Lyse aus verschiedenen Gründen und es kommt stattdessen zu einem bindegewebigem Umbau des Embolus. (MORRIS et al., 2009)

Initial kommt es, bedingt durch die Obstruktion, zu einer verminderten Perfusion der betroffenen Lungenabschnitte. Dieses Perfusions-Ventilationsmissverhältnis führt kompensatorisch initial zu einer vermehrten Durchblutung der verbleibenden Lungenabschnitte. Diese entwickeln im weiteren Verlauf der Erkrankung eine reaktive Vasokonstriktion, was zu einem erhöhten Druck auch der nicht okkludierten Gefäße führt. (MOSER et al., 1990; SCHÄFERS, SEEGER, 2001)

Im weiteren Verlauf ist die Erkrankung auch ohne weitere Thrombembolien progredient, da sich ein vaskuläres Remodelling einstellt, das zunehmend auch periphere Abschnitte der Lungengefäße befällt.

2.3.3 Therapie und Prognose

Die Prognose der CTEPH ist unbehandelt schlecht. Zahlen aus den 80er Jahren vor Etablierung der heutigen Therapiestandards zeigen eine 3-Jahres-Überlebensrate von nur 50%. (RIEDEL et al., 1982) Liegt eine schwere CTEPH Form mit einem mPAP von mehr als 50mmHg vor, ist sogar von einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von weniger als 10% auszugehen.

Durch die Einführung der PEA konnte diese Prognose deutlich verbessert werden. Sie stellt für operable Patienten einen potenziell kurativen Therapieansatz dar. Aber auch die Verbesserungen der medikamentösen Therapie und neuere interventionelle Therapieverfahren stellen neue therapeutische Optionen dar, durch die die Prognose der Patienten in den letzten Jahren verbessert werden konnte.

Bei der PEA wird das thrombotische Material aus den Pulmonalarterien extrahiert. Der Eingriff wird in der Regel beidseitig durchgeführt. Nach einer medianen Sternotomie erfolgt das Anschließen an die Herzlungenmaschine und die Einleitung der Hypothermie auf 20°C. Nach Eröffnen der Lungenarterien wird der okkludierende Intimazyylinder von zentral nach peripher extrahiert. (SCHÄFERS, SEEGER, 2001) In erfahrenen Zentren (>50 PEAs /Jahr) liegt die perioperative Letalität bei 1-4% (MADANI et al., 2012; MAYER et al., 2011) und das Risiko für bleibende schwere Behinderungen wie neurologische Defizite durch die zerebrale Minderperfusion ist sehr gering. (VUYLSTEKE et al., 2011)

Postoperativ zeigt sich bei einem Großteil der Patienten eine Verbesserung der Hämodynamik, etwa 70% zeigen sogar einen mPAP unter 25mmHg. (BONDERMAN et al., 2007; FREED et al., 2011; WILKENS et al., 2014)

Trotz der guten Ergebnisse nach PEA ist diese Therapie nur für etwa 30-50% der Patienten eine Option. (PEPKE-ZABA et al., 2011)

Gründe, die gegen eine OP sprechen, sind neben einer zu peripheren Verteilung vor allem bestehende Begleiterkrankungen wie ausgeprägte linksventrikuläre Dysfunktion, begleitende schwere Lungenerkrankungen oder eine palliative Tumorerkrankung. Die Komorbidität lässt bei diesen Patienten das Risiko des Eingriffes im Verhältnis zum möglichen Nutzen zu hoch erscheinen. (WILKENS et al., 2011)

Wird der Patient inoperabel eingestuft, kann gegebenenfalls eine interventionelle Entfernung des thrombotischen Materials mittels Ballonangioplastie (BPA) oder eine medikamentöse Therapie angeboten werden.

Riociguat ist für inoperabel eingestufte CTEPH-Patienten und für Patienten mit persistierender PH nach pulmonaler Thrombendarteriektomie zugelassen. (GRIMMINGER et al., 2009; MCLAUGHLIN et al., 2017) In der CHEST-1 Studie konnte eine Verbesserung der 6-Minuten-Gehstrecke (6-MWD) und der WHO-FC gezeigt werden. (GHOFRANI et al., 2013) Das zweite zugelassene Medikament ist Treprostinil subcutan, das über eine Pumpe appliziert wird. (LANG et al., 2021)

Auch für ERA konnte die MERIT-1 Studie zeigen, dass bei inoperablen Patienten eine Verbesserung der 6-MWD erzielt werden kann. Patienten zeigten außerdem unter Einnahme

von Macitentan seltener eine Verschlechterung der WHO-FC als die Placebogruppe. (GHOFRANI et al., 2017; HOEPER et al., 2005)

Bei unzureichendem Ansprechen der Monotherapie oder schlechter Verträglichkeit kann außerdem angelehnt an die Therapie bei PAH die Gabe von Phosphodiesterase-5-Inhibitoren oder Prostazyklin-Analoga im off label use erfolgen. Die aktuelle Studienlage deutet darauf hin, dass hiermit eine Prognoseverbesserung erzielt werden kann. (HOEPER et al., 2005; SEYFARTH et al., 2010)

Da bei Patienten mit CTEPH von einer Gerinnungsneigung ausgegangen wird, ist außerdem bei allen Patienten eine lebenslange Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten (Ziel INR 2,5-3,5) zu empfehlen. Zunehmend werden auch NOAKs bei CTEPH-Patienten zur Antikoagulation verordnet, wobei noch diskutiert wird, ob sie für alle Patienten gleichwertig zu Vitamin-K-Antagonisten sind. (BUNCLARK et al., 2020)

Des Weiteren kann eine supportive diuretische Therapie und bei Hypoxie eine Langzeitsauerstoffverordnung sinnvoll sein.

Die BPA als interventionelles Verfahren zielt darauf ab, das Gefäßlumen durch Verdrängung des thrombotischen Materials zu vergrößern. Die Technik wird seit wenigen Jahren in Japan angewandt, aktuell kommt das Verfahren auch in Europa bei inoperablen Patienten zunehmend zum Einsatz. Die periinterventionelle Sterblichkeit liegt bei unter 2% und die vorliegenden Studien zeigen eine deutliche Verbesserung der Hämodynamik und WHO-FC Stadien. Eine Verbesserung zeigt sich hierbei oft nicht unmittelbar postinterventionell, sondern im Verlauf und eine kontinuierliche Verbesserung bis zu 36 Monaten nach dem Eingriff ist möglich. Eine häufige Komplikation der BPA stellt das Reperfusionsoedem dar, welches bei bis zu 60% der Patienten auftritt. (FEINSTEIN et al., 2001; KATAOKA et al., 2012; OLSSON et al., 2017)

Trotz der zunehmenden Anwendung der interventionellen Verfahren und Verbesserungen der Therapie ist die PEA zum aktuellen Zeitpunkt der Goldstandard und sollte bei geeigneten Patienten immer einer BPA oder einer primären medikamentösen Therapie vorgezogen werden. (DIMOPOULOS et al., 2015)

2.4 Thrombophilie

Thrombophilie bezeichnet eine Prädisposition zur Entwicklung von Thrombembolien. Hierbei werden erworbene und hereditäre Formen subsumiert. Klinisch präsentiert sich eine Thrombembolie durch die Entstehung einer Thrombose oder Lungenembolie. Thrombembolien der Lungengefäße stellen die pathophysiologische Grundlage der CTEPH dar. Man geht davon

aus, dass sich bei fast der Hälfte aller Patienten, die an einem thrombembolischen Ereignis erkranken, eine genetische Prädisposition nachweisen lässt. Letztlich sind dies zwar nur Schätzungen, aber alleine der häufigste Polymorphismus, der das Faktor-V-Gen betrifft, findet sich bei 20-40% der Patienten mit einem thrombembolischen Ereignis in der Vergangenheit. (ROSENDAAL et al., 1995; SVENSSON, DAHLBACK, 1994) Die zweithäufigste Mutation betrifft das Prothrombingen und findet sich bei weiteren 7%. (POORT et al., 1996)

Obwohl für thrombembolische Ereignisse dieser klare Zusammenhang besteht, scheinen nur etwa 8% der CTEPH-Patienten eine genetische Prädisposition vorzuweisen. (WOLF et al., 2000)

In den letzten 50 Jahren konnten mehrere Gene identifiziert werden, die das Risiko eines Individuums zur Entwicklung einer Thrombembolie erhöhen. Es muss allerdings davon ausgegangen werden, dass noch nicht alle gefunden sind. Neben dieser genetischen Prädisposition stellt zunehmendes Alter einen wichtigen Risikofaktor dar. Während Frauen dabei in jüngeren Jahren ein höheres Risiko haben als Männer im gleichen Alter, ist die Inzidenz bei Männern ab dem 45 Lebensjahr höher. (HEIT, 2015; SILVERSTEIN et al., 1998)

Neben diesen allgemeinen Risikofaktoren wie Genetik, Alter und Geschlecht gibt es eine Reihe erworbener Risikofaktoren, die sich gegenseitig potenzieren (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: erworbene Risikofaktoren einer tiefen Beinvenenthrombose sowie deren odds Ratio (HEIT et al., 2000; KUIPERS et al., 2007)

Prädisponierende Faktoren einer tiefen Beinvenenthrombose
<ul style="list-style-type: none"> • Perioperativ (OR 18,95) • Aktive Krebserkrankung (OR 14,64) • Neurologische Erkrankungen einhergehend mit einer Beinparese (OR 6,10) • Hospitalisation/ Pflegeheimaufenthalt (OR 5,07 bzw. 4,63) • Trauma oder Fraktur (OR 4,56) • Orale Kontrazeptiva (OR 4,03) • Chronische Erkrankungen z. B. chron. Lungenerkrankungen (OR 1,23); Chronische Niereninsuffizienz (OR 3,00); Lupus erythematodes (OR 3,00) • Implantation eines intravaskulären Katheters oder Gerätes z. B. zentraler Venenkatheter oder Herzschrittmacher (OR 11,83) • Thrombophlebitis / oberflächliche Thrombose (OR 2,50) • Hormonersatztherapie (OR 1,2-2,53) • Übergewicht (OR 1,08) • Anästhesie (OR 17,50) • Postpartum (OR 19,00) • Immobilisierung durch Reise (OR 3,00)

2.5 Faktor-V-Leiden

Lange Zeit war bei den meisten Patienten, bei denen ein gehäuftes familiäres Auftreten von thrombembolischen Ereignissen eine hereditäre Ursache erahnen ließ, der genaue Mechanismus unbekannt. 1993 konnte die Arbeitsgruppe um Björn Dahlbäck schließlich eine erbliche Resistenz des Gerinnungsfaktors V (FV) gegen aktiviertes Protein C (APC) nachweisen die, wie wir heute wissen, für 20-40% aller Thrombembolien verantwortlich ist. (DAHLBÄCK et al., 1993; SVENSSON, DAHLBACK, 1994)

Etwa ein Jahr später gelang es einer Arbeitsgruppe aus dem niederländischen Ort Leiden, den Genlocus zu identifizieren. Die Mutation wurde nach dem Ort Ihrer Entdeckung Faktor-V-Leiden (FVL) benannt. (BERTINA et al., 1994) Das FV-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 1. Durch eine Punktmutation mit Transposition an Position 691 (Arginin zu Glutamin) wird das Arginin an Position 506 des FV-Proteins durch ein Glutamin ersetzt.

Hierdurch entsteht ein Protein mit einem veränderten Rezeptor für APC, der eine gewisse Resistenz für das antikoagulatorisch wirkende APC bewirkt. (DAHLBACK, 1995)

Neben der relativ weit verbreiteten FVL-Mutation wurden in den vergangenen 30 Jahren mehrere Mutationen des FV-Gens identifiziert. Zu den häufigeren zählt der FVR2-Haplotyp. Diese Mutationen sind insgesamt sehr selten und ihre pathogenetische Bedeutung ist nicht sicher geklärt, sodass sie keinen Teil eines Thrombophilie-screenings darstellen und in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht wurden. (VAN COTT et al., 2016)

In der kaukasischen Bevölkerung gibt es etwa 3-7% heterozygote Träger der FVL-Mutation, die mit einem 5-10fach erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse belastet sind. (BERTINA et al., 1994; REES et al., 1995)

Homozygote Mutationsträger sind selten (0,5%) und haben ein deutlich erhöhtes Thrombembolierisiko (50-100fach). Während die Mutation bei Europäern weit verbreitet ist, kommt sie bei afrikanischen, australischen oder amerikanischen Ureinwohnern nicht vor und ist in asiatischen Ländern deutlich seltener als unter Europäern. (KOSTER et al., 1993; REES et al., 1995; WITT, 1998)

Aus dieser Verteilung lässt sich schließen, dass sie unter Kaukasiern entstand und sich möglicherweise durch einen leichten Selektionsvorteil durch das geminderte Blutungsrisiko, beispielsweise bei Verletzungen oder unter der Geburt, verbreitete. Innerhalb Europas findet sich eine höhere Prävalenz in südlichen sowie in östlichen Ländern. (LUCOTTE, MERCIER, 2001)

Die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin stellt den ersten Schritt der eigentlichen Gerinnungsphase dar, die sich der Aktivierungsphase der Blutgerinnung anschließt und schließlich in der Ausbildung eines Fibrinthrombus endet.

Die Bildung des Thrombins erfolgt durch den Faktor X (FX) durch spezifische Spaltung an zwei Stellen aus Prothrombin. FV in seiner aktivierten Form (FVa) dient bei dieser Reaktion als Cofaktor. Die Aktivierung des FV zu FVa erfolgt im Sinne einer positiven Rückkopplung durch Thrombin selbst. Deaktiviert wiederum wird FVa durch Proteolyse mittels APC und Proteins S, das als Cofaktor fungiert. Dies stellt einen der wichtigsten inhibitorischen Mechanismen der Gerinnungskaskade dar. Setzt man einer Serumprobe von Patienten mit der FVL-Mutation *in vitro* APC zu, führt dies nicht zu einer Hemmung der Gerinnung, wie es bei Trägern des Wildtyps der Fall ist. Dieser Umstand wurde bereits von Dahlbäck als eine Resistenz gegenüber APC beschrieben. (DAHLBACK, 1995)

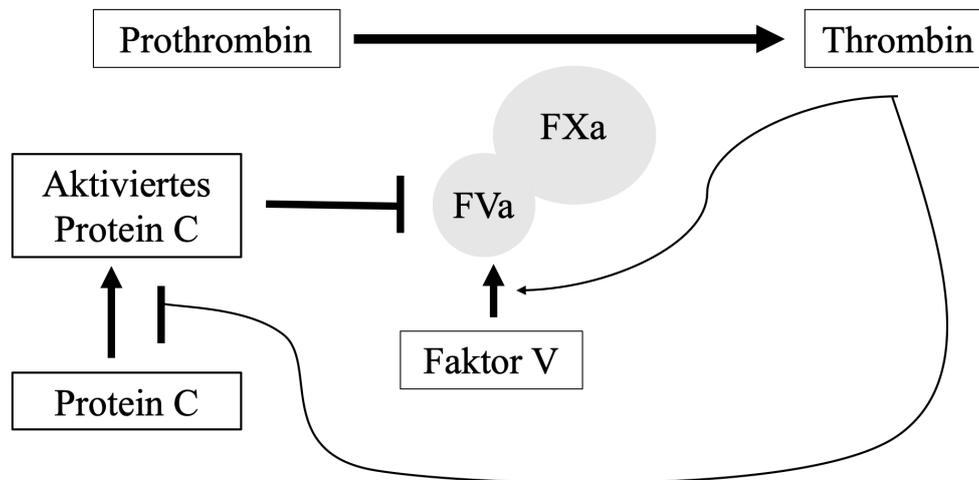


Abbildung 1: Einfluss des FV auf die Thrombinbildung

Diese Resistenz entsteht durch die veränderte Proteinstruktur, APC spaltet FVa an drei spezifischen Peptidbindungen. Im ersten Schritt erfolgt die Spaltung an Arginin 306, hierdurch werden die anderen Spaltstellen erst zugänglich gemacht. Für die Inaktivierung des FVa muss ein weiteres Arginin in Position 506 gespalten werden, bei Vorliegen einer FVL-Mutation läuft dieser Schritt etwa 10-mal langsamer ab und es kommt zu einem langsameren Abbau des FV und einer konsekutiv höheren Plasmaaktivität. (CASTOLDI et al., 2004)

2.6 Prothrombin G2010A

Prothrombin ist ein Vitamin-K-abhängig synthetisierter Gerinnungsfaktor. Die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Weges der Blutgerinnung resultiert in einer Aktivierung des Prothrombin zu Thrombin.

Thrombin initiiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und führt damit zur Ausbildung eines stabilen Fibrinthrombus. (MEEKS, ABSHIRE, 2008)

Die Prothrombin G2010A-Mutation führt zu einem etwa 30% höheren Prothrombinplasmaspiegel und ist die zweithäufigste Ursache für eine hereditäre Thrombose. In der Literatur finden sich einzelne Fallberichte anderer Punktmutationen des Prothrombingens, die allerdings sehr selten auftreten und vor allem unter Kaukasiern eine Rarität darstellen. (FLAUJAC et al., 2007)

Die heterozygote Mutation findet sich bei etwa 7% aller Patienten mit mindestens einem thrombembolischen Ereignis in der Anamnese. (POORT et al., 1996)

In einer gesunden mitteleuropäischen Bevölkerung liegt die Prävalenz bei etwa 2%. Homozygote Mutationsträger sind sehr selten und in der Literatur finden sich nur einzelne Fallberichte. Diese deuten allerdings auf ein deutlich erhöhtes Risiko für Thrombembolien unter den homozygoten Mutationsträgern mit teilweise fulminanten Verläufen hin. (BOSLER et al., 2006)

Vergleicht man Daten verschiedener europäischer Zentren, findet sich eine vom Süden nach Norden abnehmende Prävalenz. (ROSENDAAL et al., 1998; ZIVELIN et al., 1998)

Während das Vorliegen einer heterozygoten Prothrombinmutation als milder Risikofaktor einer Thrombose gilt, ist vor allem die Kombination der heterozygoten Prothrombin G2010A- und einer FVL-Mutation ein signifikanter Risikofaktor. (DE STEFANO et al., 1999; ZOLLER et al., 1998) Träger beider Mutationen haben ein 20fach höheres Risiko, eine Thrombembolie zu erleiden. (EMMERICH et al., 2001) Ebenso ist das gleichzeitige Vorliegen weiterer Risikofaktoren entscheidend. So besteht bei Frauen bei gleichzeitiger Einnahme von Kontrazeptiva ein deutlich erhöhtes Risiko eine Sinusvenenthrombose zu entwickeln. (MARTINELLI et al., 1998) Für das Auftreten einer Lungenembolie scheint das Risiko besonders in der Schwangerschaft und dem Puerperium hoch. Eine unprovizierte Lungenembolie scheint bei isolierten heterozygoten Trägern der Prothrombinmutation nicht signifikant häufiger aufzutreten. (KOVAC et al., 2010)

Die Prothrombin G2010A-Mutation ist eine Punktmutation, bei der im uncodierten Bereich des Prothrombingens Guanin durch Adenin ersetzt wird. Prothrombin initiiert nach Aktivierung in Thrombin die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Für die Aktivierung des Prothrombins ist die Ausbildung eines Prothrombinasekomplex aus Faktor Va, Faktor Xa, Phospholipiden und Kalzium nötig. (ESMON, JACKSON, 1974; HELDEBRANT et al., 1973)

Neben diesem direkten Einfluss auf die Ausbildung eines Thrombus hat Thrombin weitreichende modulierende Einflüsse auf die Koagulation und die Fibrinolyse.

Im Sinne einer positiven Rückkopplung werden die Faktoren V, VII und VIII, XI und XIII aktiviert. (LANE et al., 2005)

Im Sinne einer negativen Rückkopplung wird durch die Bindung an das von Endothelzellen exprimierte Thrombomodulin Protein C aktiviert, das wiederum die Konversion von Prothrombin zu Thrombin hemmt.

Der Thrombin-Thrombomodulin-Komplex hemmt gleichzeitig durch Aktivierung des thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin und damit die Fibrinolyse. (NESHEIM, 2003)

Thrombin stimuliert außerdem die Fibroblasten und glatten Muskelzellen, dies soll nach Verletzung der Intima die Defektheilung beschleunigen (BAR-SHAVIT et al., 1990; DE RIDDER et al., 2016) und stimuliert über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor die Thrombozyten (BRASS, 2003; VU et al., 1991)

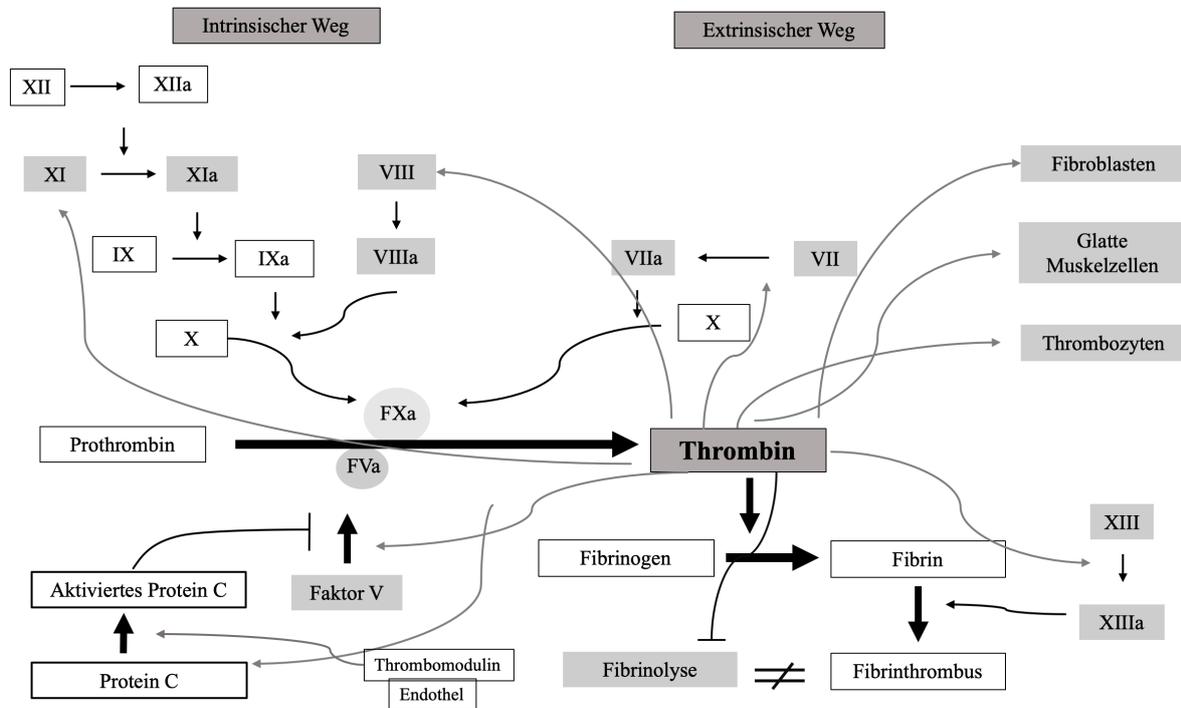


Abbildung 2: Einflüsse des Thrombin auf die Gerinnung

2.7 Methylentetrahydrofolatreduktase C677T und A1298C

Die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ist ein Schlüsselenzym des Homocysteinstoffwechsels. Zwei häufige Punktmutationen an Position 677 und 1298 führen zu einem erhöhten Homocysteinspiegel, der einen wichtigen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt.

Beim MTHFR C677T- und A1298C-Polymorphismus handelt es sich um Einzelnukleotid-Mutationen, bei denen jeweils ein Cytosin an Position 677 durch ein Thymin bzw. ein Adenin an Position 1298 durch ein Cytosin ersetzt werden. (ROZEN, 2000)

Methionin ist eine essenzielle Aminosäure und wird im Stoffwechsel unter anderem als Donor für Methylierungen benötigt. Durch die Abgabe einer Methylgruppe entsteht Homocystein, das wegen seiner endothelschädigenden Wirkung rasch wieder zu Methionin regeneriert oder abgebaut und renal ausgeschieden wird. (FRIEDMAN et al., 2001)

Die Regeneration kann entweder durch Transfer einer Methylgruppe vom Betain erfolgen oder durch den Tetrahydrofolatstoffwechsel. Hierbei regeneriert die MTHFR das hierbei verbrauchte 5-Methyl-Tetrahydrofolat (MTHF). MTHF überträgt eine Methylgruppe auf Homocystein, wodurch dieses in Methionin umgewandelt wird. (MINER et al., 1997)

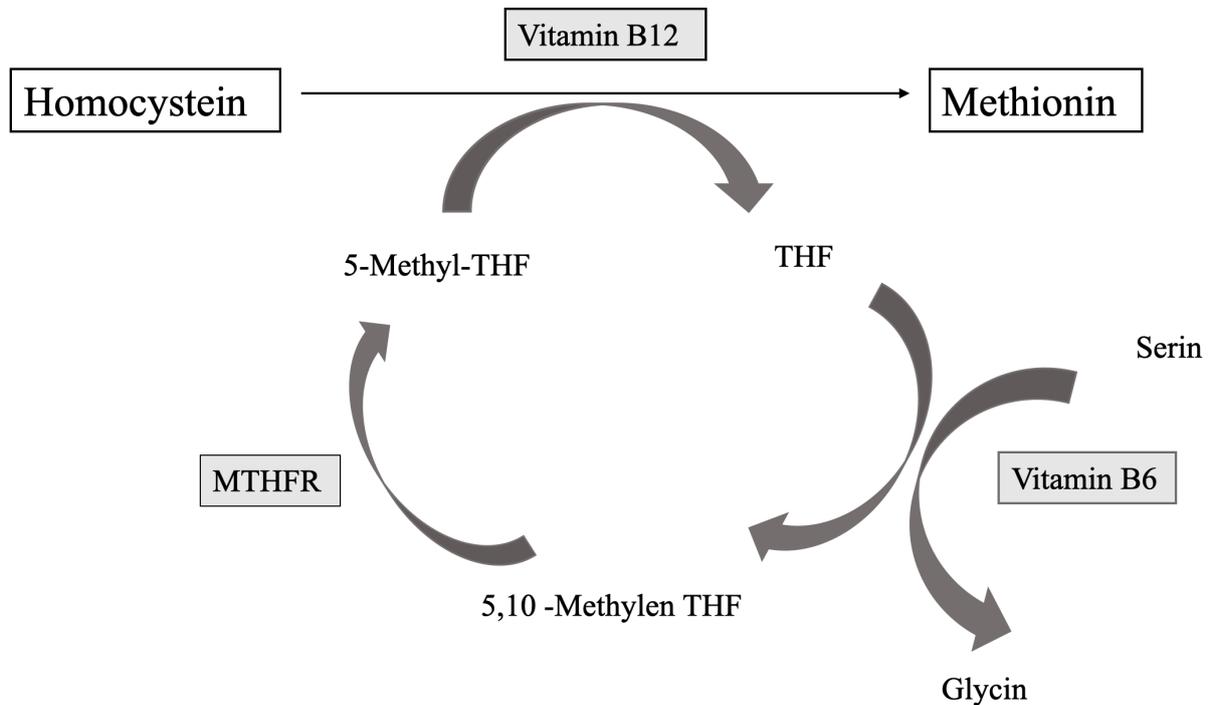


Abbildung 3: Funktion der MTHFR

Die beiden Punktmutationen im MTHFR-Gen können neben anderen Ursachen zu erhöhten Homocysteinspiegeln führen. Hierzu zählen unter anderem Störungen in anderen Stoffwechselwegen des Methioninstoffwechsels, wie beispielsweise bei der Homocysteinämie oder ein Mangel an Vitamin B12, B6 und Folsäure sowie eine chronische Niereninsuffizienz. (DE BREE et al., 2003a; DE BREE et al., 2003b; FRIEDMAN et al., 2001)

Der Referenzwert des Homocysteins im Serum liegt bei 6-12 µmol/Liter, besonders Werte ab 15 µmol/Liter sind mit einer höheren Inzidenz von thrombembolischen und ischämischen Ereignissen assoziiert. Eine milde Erhöhung des Plasmahomocysteinspiegels findet sich bei 5-7% der gesunden Bevölkerung. (DEN HEIJER et al., 1996; MCCULLY, 1996; OCAL et al., 1997)

Hohe Homocysteinspiegel beeinflussen die Hämostase und die Atherogenese durch mehrere Pathomechanismen. LDL wird erhöht und es kommt zu einer vermehrten Bildung von Schaumzellen sowie zur Bildung von Sauerstoffradikalen.

Homocystein führt außerdem zu einer Aktivierung der Thrombozyten mit einer gesteigerten Expression von Membranoglykoproteinen und Freisetzung von Thromboxan-A₂. (HARPEL et al., 1996; HERTFELDER et al., 2004; MCCULLY, 1996)

Intrazelluläre Anreicherung vom Homocystein führt zu einem Untergang von Endothelzellen, die endothelständiges Thrombomodulin exprimieren. Thrombomodulin wirkt aktivierend auf Protein C und so inhibitorisch auf die Gerinnungsfaktoren V und VII. Diese negative Rückkoppelung durch das Thrombomodulin fällt beim Untergang der Endothelzellen weg.

Die beiden Mutationen an Stelle 677 und 1298 führen zu einer geminderten Aktivität der MTHFR und somit zu erhöhten Plasmahomocysteinspiegeln. So haben die homozygoten Träger der MTHFR C677T-Mutation nur etwa 35% Restaktivität. Die geminderte Enzymaktivität kann teilweise durch eine hohe Folsäureaufnahme ausgeglichen werden, sodass das tatsächliche Thrombembolierisiko vor allem bei gleichzeitigem Folsäuremangel erhöht ist. (KLERK et al., 2002)

Die Punktmutation an Position 1298 führt dagegen zu einem thermostabilen Enzym, das bei isolierten Merkmalsträgern kaum Auswirkungen auf den Homocysteinspiegel hat und nur bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren zu erhöhtem Plasmahomocystein führt. (WEISBERG et al., 1998)

Die beiden Mutationen sind in der kaukasischen Bevölkerung sehr weit verbreitet. Beim MTHFR C677T wird von 10-15% homozygoten Mutationsträgern und beim MTHFR A1298C von etwa 10% ausgegangen. (ROZEN, 2000) Insgesamt besteht ein Nord-Süd-Gefälle, so ist die Prävalenz beispielsweise bei Afrikanern deutlich niedriger, Träger der Mutationen finden sich aber weltweit. (SCHNEIDER et al., 1998; STEVENSON et al., 1997)

Bei Patienten, die gleichzeitig heterozygote Träger beider Punktmutationen sind, liegt ebenfalls eine milde Homocysteinämie vor. Diese sogenannte Compound-Mutation findet sich bei etwa 20% der kaukasischen Bevölkerung. Betroffene weisen eine etwa 50-60 prozentige Restaktivität des Enzyms vor. Homozygote Träger beider Mutationen sind in der Literatur nicht beschrieben. Das Vorliegen einer homozygoten und heterozygoten Mutation ist sehr selten. (THIRUMARAN et al., 2005; VAN DER PUT et al., 1998; WEISBERG et al., 1998)

Die genetische Diagnostik der MTHFR-Mutationen im Rahmen der Thrombophiliediagnostik wird immer wieder kritisch diskutiert, da ein erhöhtes Risiko für Thrombembolien letztlich durch den erhöhten Homocysteinspiegel ausgelöst wird. Dieser wird neben der Genetik auch durch Ernährung und andere Faktoren beeinflusst, sodass die Bestimmung des Homocysteinspiegels ein besserer Indikator für das tatsächliche kardiovaskuläre Risiko zu sein scheint. Außerdem zeigen mehrere Studien, dass ein gezieltes Senken des Homocysteins, z. B.

mittels Substitution von Folsäure oder Vitamin B 12 in der Sekundärprophylaxe, nicht zu einer Reduktion thrombembolischer Ereignisse führt. (DEN HEIJER et al., 2007)

2.8 PAI 4G/5G

Der plasminogen activating inhibitor (PAI) gehört zu den Serinproteasen und stellt den wichtigsten Inhibitor der Fibrinolyse beim Menschen dar. (BINDER et al., 2002)

Das auf Chromosom 7 lokalisierte Gen für PAI-1 weist einen häufigen Polymorphismus auf, bei dem es in der Promotorregion zu einer Repetition von 4 bzw. 5 Guaninbasen kommt und der mit erhöhten PAI-1 Serumleveln einhergeht.

Es gibt beim Menschen zwei Subformen des PAI (PAI-1 und PAI-2), wobei PAI-2 in der Plazenta gebildet wird und nur während der Schwangerschaft eine Bedeutung hat.

Das PAI-1 wird dagegen von diversen Zellreihen wie Endothelzellen, Makrophagen, Hepatozyten, Thrombozyten und in viszeralen Adipozyten exprimiert und durch verschiedene Mechanismen wie Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. (CESARMAN-MAUS, HAJJAR, 2005)

Die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystem führt zur Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin und somit zur Ausbildung eines stabilen Thrombus. Plasmin ist eine Serinprotease, die nach der Aktivierung des Vorläuferproteins Plasminogen Fibrin spaltet und so die Fibrinolyse initiiert.

Die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin wird durch verschiedene Aktivatoren beeinflusst. Hierzu zählen der Gewebsplasminogenaktivator (tPA) und der Urokinaseplasminogenaktivator (uPA), Streptokinase, Fibrin selbst im Sinne einer Rückkopplung und der Gerinnungsfaktor XII. Die beiden spezifischen Plasminogenaktivatoren (tPA, uPA) werden wiederum vom PAI-1 durch irreversible Komplexbildung gehemmt. (IWAKI et al., 2012)

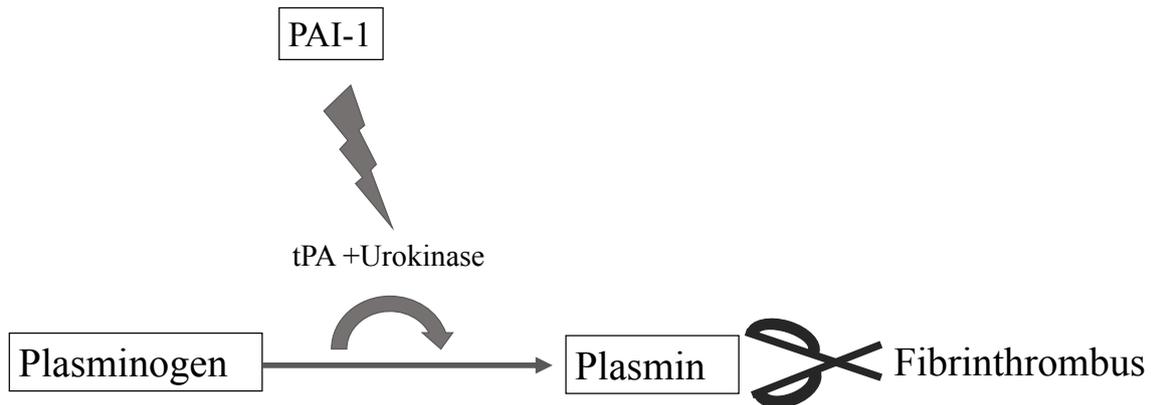


Abbildung 4: Rolle des PAI-1

Erhöhte Plasmawerte von PAI -1 gehen mit einer verminderten Fibrinolyse einher.

Bei dem PAI-1-Polymorphismus 4G/5G handelt es sich um eine häufige Deletion/Insertion an Position 675 in Transkriptionsrichtung, die in der Promotorregion des Enzyms liegt. Bei Vorliegen von vier Guaninbasen kommt es zu einer vermehrten Transkription und damit zur höheren PAI-1-Aktivität im Blutplasma. (ERIKSSON et al., 1995)

Die Prävalenz des 4G/4G-Genotypen (homozygote Mutation) liegt bei etwa 30% unter Mitteleuropäern. Etwa 45 % sind heterozygot. (SERRANO, 2007; TSANTES et al., 2007; ZHANG et al., 2014)

Viele Studien deuten darauf hin, dass homozygote Mutationsträger besonders bei gleichzeitigem Vorliegen anderer Gerinnungsstörungen ein leicht erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse haben. Hierzu zählen auch die FVL-Mutation und die Prothrombinmutation G2010A. (SARTORI et al., 2003)

Einige Studien konnten diesen Zusammenhang jedoch nicht zeigen, sodass die Risikobewertung in Hinblick auf Thrombembolien noch nicht abschließend geklärt scheint. (RIDKER et al., 1997)

2.9 Fragestellung

Mikrothromben finden sich sowohl bei der PAH als auch bei der CTEPH. Bei der CTEPH stellen Makrothrombosen wahrscheinlich sogar den initialen Pathomechanismus dar, der zur Entstehung der Erkrankung führt.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob Mutationen des PAI-1-Gens, des FV-Gens, des Prothrombingens sowie des MTHFR-Gens eine Prädisposition für die Entstehung einer PAH

oder CTEPH darstellen und ob sie Einfluss auf Verlauf oder Prognose haben. Die bisherige Studienlage, die darauf hinweist, dass die FVL- und Prothrombinmutation keinen Risikofaktor einer PH darstellen, beruht auf kleinen Fallzahlen.

3 Patienten und Methodik

3.1 Patienten

3.1.1 Zusammensetzung der Studienpopulation

Um eine möglichst große Studienpopulation zu erreichen, wurden drei Kohorten in die Studie eingeschlossen.

Die erste Gruppe unserer Studienpopulation entstammen einer Datenbank, die das PH-Zentrum in Amsterdam von Patienten mit gesicherter PAH führt. Sie umfasst insgesamt 82 Proben, die auf PAI-1 4G/5G, Prothrombin G2010A, FVL sowie MTHFR C677T und A1298C getestet wurden.

Die zweite Gruppe umfasst Patienten, die sich im Zeitraum von 2009 bis 2012 in der PH-Ambulanz Homburg vorgestellt haben. Die Proben wurden gesammelt, asserviert und von Oktober 2012 bis Dezember 2014 ebenfalls auf die Mutationen MTHFR C677T und A1298C sowie PAI-1 4G/5G, FVL und Prothrombin G20210A untersucht. Auf diese Weise konnten weitere 131 Patienten in die Studie aufgenommen werden.

Die letzte und mit 380 Proben die größte Gruppe sind Patienten, die im Zeitraum zwischen 2012 und 2017 in der Pulmologie des Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) im Rahmen einer PH-Diagnostik ein Thrombophilie-Screening erhalten haben. Es handelt sich hierbei überwiegend um Personen, bei denen der Verdacht einer CTEPH bestand und die zur weiteren Abklärung und Therapieplanung eingewiesen wurden.

Zu allen drei Patientengruppen konnten neben der Genetik klinische Daten wie Rechtsherzkatheter, Echokardiographie, Lungenfunktion, 6-MWD, Blutgasanalyse, NT-proBNP sowie Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) und Kreatinin gesammelt werden. Zusätzlich wurde eine telefonische Verlaufsuntersuchung durchgeführt.

3.1.2 Einteilung

Die gesamte Studienpopulation wurde, angelehnt an die Nizza-Klassifikation der PH von 2013, in Untergruppen von 0-8 eingeteilt. Die Einteilung richtet sich nur nach der Genese der Erkrankung und erfolgte unabhängig von der Herkunft der Proben. Die Anpassung der Einteilung nach Nizza und die Änderung der hämodynamischen Definition von 2018 erfolgte nach Abschluss unserer Datenerhebung und wurde daher in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Gruppe 1-5 entsprechen den jeweiligen Nizza-Gruppen. In der Gruppe 6 wurden Patienten zusammengefasst, bei denen eine kombinierte prä- und postkapilläre PH vorlag. Gruppe 7 beinhaltet Studienteilnehmer, bei denen sich eine kombinierte präkapilläre PH multipler Genese oder eine „Out of Proportion“ PH fand. „Out of Proportion“ bedeutet hierbei eine präkapilläre PH, bei der die Diagnostik zwar eine zugrunde liegende Erkrankung ergab, der mPAP aber hierfür unverhältnismäßig hoch war. Bei diesen Patienten wurde eine multifaktorielle Genese unterstellt, sodass eine eindeutige Einteilung in Gruppe 1-5 nicht möglich war. In der Gruppe 8 wurden Personen zusammengefasst, bei denen ein mPAP von ≥ 25 mmHg nur unter Belastung und nicht in Ruhe bestand und damit nach der alten Definition keine PH vorlag.

Table 5: Einteilung der Gruppen angelehnt an die Nizza-Klassifikation von 2013

Einteilung der Gruppen	
0	Keine PH
1	PAH
2	PH bei Erkrankungen des linken Herzens
3	PH bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie
4	CTEPH
5	PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus
6	kombinierte prä- und postkapilläre PH
7	kombinierte präkapilläre PH multipler Genese oder „out of proportion“
8	nur unter Belastung PAP ≥ 25 mmHg

3.2 Diagnostik

3.2.1 DNS-Extraktion

Die Blutproben aus der PH-Ambulanz wurden nach Abnahme zentrifugiert und bis zur weiteren Diagnostik eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das EDTA-Blut im Verhältnis 1:0,5 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Zur Gewinnung der DNS aus den Proben wurde das QIAamp DNA Mini Kit verwendet. Hierbei wird die DNS der Leukozyten erst durch Lyse des Blutes freigesetzt und an eine spezielle Silicagelmembran gebunden. Nach

mehrfachem Waschen der Membran wird die DNS im letzten Schritt durch Einsatz eines Elutionspuffers von der Membran gelöst und kann so gelagert werden.

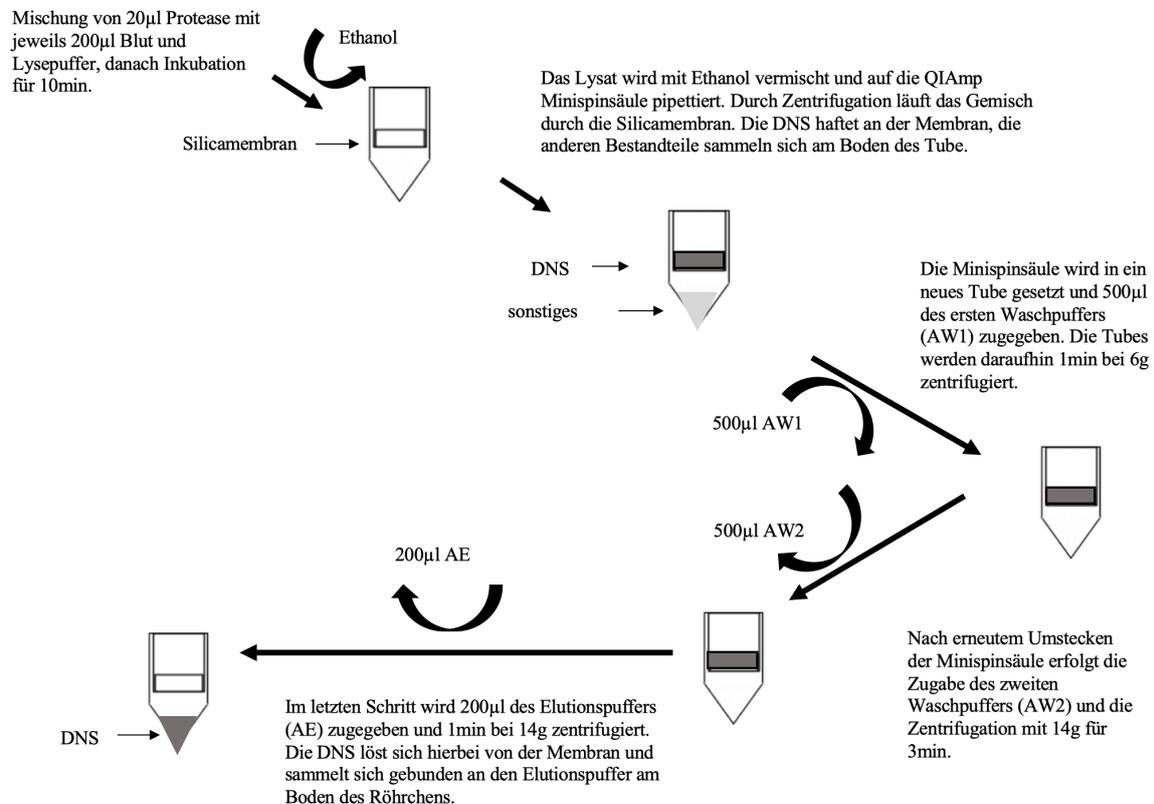


Abbildung 5: DNS-Extraktion

Bei den Patienten, die ihre Thrombophiliediagnostik im Rahmen der Routine erhalten haben, wurde dasselbe Verfahren angewandt, hier erfolgte die Gewinnung jedoch aus nicht zentrifugiertem EDTA-Vollblut, wodurch weniger PBS zugegeben werden muss (1:0,25). Die so extrahierte DNS wurde bis zum weiteren Verwenden eingefroren.

3.2.2 Real Time PCR

Allgemeines

Zur Vorbereitung der Sequenzierung erfolgte eine Amplifikation der DNS mittels Real Time PCR.

Die verwendeten Primer für die PCR und die Sequenzierung stammen von Invitrogen. Die Primerstammlösungen liegt hierbei in einer Konzentration von 100pmol/µl vor. Die Primerstammlösungen des Forward- und Reverse-Primer werden auf 10pmol/µl, die

Stammlösung des Sequenzierprimer wird auf 0,4pmol/μl mittels Annealing-Buffer verdünnt. Pro Durchlauf wurden 11 Proben getestet sowie eine Negativkontrolle, bestehend aus PCR-Mastermix ohne DNS, mitgeführt.

Die PCR wurde mittels Mastercycler Eppgradient S (Eppendorf) durchgeführt.

Im Folgendem sind die Primersequenzen, die Zusammensetzung des Mastermix sowie die PCR-Protokolle der einzelnen Mutationen aufgeführt.

MTHFR C677T

Tabelle 6: Primersequenzen MTHFR C677T (FRANCES et al., 2005)

Forward-Primer (100pmol/μl)	TTG AGG CTG ACC TGA AGC AC
Reverse-Primer (100pmol/μl)	Biotin-GTG ATG CCC ATG TCG GTG
Sequenzierprimer (100pmol/μl)	GGT GTC TGC GGG AG

Tabelle 7: PCR-Mastermix MTHFR C677T, entspricht 44μl/Probe

PCR-Reaktionspuffer (10x konzentriert + MgCl ₂)	5μl
NTP-Mix (2,5mM)	5μl
MgCl₂	1μl
Forward-Primer (Invitrogen)	1μl
Reverse-Primer (Invitrogen)	1μl
Taq-DNS-Polymerase	0,3μl
H₂O für Molekularbiologie , Mol Bio Grade	30,7 μl
Benötigte DNS	6-10 μl

Tabelle 8: PCR-Protokoll MTHFR C677T

Einsatz	44µl Mastermix; 6µl DNS
Programmablauf	2min 94°C 30s 94°C 45s 59°C 30s 72°C } 36 Zyklen
	10 min 72°C
	Hold 4°C

MTHFR A1298C

Tabelle 9: Primersequenzen MTHFR A1298C

Forward-Primer (100pmol/µl)	Biotin-TAC CTC TTC TAC CTG AAG AGC
Reverse-Primer (100pmol/µl)	ACT TTG TGA CCA TTC CGG TTT G
Sequenzierprimer (100pmol/µl)	AAA GAC TTC AAA GAC ACT

Tabelle 10: PCR-Mastermix MTHFR A1298C, entspricht 44µl/Probe

PCR-Reaktionspuffer (10x konzentriert + MgCl ₂)	5µl
NTP-Mix (2,5mM)	5µl
MgCl₂	1µl
Forward-Primer (Invitrogen)	1µl
Reverse-Primer (Invitrogen)	1µl
Taq-DNS-Polymerase (Eppendorf)	0,3µl
H₂O für Molekularbiologie , Mol Bio Grade	30,7µl
Benötigte DNS	6µl

Tabelle 11: PCR-Protokoll MTHFR A1298C

Einsatz	44µl Mastermix; 6µl DNS
Programmablauf	2min 94°C 30s 94°C 45s 52°C 30s 72°C } 36 Zyklen 10min 72°C Hold 4°C

PAI-1 4G/5G

Tabelle 12: Primersequenzen PAI-1 4G/5G (FRANCES et al., 2005)

Forward-Primer (100pmol/µl)	Biotin- GGC ACA GAG AGA GTC TGG ACA C
Reverse-Primer (100pmol/µl)	CGC CTC CGA TGA TAC ACG
Sequenzierprimer (100pmol/µl)	ACA CGG CTG ACT CCC

Tabelle 13: PCR-Mastermix PAI-1 4G/5G, entspricht 44µl/Probe

PCR-Reaktionspuffer (10x konzentriert + MgCl ₂)	5µl
NTP-Mix (2,5mM)	5µl
MgCl₂	-
Forward-Primer (Invitrogen)	1,5µl
Reverse-Primer (Invitrogen)	1,5µl
Taq-DNS-Polymerase (Eppendorf)	0,3µl
H₂O für Molekularbiologie , Mol Bio Grade	30,7µl
Benötigte DNS	6µl

Tabelle 14: PCR-Protokoll PAI-1 4G/5G

Einsatz	44µl Mastermix; 6µl DNS
Programmablauf	2min 94°C 30s 94°C } 45s 54°C } 36 Zyklen 30s 72°C } 10 min 72°C Hold 4°C

Faktor-V-Leiden

Tabelle 15: Primersequenzen FVL (FRANCES et al., 2005)

Forward-Primer (100pmol/µl)	GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC
Reverse-Primer (100pmol/µl)	Biotin-TCT CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA
Sequenzierprimer (100pmol/µl)	TAA GAG CAG ATC CCT GGA CAG

Tabelle 16: PCR-Mastermix FVL

PCR-Mastermix FVL, entspricht 44 µl	
PCR-Reaktionspuffer (10x konzentriert + MgCl ₂) (Roche)	5µl
NTP-Mix (2,5mM) (Roth)	5µl
MgCl₂	1µl
Forward-Primer (Invitrogen)	1µl
Reverse-Primer (Invitrogen)	1µl
Taq-DNS-Polymerase (Eppendorf)	0,3µl
H₂O für Molekularbiologie (Mol Bio Grade)	30,7µl
Benötigte DNS	6µl

Tabelle 17: PCR-Protokoll FVL

Einsatz	44µl Mastermix; 6µl DNS
Programmablauf	2min 94°C 30s 94°C 45s 55°C 30s 72°C <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-left: 10px;"> } 36 Zyklen </div> 10min 72°C Hold 4°C

Prothrombin G2010A

Tabelle 18: Primersequenzen Prothrombin G2010A (FRANCES et al., 2005)

Forward-Primer (100pmol/µl)	Biotin-CCT GAA GAA GTG GAT ACA GAA GG
Reverse-Primer (100pmol/µl)	CAG TAG TAT TAC TGG CTC TTC CTG A
Sequenzierprimer (100pmol/µl)	AGC ACT GGG AGC ATT GAG GC

Tabelle 19: PCR-Mastermix Prothrombin G2010A, entspricht 44 µl/Probe

PCR-Reaktionspuffer (10x konzentriert + MgCl ₂) (Roche)	5µl
NTP-Mix (2,5mM) (Roth)	5µl
MgCl₂	1µl
Forward-Primer (Invitrogen)	1µl
Reverse-Primer (Invitrogen)	1µl
Taq-DNS-Polymerase (Eppendorf)	0,3µl
H₂O für Molekularbiologie Mol Bio Grade	30,7µl
Benötigte DNS	6µl

Tabelle 20: PCR-Protokoll Prothrombin G2010A

Einsatz	44µl Mastermix; 6µl DNS
Programmablauf	2min 94°C 30s 94°C } 45s 58°C } 36 Zyklen 30s 72°C } 10 min 72°C Hold 4°C

3.2.3 Pyrosequenzierung mittels Pyromark Q96

Die 1998 erstmals von Mostafa Ronaghi, Mathias Uhlén und Pål Nyrén vorgestellte Methode zur Genanalyse mittels Pyrosequenzierung ist mittlerweile ein Standardverfahren in der modernen genetischen Diagnostik. (RONAGHI et al., 1998)

Bei dem Verfahren wird ein komplementärer DNS-Strang synthetisiert, in dem die Nukleotide entsprechend der Reihenfolge des zu untersuchenden Gens zugeführt werden. Der Einbau wird mittels Freisetzung von Licht gemessen und grafisch dargestellt.

Vor Beginn der Sequenzierung wird den Proben der spezifische Sequenzierprimer sowie DNS-Polymerase zugeführt, es bildet sich der für die Synthese nötige DNS-Protein-Komplex. Da noch keine Nukleotide zugesetzt sind, kann keine Elongation stattfinden. Zusätzlich werden den Proben die im Verlauf benötigten Enzyme, ATP-Sulfurylase, Luziferase und Apyrase sowie das Substrat Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) zugeführt.

Das Gerät pipettiert im nächsten Schritt die Nukleotide entsprechend der Basenfolge des zu untersuchenden DNS-Abschnittes auf die Proben. Die Nukleotide werden von der DNS-Polymerase komplementär zu dem vorliegenden Template in den wachsenden neuen Strang eingebaut. Für jedes eingebaute Nukleotid wird Pyrophosphat (P_{Pi}) freigesetzt.

Das entstehende Pyrophosphat wird durch die ATP-Sulfurylase mit APS zu Adenosin- 5'-Triphosphat (ATP) umgewandelt.

Das freigesetzte ATP reagiert mit Luziferin katalysiert durch die Luziferase zu Oxoluziferin, wobei Licht freigesetzt wird, welches mittels einer CCD-Kamera gemessen werden kann.

Das freigesetzte P_{Pi} und damit auch das emittierte Licht, ist direkt proportional zu der Anzahl der eingebauten Nukleotide.

Nicht eingebaute Nukleotidreste werden durch die Apyrase abgebaut, sodass sie für die weitere Elongation nicht mehr verwendet werden können.

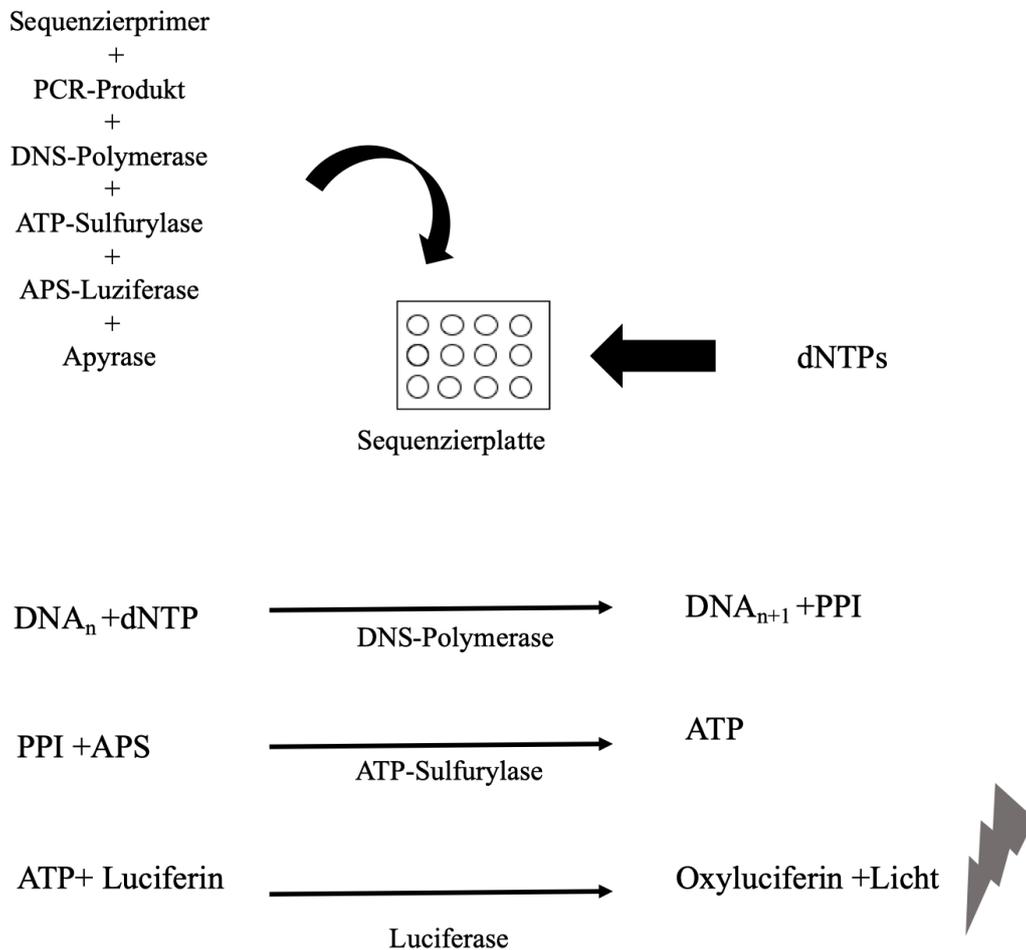


Abbildung 6: Pyrosequenzierung

Beim benutzten Gerät, dem Pyromark Q96 (Qiagen), läuft die Sequenzierung automatisiert ab. Die Proben werden vor der Analyse durch das Gerät durch Streptavidin-Sepharose immobilisiert und mittels eines speziellen Vakuumgerätes mehrfach gewaschen.

Zum Binden der DNS an die Streptavidin-Sepharose werden die PCR-Produkte zusammen mit einem Mastermix auf eine verschließbare Platte gegeben.

Die PCR-Platte wird dann verschlossen und bei Raumtemperatur auf einer Wackelplatte für 5-10 Minuten inkubiert.

Das sich bildende Sediment entspricht der Streptavidin-Sepharose mit dem gebundenen PCR-Produkt und wird im nächsten Schritt mithilfe eines speziellen Vakuumgerätes von der Platte gehoben.

Die so an den Zapfen der Vakuumplatte hängenden Proben werden in verschiedene Lösungen zur Reinigung getaucht und danach auf die Sequenzierplatte gesetzt.

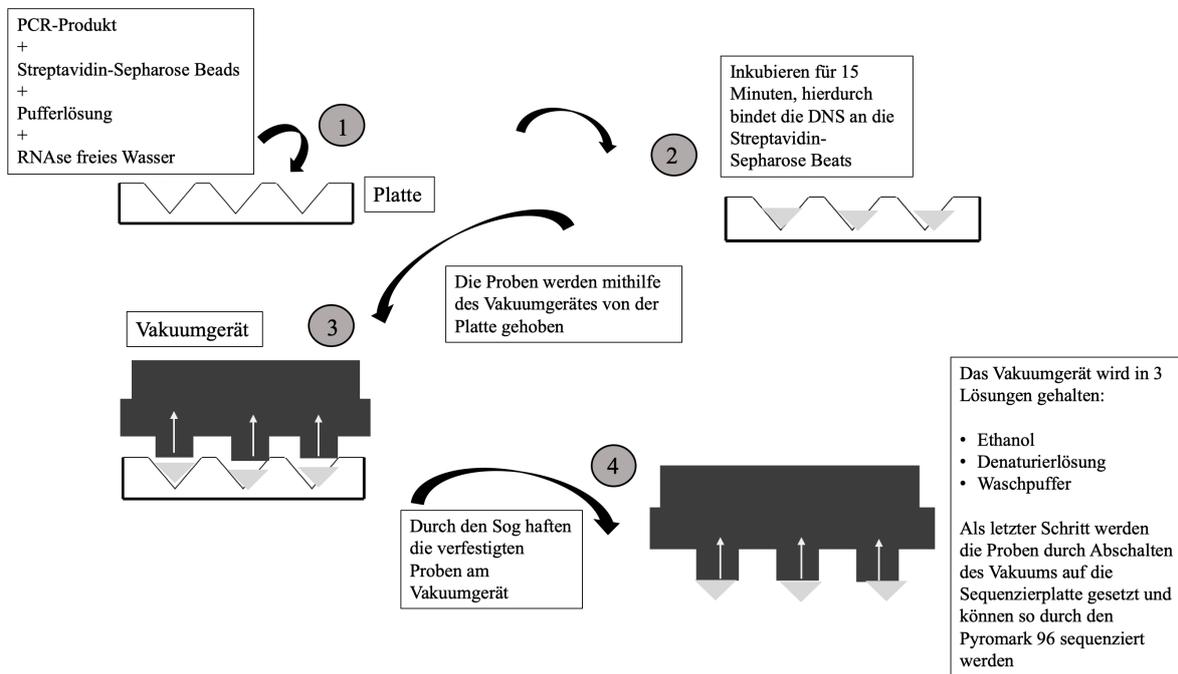


Abbildung 7: Vorbereitung der Sequenzierung mittels Vakuumgerät

Die Sequenzierung der so vorbereiteten Proben erfolgt durch den Pyromark automatisiert, indem alle benötigten Enzyme, Substrate und Nucleinsäuren auf die Proben pipettiert werden. Die Reihenfolge der pipettierten Nucleinsäure ergibt sich aus dem zu untersuchenden DNS-Abschnitt. Die Auswertung erfolgt durch die Messung der Lichtfreisetzung bei Einbau der dazugegebenen Nucleinsäure durch die CCD-Kamera. Das Protokoll für PAI-1 4G/5G, FVL, Prothrombin und die beiden MTHFR-Mutationen ist identisch und in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Protokoll Pyrosequenzierung

Probeneinsatz	30µl PCR-Produkt
Reagenz	PyroMark Gold Q96 Reagenz
Mastermix (50µl)	Binding Buffer 37µl Streptavidin-Sepharose 3µl Wasser (Molecular Biology Grade) 10µl
Protokoll	<ol style="list-style-type: none"> 1. 30µl PCR-Produkt und 50µl Mastermix auf 96 Well Multiply PCR-Platte pipettieren, bei 1400rpm/23°C, 5min mittels Thermomixer mischen 2. Low Plate Sequenzierplatte mit jeweils 40µl Sequenzierprimer vorbereiten 3. Anheben der Proben mittels Vacuum Prep Worktable (Vakuumgerät) hiernach jeweils für: 5s in 70% Ethanol 7s in Denaturierlösung 5s in Waschpuffer halten. 4. Vakuumgerät über Sequenzierplatte abschalten, lösen der Sepharosebeats durch leichtes abschütteln 5. Inkubation der Sequenzierplatte bei 70° für 3 Minuten 6. Abkühlen auf Raumtemperatur und Sequenzierung mittels PSQ96 MA
Reagenzkartusche	Befüllen nach Belegungsplan mit Nukleotiden, Substrat und Enzym. Die benötigte Menge wird anhand der Probenzahl vom Gerät errechnet.

Die vorbereitete Kartusche mit den benötigten Reagenzien und die Platte mit den gebundenen PCR-Produkten werden in das Gerät eingesetzt. Die Nukleotide werden gemäß der Reihenfolge der Sequenzen der Mutationen pipettiert (zur leichteren Auswertung wird in einigen Sequenzen eine „Leerposition“ ergänzt). Im Folgenden sind die eingesetzten Sequenzierprimer, die analysierte DNS-Sequenz sowie die Kriterien der Auswertung zu den einzelnen Mutationen aufgeführt.

Tabelle 22: Primersequenz, Pipettiersequenz und Auswertung für Pyrosequenzierung für PAI 4G/5G

PAI 4G/5G	Primer	ACA CGG CTG ACT CCC (Invitrogen)	
	DNS-Sequenz	C(C)ACGTG (reverser Strang)	
	Pipettiersequenz	GCGACGTG Fett = Leerposition	
	Auswertung	Wildtyp (5G/5G)	Peakhöhe C in Position 2 entspricht 200% der Peakhöhe C in Position 5
		Heterozygot (4G/5G)	Peakhöhe C in Position 2 entspricht 150% der Peakhöhe C in Position 5
		Homozygot (4G/4G)	Peakhöhe C in Position 2 entspricht 100% der Peakhöhe C in Position 5

Tabelle 23: Primersequenz, Pipettiersequenz und Auswertung für Pyrosequenzierung für FVL

FVL	Primer	TAA GAG CAG ATC CCT GGA CAG (Invitrogen)	
	DNS-Sequenz	GC(G/A)AGAAT	
	Pipettiersequenz	TGC(G/A)CGAT Fett = Leerposition	
	Auswertung	Wildtyp (G/G)	G-Peak in Position 4 entspricht A-Peak in Position 5
		Heterozygot (G/A)	G-Peak in Position 4 entspricht 1/3 des A-Peak in Position 5
		Homozygot (A/A)	A-Peak in Position 5 entspricht A-Peak in Position 8

Tabelle 24: Primersequenz, Pipettiersequenz und Auswertung für Pyrosequenzierung für Prothrombin

Prothrombin	Primer	AGC ACT GGG AGC ATT GAG GC (Invitrogen)	
	DNS-Sequenz	T(T/C)GCTGA) (reverser Strang)	
	Pipettiersequenz	(A(T/C)TGCTGA) Fett = Leerposition	
	Auswertung	Wildtyp (G/G)	C-Peak in Position 3 entspricht T in Position 2
		Heterozygot (G/A)	C-Peak in Position 3 entspricht 1/3 T-Peak in Position 2
		Homozygot (A/A)	Kein C-Peak in Position 3

Tabelle 25: Primersequenz, Pipettiersequenz und Auswertung für Pyrosequenzierung für MTHFR A1298C

MTHFR A1298C	Primer	AAA GAC TTC AAA GAC ACT (Invitrogen)	
	DNS-Sequenz	T(T/G)CTTCAC (reverser Strang)	
	Pipettiersequenz	A(T/G)ACTCAC Fett = Leerposition	
	Auswertung	Wildtyp (A/A)	T-Peak in Position 2 entspricht doppeltem C-Peak in Position 5
		Heterozygot (A/C)	G-Peak in Position 3 entspricht 1/3 T-Peak in Position 3
		Homozygot (C/C)	T-Peak in Position 2 und G in Position 3 sind identisch

Tabelle 26: Primersequenz, Pipettiersequenz und Auswertung für Pyrosequenzierung für MTHFR C677T

MTHFR C677T	Primer	GGT GTC TGC GGG AG (Invitrogen)	
	DNS-Sequenz	(T/C)CGATTTCAT(reverser Strang)	
	Pipettiersequenz	GTCTGATCA Fett = Leerposition	
	Auswertung	Wildtyp (C/C)	Kein T-Peak in Position 2
		Heterozygot (C/T)	T-Peak in Position 2 entspricht C-Peak in Position 3
		Homozygot (T/T)	T-Peak in Position 2 entspricht 1/3 T-Peak in Position 7

3.2.4 Schmelzkurvenanalyse

Bei den Proben aus Amsterdam und aus der PAH-Ambulanz erfolgte die Mutationsanalyse durch Pyrosequenzierung. Bei den Patienten, die das Thrombophiliescreening im Rahmen der Routinediagnostik erhalten haben, wurde die Genotypisierung der Mutationen PAI-1 4G/5G, FVL und Prothrombin G2010A mittels einer Schmelzkurvenanalyse mit dem Lightcycler (Roche) durchgeführt. Für MTHFR wurde ebenfalls die oben beschriebene Sequenzierung verwendet.

Die Schmelzkurvenanalyse wurde kurz vor Beginn der Studie für die Diagnostik der drei Mutationen im Zentrallabor des UKS eingeführt, da sie gegenüber der bis dahin verwendeten Pyrosequenzierung schneller ist, weniger Arbeitsschritte enthält und somit in der Routine effizienter ist.

Die Sequenzierung stellt jedoch den Goldstandard dar, da seltenere Mutationen wie zum Beispiel die Mutationen A1682C oder G1689A des FV-Gens ebenfalls eine veränderte Schmelzkurve anzeigen, während bei der Pyrosequenzierung das Nukleotid an der fraglichen Position spezifisch nachgewiesen wird.

Vom Hersteller wird eine Übereinstimmung der beiden Verfahren von 99,8 Prozent angegeben. Bei nicht eindeutigen Schmelzkurvenverlauf kann aber ergänzend eine Sequenzierung zur Absicherung erfolgen.

Das Verfahren beruht ebenfalls auf einer real time PCR, bei der spezifische Primer zur Amplifikation eines Abschnittes des untersuchten Gens eingesetzt werden. Zusätzlich wird den Proben ein spezifisches fluoreszierendes Sondenpaar zugesetzt (sog. Hyprobe-Sonden). Die beiden Sonden hybridisieren während der Anealingphase jeweils an spezifische Sequenzen des Amplifikats. Hierdurch liegen die Sonden nahe genug beieinander, sodass ein Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) zwischen den beiden Fluorophoren stattfinden kann, welcher vom Lightcycler gemessen wird. Die Donor-Sonde hybridisiert dabei an den Mutationsbereich und das Akzeptor-Fluorophor bindet an das 5'Ende eines außerhalb der Mutation liegenden Bereiches.

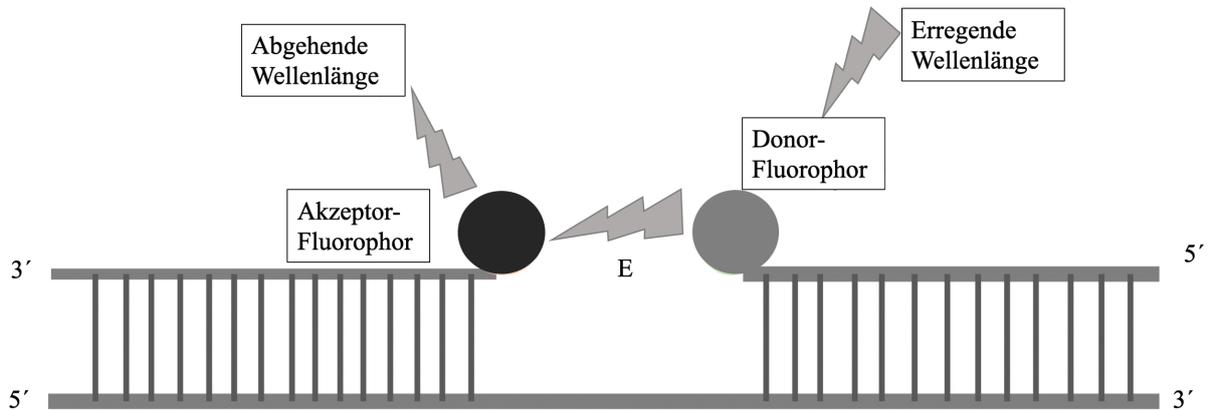


Abbildung 8: FRET durch Hybridisierung der paarigen Sonden

Nach Abschluss an die Amplifikation erfolgt die eigentliche Schmelzkurvenanalyse. Die Proben werden langsam erhitzt, bis es zu einer Dissoziation der Sonden von der Template DNS kommt.

Dies erkennt das Gerät durch eine Abnahme der Emission. Liegt eine Mutation vor, löst sich die Donor-Sonde, die am Mutationsbereich haftet, schneller ab. Beim Vorliegen des Wildtypes kommt es zu einer stabileren Verbindung zwischen Sonde und Mutation, sodass höhere Temperaturen nötig sind, um diese zu trennen. Liegt ein heterozygoter Genotyp vor, ergibt die Schmelzkurvenanalyse entsprechend ein Mischbild mit zwei Schmelzkurvenmaxima.

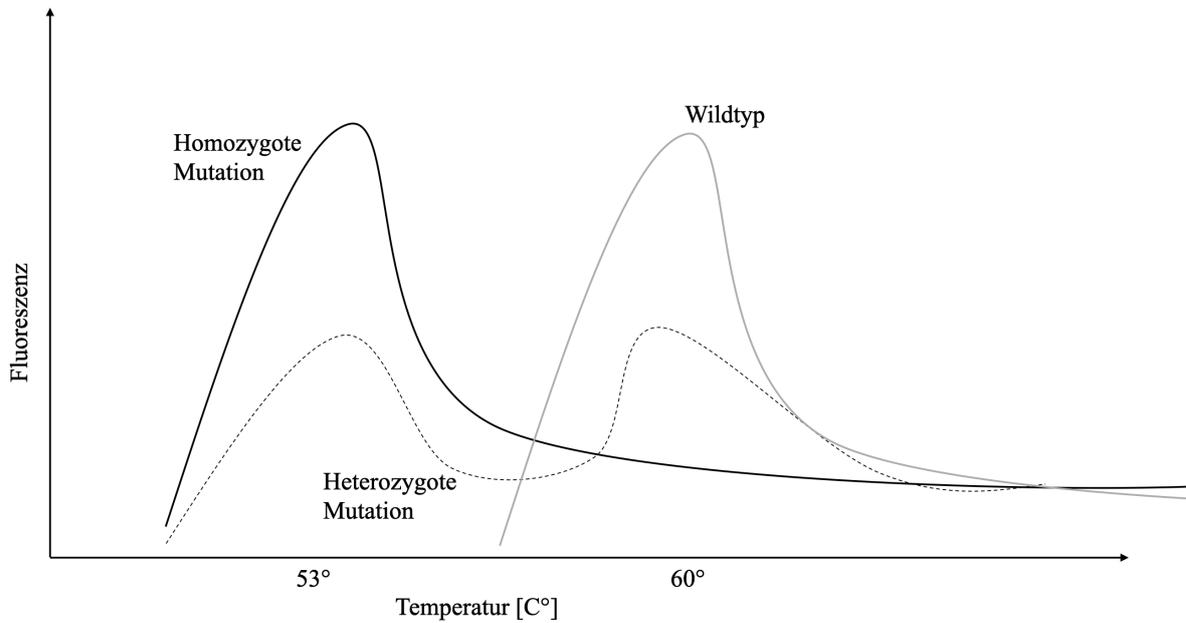


Abbildung 9: Schmelzkurvenverlauf am Beispiel der Prothrombinmutation. Beim Vorliegen der homozygoten Mutation zeigt sich ein Maximum bei 53°C, beim Wildtyp bei 60°C. Beim Vorliegen der heterozygoten Mutation zeigt sich eine Kurve mit zwei Maxima bei beiden Temperaturen

Testung der FVL, Prothrombin und PAI 4G/5G-Mutation mittels Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse der drei Mutationen wurde mittels MutaREAL Real-Time PCR Kit der Firma Roche am Lightcycler durchgeführt.

Das Kit enthält einen Enzymmix und einen Detektionsmix sowie jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle. Aus Detektionsmix und Enzymmix wird ein Mastermix hergestellt, Tabelle 27 zeigt die Zusammensetzung des Mastermixes pro Probe für das jeweilig MutaREAL Kit. Die Menge der Substanzen ist hierbei für das PAI 4G/5G, FVL und das Prothrombinkit identisch.

Tabelle 27: Mastermix für FVL, PAI 4G/5G und Prothrombin

Reagenz	Benötigtes Volumen pro Probe
Detektionsmix	10,5µl
Enzymmix	12, µl

Zu dem Mastermix werden jeweils 2µl der mittels QIAamp extrahierten DNS gegeben. Die Reinheit der DNS sollte zwischen 1,8 und 2 liegen (Absorptionsquotient A260/A280). Es werden pro Durchlauf bis zu 30 Proben plus jeweils eine negativ und positiv Probe getestet. Tabelle 28 zeigt das PCR-Protokoll das für die Analyse der drei Mutationen angewandt wurde.

Tabelle 28: PCR-Protokoll der Schmelzkurvenanalyse für PAI 4G/5G, Prothrombin und FVL

	Temperatur [°C]	Time [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	120	1
Denaturierung	94	10	45
Primer-Annealing	55	25	45
Elongation	72	25	45
Schmelzkurve	94	30	1
	40	30	1
	80	0	1
Abkühlen	40	30	1

Die Differenzierung der Genotypen erfolgt durch Abgleich der spezifischen Schmelzpunkte. So zeigt die Schmelzkurvenanalyse für jeden Genotyp ein typisches Muster mit einem spezifischen Schmelzpunkt oder bei Vorliegen eines heterozygoten Mutationsträgers mit zwei Schmelzpunkten an.

Die jeweiligen Schmelztemperaturen der drei Mutationen unterscheiden sich und sind jeweils in Tabelle 29-31 zusammengefasst.

Tabelle 29: Schmelzpunkte der Prothrombinmutation

	Schmelztemperatur	
Homozygote Mutation		53°C ± 2°C
Heterozygote Mutation	60°C ± 2°C	53°C ± 2°C
Wildtyp	60°C ± 2°C	

Tabelle 30: Schmelzpunkte der FVL-Mutation

	Schmelztemperatur	
Homozygote Mutation		50°C ± 2°C
Heterozygote Mutation	56°C ± 2°C	50°C ± 2°C
Wildtyp	56°C ± 2°C	

Tabelle 31: Schmelzpunkte der PAI 4G/5G-Mutation

	Schmelztemperatur	
Homozygote Mutation		56°C ± 2°C
Heterozygote Mutation	63°C ± 2°C	56°C ± 2°C
Wildtyp	63°C ± 2°C	

3.2.5 Geräte und Materialien

Tabelle 32: Verwendete Geräte

PSQ 96 MA Pyrosequencer (Qiagen; Hilden, Deutschland)
Thermomixer comfort 1,5 ml (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
LightCycler® 1,5 (Roche; Basel, Schweiz)
LightCycler® 1,2 (Roche; Basel, Schweiz)
Autoklav Systec V-75 (Systec GmbH; Linden, Deutschland)
BioPhotometer (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
Mastercycler® Ep Gradient S (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
Heraeus Pico 21 Mikrozentrifuge (Thermo Fischer Scientific; Maltham, Massachusetts, USA)
Vortex-Genie® 2 Mixer (Scientific Industries; Bohemia, New York, USA)

Tabelle 33: Material für die DNS-Extraktion

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland)
Reagent Alcohol 70% (Merck; Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's phosphate buffered saline (PAA Laboratories; Pasching, Österreich)

Tabelle 34: *Material für die PCR*

PCR Buffer (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
Deoxynucleotide triphosphates Mixture (Takara Bio Inc; Kasatsu, Japan)
Desoxynucleosid-Triphosphat (Roche; Basel, Schweiz)
Deoxynucleotide Triphosphates (Promega; Madison, Wisconsin, USA)
Invitrogen Custom Primers (Invitrogen; Carlsbad, Kalifornien USA)
MgCl ₂ (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)
Water Mol Bio Grade (5 Prime; Hamburg, Deutschland)
Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf; Hamburg, Deutschland)

Tabelle 35: *Material für die Sequenzierung*

PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen; Hilden, Deutschland)
Streptavidin Sepharose High Performance Beads (Qiagen; Hilden, Deutschland)
PyroMark Binding Buffer (Qiagen; Hilden, Deutschland)
PyroMark Denaturation Sol. (Qiagen; Hilden, Deutschland)
PyroMark Wash Buffer (Qiagen; Hilden, Deutschland)
PyroMark Annealing Buffer (Qiagen; Hilden, Deutschland)
PyroMark Q96 Sample Prep Thermoplate Low (Qiagen; Hilden, Deutschland)

3.2.6 Rechtsherzkatheter

Die Rechtsherzkatheteruntersuchung stellt den Goldstandard bei der Diagnosesicherung einer PH dar. Die Untersuchung ermöglicht außerdem die Abschätzung des Schweregrades und bringt wichtige Befunde zur Einteilung in die Nizza-Klassen und zur Therapieplanung.

Der Katheter wird entweder transjugulär oder über die Vena basilica eingeführt, oder es wird ein femoraler Zugang verwendet, dann in der Regel in Kombination mit einem Linksherzkatheter. Gemessen wird der Druck im rechten Vorhof und im rechten Ventrikel sowie die Drücke in der Pulmonalarterie. Ergänzend wird außerdem der PCWP bestimmt. Hierbei wird der Katheter in einer distalen Pulmonalarterie bis zum Verschluss des Lumens vorgeschoben. (ROSENKRANZ, PRESTON, 2015)

Der distal des Ballons gemessene Druck entspricht hierbei der Vorlast des linken Herzens. (WILKENS, 2010) Ein erhöhter PCWP (> 15mmHg) ist typisch für Linksherzerkrankungen und spricht für eine postkapilläre PH.

Zum Ausschluss eines Shuntvitiums mit Links-Rechts-Shunt wird eine Etagenoximetrie zur Lokalisierung während der Untersuchung ergänzt. Hierbei wird die Sauerstoffsättigung in Pulmonalarterie, rechtem Ventrikel und Vorhof sowie V. cava superior und inferior bestimmt. Wird zusätzlich ein Linksherzkatheter durchgeführt, kann außerdem die Sauerstoffsättigung der Aorta und des linken Ventrikel bestimmt werden. (LESCHKE et al., 2009)

Bei Patienten mit einer PAH wird außerdem ein Vasoreaktivitätstest mittels NO, einem Prostazyklin-Analogon (z.B inhalativem Iloprost) oder Adenosin durchgeführt. Dies ist unerlässlich, um die Patienten zu differenzieren, die von einer Therapie mittels Kalziumantagonisten profitieren. (GALIE et al., 2009)

Das Herzzeitvolumen wird mittels Thermodilution oder unter Zuhilfenahme des Fickschen Prinzips bestimmt. Bei letzterem Verfahren wird aus der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz und der Sauerstoffaufnahme das Herzzeitvolumen berechnet. Da die exakte Messung der Sauerstoffaufnahme in der Praxis aber meistens zu aufwendig ist, wird hier oft ein Schätzwert benutzt, wodurch die Messung ungenau wird. (HOEPER et al., 1999; LESCHKE et al., 2009)

Aus den gemessenen Werten lässt sich der PVR berechnen:

$$PVR = \frac{mPAP - PCWP}{HZW} \times 80 \text{ [dyn x sek x cm}^{-5}\text{]} \quad \text{Norm: 45-120 dyn x sek x cm}^{-5}$$

Der Normwert des PVR liegt bei 45-120 $\text{dyn x sek x cm}^{-5}$ und ist besonders bei Patienten mit einer PAH um ein Vielfaches erhöht. Neben dem PCWP kann der transpulmonale Gradient (TPG) oder der diastolische Druckgradient (DPG) bei der Unterscheidung in präkapilläre und postkapilläre PH herangezogen werden. Der TPG entspricht der Differenz aus mPAP und PCWP, der DPG entsprechend der Differenz aus diastolischem pulmonal arteriellem Druck (dPAP) und PCWP. (HELD, ROSENKRANZ, 2015)

$$TPG = mPAP - PCWP \quad \text{Norm: } <12 \text{ mmHG}$$

$$DPG = dPAP - PCWP \quad \text{Norm: } <7 \text{ mmHG}$$

Bei einer postkapillären PH besteht ein erhöhter mPAP bei normalem TPG (<12 mmHg) oder DPG (<7 mmHg). (GALIE et al., 2015; HELD, ROSENKRANZ, 2015)

Bei Patienten, bei denen sowohl der TPG oder DPG als auch der PCWP erhöht ist, muss von einer reaktiven oder „out of proportion“ PH ausgegangen werden, die nicht alleine durch eine passive Druckerhöhung im Rahmen einer Linksherzerkrankung zu erklären ist.

Bei allen Patienten der Studie mit einer PAH und einer CTEPH wurde mindestens ein Rechtsherzkatheter zur Diagnosesicherung durchgeführt. Patienten, die ohne Therapie nicht mindestens einen mPAP von 25mmHg erreicht haben, wurden in Gruppe 0 oder 7 eingruppiert und gingen in die weitere Auswertung nicht ein. Aus den gesammelten Befunden der Rechtsherzkatheteruntersuchung wurde der systolische, diastolische und mittlere pulmonal arterielle Druck sowie der PCWP übernommen. Das HZV wurde mithilfe der Thermodilutionsmethode gemessen. Der PVR sowie der DPG wurden aus den genannten Messwerten errechnet. Die Rechtsherzkatheter wurden überwiegend im pulmologisch geführten Rechtsherzkatheterlabor des UKS durchgeführt. Einige Patienten der Studie, die von extern zugewiesen wurden, hatten bereits Vorbefunde vorliegen, welche in diesem Fall für die Studie verwendet wurden. Gerade unter den CTEPH-Patienten war bei einigen zur Planung der Operabilität eine kombinierte Links- und Rechtsherzkatheteruntersuchung notwendig. Bei diesen Patienten erfolgte die Untersuchung durch die Klinik für Kardiologie des UKS.

3.2.7 Einteilung nach Operabilität

Die Patienten mit einer CTEPH wurden in unserer Studie nochmals in operabel und inoperabel unterteilt. Diese Einteilung wurde der klinischen Dokumentation der Herz-Thorax-Konferenz entnommen.

Zur Diagnosesicherung der CTEPH erfolgte eine Ventilations/Perfusionsszintigraphie, die mit einer hohen Sensitivität (bis zu 97%) und Spezifität (bis zu 90-95 %) den Goldstandard darstellt. (TUNARIU et al., 2007) Bei den Patienten mit nachgewiesener CTEPH wurde dann zur Einschätzung der Operabilität und zur Unterscheidung eines peripheren zu einem zentralen Verteilungsmuster eine Pulmonalisangiographie oder CT-Angiographie ergänzt. (KIM et al., 2013) Die CTEPH-Patienten wurden hiernach in operabel und nicht-operabel eingeteilt. Hierbei wurde nicht die tatsächliche Operabilität, die noch von weiteren Faktoren wie Vorerkrankungen, Komorbiditäten und dem Einverständnis des Patienten abhängt, berücksichtigt, sondern die technische Durchführbarkeit einer PEA.

Die Einteilung zur Operabilität unserer Studie wurde aus der Entscheidung der Interdisziplinären Besprechung übernommen. Bei den Patienten, die im Verlauf tatsächlich in unserem Klinikum operiert wurden, wurde das Datum der PEA erfasst.

Da wir in der vorliegenden Arbeit erfassen wollten, ob die Mutationen Einfluss auf die klinische Erscheinungsform der CTEPH haben, wurde die Einteilung in „operabel“ mit einem zentralen Verteilungsmuster und „inoperabel“ mit einem peripheren Verteilungsmuster gleichgesetzt. In Folgendem werden daher die Begriffe zentral und peripher verwendet.

3.2.8 Echokardiographie

Die Echokardiographie hat sich durch ihre leichte Durchführbarkeit und generelle Verfügbarkeit als primäre Screeninguntersuchung in der Diagnostik der PH etabliert. Sie liefert außerdem Hinweise auf funktionelle oder strukturelle Veränderungen im Rahmen einer postkapillären Genese. Hierbei muss jedoch immer bedacht werden, dass eine gut kompensierte oder latente PH übersehen werden kann und die Untersuchung auch teilweise von der Erfahrung des Untersuchers abhängt. (WILKENS, 2010)

Allgemeine Zeichen einer manifesten PH sind eine Dilatation des rechten Vorhofes, des rechten Ventrikel und der V. cava inferior. Der rechte Ventrikel zeigt sich hypertrophiert und bei Inspiration besteht eine verminderte Atemmodulation der V. cava inferior.

Das Ventrikelseptum zeigt sich abgeflacht und gegebenenfalls mit paradoxer Bewegung. (LESCHKE et al., 2009)

Der systolische pulmonal arterielle Druck (sPAP) sowie der systolische rechtsventrikuläre Druck (RVSP) lassen sich durch Messen des Druckgradienten über der Trikuspidalklappe mittels CW-Doppler mit Hilfe der Bernouille-Gleichung bestimmen. Der für die Berechnung benötigte rechtsatriale Druck wird hierbei jedoch vom Untersucher geschätzt, indem der zentrale Venendruck abgeschätzt wird. (GRUNIG, LEY, 2008)

Die Messung der rechtsventrikulären Funktion ist bedingt durch die komplexe Geometrie deutlich schwieriger als die Beurteilung der linksventrikulären Pumpfunktion, weshalb sich verschiedene indirekte Marker durchgesetzt haben, die die rechtsventrikuläre Funktion beschreiben. Besonders die TAPSE (Trikuspidal annular plane systolic excursion), bei der die systolische Bewegung des lateralen Trikuspidalklappenannulus im M-Mode gemessen wird, ist ein guter Messwert, der mit der rechtsventrikulären Funktion und der Prognose korreliert. Besonders Patienten mit Werten $< 18\text{mm}$ weisen eine höhere Letalität auf, die mit abnehmender TAPSE weiter ansteigt. (FORFIA et al., 2006)

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion beschreibt den Anteil des Blutvolumens, der während der Systole vom linken Ventrikel ausgeworfen wird bezogen auf sein Gesamtvolumen und wurde als genereller Parameter für die systolische kardiale Funktion ebenfalls aus den vorliegenden Echokardiographien der Studienpatienten übernommen. (FISCHER et al., 2003)

Zur Einschätzung der diastolischen Funktion des linken Ventrikels wurde außerdem die Mitralfüllungsgeschwindigkeit (E) mittels PW-Doppler in Beziehung zur Bewegung des Mitralklappenannulus im Gewebedoppler (E') in die Auswertung aufgenommen. Das Verhältnis E/E' korreliert mit dem linksventrikulären Füllungsdruck. Ein pathologischer Werte liegt bei Werten > 15 vor (Grauzone 8-15). (WEIDEMANN et al., 2013)

Für die Studie wurden RVSP, TAPSE, Ejektionsfraktion (EF) und E/E' aus den vorliegenden Untersuchungen retrospektiv zusammengetragen.

3.2.9 6-Minuten-Gehstrecke, WHO-FC und Lungenfunktion

Die 6-MWD ist eine einfach durchführbare, standardisierte Untersuchung zur Abschätzung des Schweregrades und ein einfacher Verlaufsparemeter unter Therapie. Hierbei wird die Strecke gemessen, die der Patient in 6 Minuten in einem als angenehm empfundenen Tempo zurücklegt. Standardisierte Testbedingungen setzen eine harte, ebene und gerade Gehstrecke von mindestens 30m voraus, die der Patient in seinem eigenen Tempo wiederholt zurücklegt. (ATS, 2002; HOLLAND et al., 2014)

Die WHO-FC stellt ebenfalls einen wichtigen Verlaufsparemeter bei PH-Patienten dar. Die Einteilung erfolgte nach anamnestischen Angaben der Patienten durch Akteneinsicht. War eine Einteilung hierdurch nicht möglich, wurden die Patienten im Rahmen der telefonischen Verlaufsuntersuchung über ihre Belastbarkeit befragt und hiernach in die entsprechende Gruppe eingeteilt.

Die Lungenfunktion dient bei der PH-Diagnostik vor allem zum Ausschluss einer zugrunde liegenden Lungenerkrankungen. Bei der PAH kann die Lungenfunktion eine leichte Verminderung des Lungenvolumens sowie eine milde periphere Obstruktion zeigen. Allerdings können selbst Patienten mit einer fortgeschrittenen PH eine unauffällige Lungenfunktion vorweisen. (GALIE et al., 2009)

Für unsere Studiendaten wurde die Einsekundenkapazität (FEV1) und die Vitalkapazität (VC) übernommen.

Die BGA bei PH-Patienten zeigt typischerweise eine milde Hyperventilation mit erniedrigtem $p\text{CO}_2$ und noch normwertigen oder leicht erniedrigtem $p\text{O}_2$. Eine bereits zu Beginn bestehende respiratorische Globalinsuffizienz lässt ebenfalls an eine vorbestehende Lungenerkrankung wie COPD denken. (GALIE et al., 2015)

3.2.10 Verlaufsuntersuchung

Zur Ermittlung der Sterbedaten der Studienpatienten wurde eine telefonische Verlaufsuntersuchung durchgeführt. Hierbei wurden alle Patienten, die seit mehr als sechs Monaten nicht mehr in unserer Klinik vorstellig waren, angerufen. Patienten, die sich in regelmäßigen ambulanten Kontrollen in unserer Klinik befanden, wurden als „lebend“ eingruppiert, sofern sie die 6-monatigen Kontrolltermine wahrgenommen haben oder innerhalb der letzten sechs Monate ambulant oder stationär am UKS vorstellig waren. Bei Patienten, die im Rahmen eines stationären Aufenthaltes am UKS verstarben, waren die Sterbedaten durch Akteneinsicht zu eruieren. Die telefonische Nachuntersuchung wurde zu zwei Zeitpunkten durchgeführt. Alle Patienten, die zwischen 2009 und 2014 in unsere Studie eingeschlossen wurden und zu denen seit mehr als sechs Monaten kein Kontakt bestand, wurden im Januar 2015 angerufen. Im Juli 2017 wurden weitere 150 Patienten, die im Zeitraum zwischen 2015 und 2017 in unserer Klinik eine Thrombophiliediagnostik erhalten haben, in die Studie eingeschlossen. Für diese Patienten erfolgte die Verlaufsuntersuchung zwischen Oktober 2017 und Januar 2018.

Die Verlaufsdaten der Patienten aus Amsterdam wurden uns im Dezember 2014 übermittelt. Die dort angebundenen Patienten befinden sich in engmaschiger Kontrolle und zu allen Patienten liegen daher Verlaufsdaten vor, die regelmäßig aktualisiert werden. Der Stand unserer Daten dieser Patienten entspricht dem Ende 2014.

3.2.11 NT-pro BNP, Kreatinin und Gamma-GT

NT-pro BNP oder BNP stellen wichtige nichtinvasive Verlaufsparmater dar, die mit der Prognose und dem therapeutischen Ansprechen unter Therapie korrelieren. Da die beiden Werte von vielen weiteren Parametern wie beispielsweise der Nierenfunktion abhängen, ist eine individuelle Dynamik entscheidend. Zeigen sich die Werte unter einer begonnenen Therapie regredient, spricht dies für ein gutes Ansprechen, steigende Werte sind mit einer schlechten Prognose korreliert. (FIJALKOWSKA et al., 2006)

Die Bestimmung des NT-Pro BNP erfolgte im Zentrallabor des UKS mittels Chemolumineszenzmissionsmessung mittels Cobas e602 der Firma Roche. Hierbei erfolgt die spezifische Anbindung zweier monoklonaler Antikörper an das NT-proBNP. Der entstandene Komplex wird mittels Streptavidin-Mikropartikeln gebunden und magnetisch fixiert. Durch eine Spannung entsteht eine Chemolumineszenz, die mittels Photometer messbar wird.

Das Kreatinin und die Gamma-GT-Werte der Studienpatienten wurden zur Umfelddiagnostik ebenfalls aus den vorhandenen Laborwerten gesammelt. Beide Werte wurden mit dem Cobas c702 System der Firma Roche aus Serumröhrchen bestimmt. Bei der Kreatininbestimmung wurde die Jaffé-Methode angewandt, bei der Kreatinin mittels Pikrinsäure in einer alkalischen Lösung einen gelb-orangefarbenen Komplex bildet. Die Bildungsgeschwindigkeit ist proportional zur Kreatininkonzentration.

Die Bestimmung der Gamma-GT erfolgte als enzymatischer Farbttest. Gamma-GT katalysiert hierbei die Übertragung einer Gamma-Glutamylgruppe zwischen L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilidin auf Glycylglycerin. Hierbei entsteht 5-Amino-2-nitrobenzoat. Die enzymatische Aktivität der Gamma-GT wird schließlich mittels photometrischer Messung der Extinktionszunahme bestimmt.

3.2.12 Klinische Daten der Patienten aus Amsterdam

Von den Studienpatienten aus Amsterdam wurden die klinischen Daten aus Echokardiographie, Blutgasanalyse, Rechtsherzkatheter, Lungenfunktion sowie die Laborparameter übermittelt. Die Patienten sind in mehrere Studien eingegliedert und erhalten regelmäßige Verlaufsuntersuchungen. So lagen von den Patienten ebenfalls Daten zum Sterbezeitpunkt vor, die von uns übernommen wurden.

3.2.13 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mittels Microsoft Excel 2004 gesammelt, die statistische Auswertung erfolgte mit R-Projekt Version 3.1. Zum Vergleich der genetischen Profile entschieden wir uns nach Rücksprache mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik des UKS für eine einfache Signifikanztestung mittels χ^2 -Test. Zusätzlich wurde die Signifikanz noch einmal mit dem für kleinere Stichproben geeigneteren Fischer-Test überprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt. Die Mittelwerte der deskriptiven Statistik werden im Folgenden jeweils \pm der Standardabweichung (SD) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeines und Studienpopulation

Die größte Anzahl der Patienten dieser Studie stellen Patienten mit einer CTEPH (N=234; Nizza-Gruppe 4) und mit einer PAH (N=152; Nizza-Gruppe 1) dar.

Abbildung 10 zeigt die Zusammensetzung der Patienten gemäß ihrer Herkunft und die Anzahl der einzelnen Subgruppen.

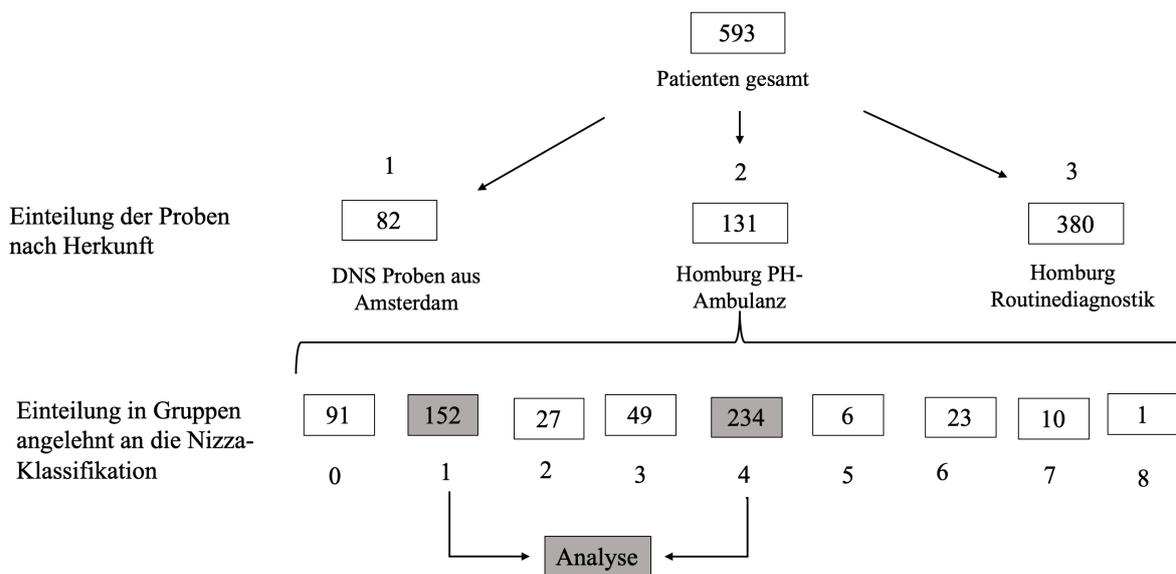


Abbildung 10: Einteilung der Patienten 0=keine PH; 1=PAH; 2=PH bei Linksherzerkrankungen; 3=PH bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie; 4=CTEPH; 5=PH mit unklarem oder multifaktoriellem Mechanismus; 6=kombinierte prä- und postkapilläre PH; 7=kombinierte präkapilläre PH multipler Genese oder „out of proportion“; 8=nur unter Belastung PAP \geq 25

Von den 82 DNS-Proben aus Amsterdam lag bei 81 Patienten eine PAH vor und bei einem Patienten eine PH bei bestehender Linksherzerkrankung. Von den 81 PAH-Patienten lag wiederum bei 61 eine IPAH und bei 20 eine HPAH vor.

Alle CTEPH-Patienten befanden sich im UKS in ambulanter oder stationärer Behandlung, der Großteil hat hierbei ein Routinescreening auf Thrombophilie erhalten (N=214). Ein kleinerer Teil der CTEPH-Patienten (N=20) ist an die PH-Ambulanz in Homburg angebunden und war mit der Abgabe einer Blutprobe zum Aufbau einer Gendatenbank zu Forschungszwecken einverstanden.

Tabelle 36: Übersicht über die Verteilung unter den Zentren

PAH N=152			CTEPH N=234		
Amsterdam	Homburg Ambulanz	Homburg Routine	Amsterdam	Homburg Ambulanz	Homburg Routine
81	36	35	0	20	214
81	71		0	234	

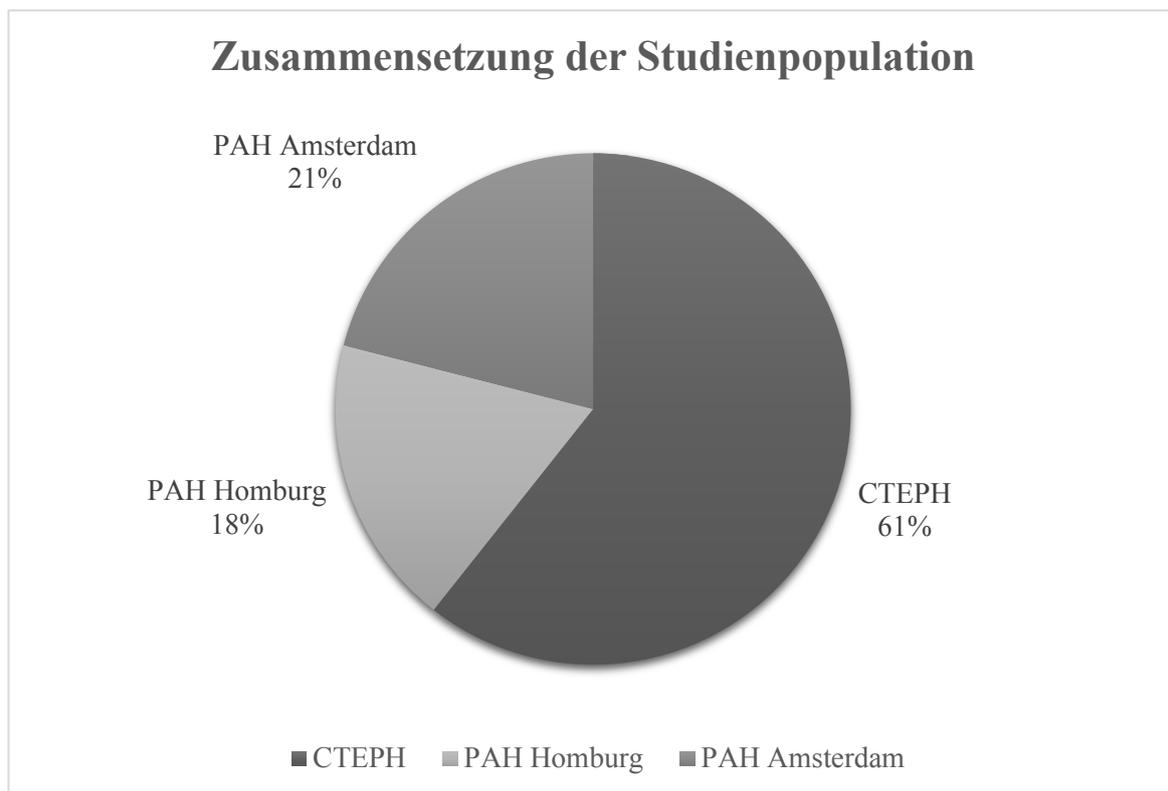


Abbildung 11: Zusammensetzung der Studienpopulation: 234 Patienten mit einer CTEPH gingen in die Auswertung ein. Diese Patienten befanden sich alle am UKS in ambulanter oder stationärer Betreuung. Von den insgesamt 152 Patienten mit PAH stammen 71 aus Homburg und 81 aus Amsterdam.

4.2 Deskriptive Statistik der Gruppen

Insgesamt wurden 152 Patienten mit einer PAH und 234 mit einer CTEPH in die Auswertung eingeschlossen. Unter den PAH-Patienten fanden sich über 70% weibliche Patienten (71,71%), bei den CTEPH-Patienten fand sich eine etwa gleiche Geschlechterverteilung (53,85% weiblich).

Die meisten Patienten aus beiden Gruppen befanden sich zum Untersuchungszeitpunkt in WHO-FC 3-4 und zeigten eine deutlich verminderte 6-MWD (PAH: $379,15\text{m} \pm 142,26\text{m}$; CTEPH: $341,35\text{m} \pm 136,06\text{m}$).

Die Patienten mit PAH zeigten im RHK einen höheren mPAP (PAH: $50,36\text{mmHg} \pm 15,36\text{mmHg}$; CTEPH: $41,30\text{mmHg} \pm 13,12\text{mmHg}$) und einen höheren PVR (PAH: $794,99 \text{ dyn x sec x cm}^{-5} \pm 416,32 \text{ dyn x sec x cm}^{-5}$; CTEPH: $669,09 \text{ dyn x sec x cm}^{-5} \pm 414,92$). Tabelle 37 zeigt die genaue Gegenüberstellung der deskriptiven Daten der beiden Gruppen.

Tabelle 37: Übersicht der deskriptiven Statistik

	Gruppe 1 nach Nizza N= 52 (w=109 /m=43)	Gruppe 4 nach Nizza N=234 (w=126 /m=108)
	M ± SD	
Körpergröße (m)	1,66 ± 0,009	1,68 ± 0,10
Körpergewicht (kg)	78,02 ± 17,42	83,14 ± 18,79
sPAP (mmHg)	79,07 ± 24,32	71,23 ± 22,6
dPAP (mmHg)	33,26 ± 12,8	23,58 ± 8,62
mPAP (mmHg)	50,36 ± 15,36	41,30 ± 13,12
HZV (l/min)	4,58 ± 1,39	4,23 ± 1,19
PCWP (mmHg)	9,24 ± 4,41	11,91 ± 6,01
PVR (dyn x sec x cm ⁻⁵)	794,99 ± 416,32	669,09 ± 414,92
ZVD (mmHg)	9,47 ± 4,63	10,87 ± 6,03
TPG (mmHg)	41,08 ± 16,13	29,49 ± 12,86
DPG (mmHg)	23,99 ± 13,68	11,66 ± 8,85
RRs (mmHg)	120,7 ± 18,74	134,33 ± 25,97
RRd (mmHg)	73,38 ± 11,78	76,71 ± 13,48
WHO-FC	3,82	3,76
6-MWD (m)	379,15 ± 142,26	341,35 ± 136,06
TAPSE (cm)	19,47 ± 5,06	18,67 ± 5,50
RVSP (mmHg)	67,69 ± 28,24	59,30 ± 24,10
LV-EF (%)	59,45 ± 7,73	59,53 ± 7,59
E/E'	10,5 ± 6,56	8,64 ± 4,18
NT-proBNP (pg/ml)	1727,28 ± 2335,81	2036,28 ± 4255,74
Kreatinin (mg/dl)	1,07 ± 0,33	1,12 ± 0,42
GGT (U/l)	74,74 ± 100,14	85,88 ± 107,23
FEV1 (l)	1,46 ± 0,74	2,12 ± 0,81
VC (l)	2,88 ± 0,99	3,85 ± 8,75
pO2 (mmHG)	67,62 ± 30,63	63,13 ± 10,12
pCO2 (mmHG)	34,79 ± 7,07	34,37 ± 5,75

4.2.1 Zusammensetzung der PAH-Patienten aus Amsterdam und Homburg

Die Patienten, die aus der Gendatenbank aus Amsterdam stammen, sind überwiegend IPAH-Patienten (N=61) und einige Patienten mit HPAH (N=20). Die PAH-Patienten aus Homburg (Ambulanz und Routine zusammengefasst) sind dagegen deutlich heterogener. Es besteht ein großer Anteil an assoziierten Formen (N=23). Diese stellen zusammen mit IPAH-Patienten (N=22) die beiden größten Gruppen dar. HPAH und Medikamenten- und Toxinvermittelte PAH sind zwar vertreten, aber mit kleinen Fallzahlen. Bei einem Patienten lag eine PVOD vor. Bei den Proben aus Homburg war bei insgesamt 18 Proben eine genaue Unterteilung der PAH nicht möglich, da die Diagnostik nicht vollständig vorlag.

Table 38: Verteilung der Subgruppen der Patienten mit einer PAH

Nizza-Klassifikation	Amsterdam N=81	Homburg N=71
Idiopathische PAH	61	22
HPAH	20	2
Durch Medikamente und Toxine verursacht		5
Assoziierte PAH		23
PVOD		1
PAH nicht weiter unterteilt		18

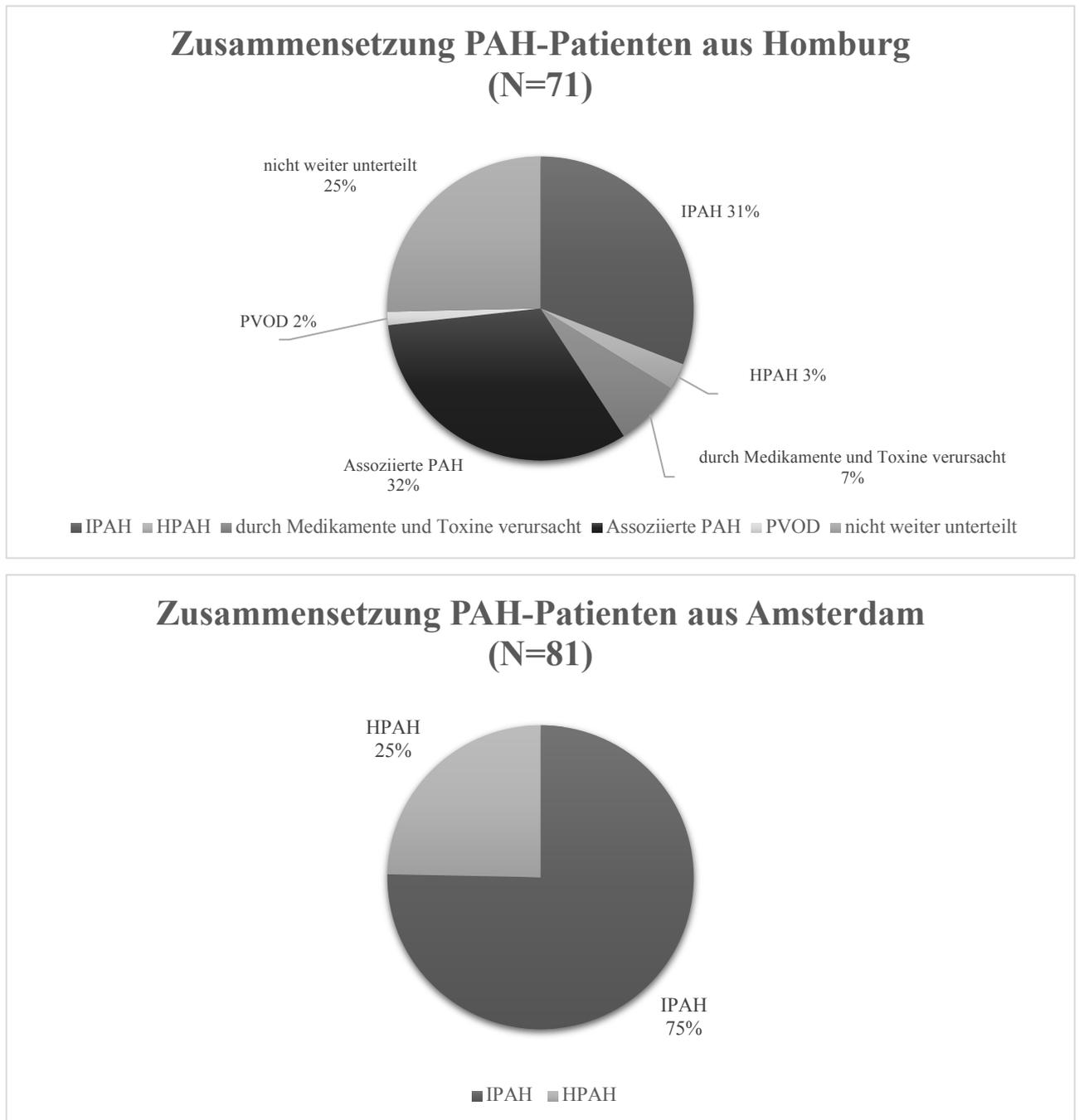


Abbildung 12: Zusammensetzung der PAH-Patienten aus Amsterdam und Homburg

4.3 Vergleich der Mutationen zwischen PAH und CTEPH

4.3.1 MTHFR C677T, MTHFR A1298C und Compound-Heterozygotie

Die MTHFR C677T-Mutation und die MTHFR A1298C-Mutation fanden sich bei den Patienten mit einer PAH und einer CTEPH mit einer ähnlichen Verteilung und ohne signifikante Unterschiede.

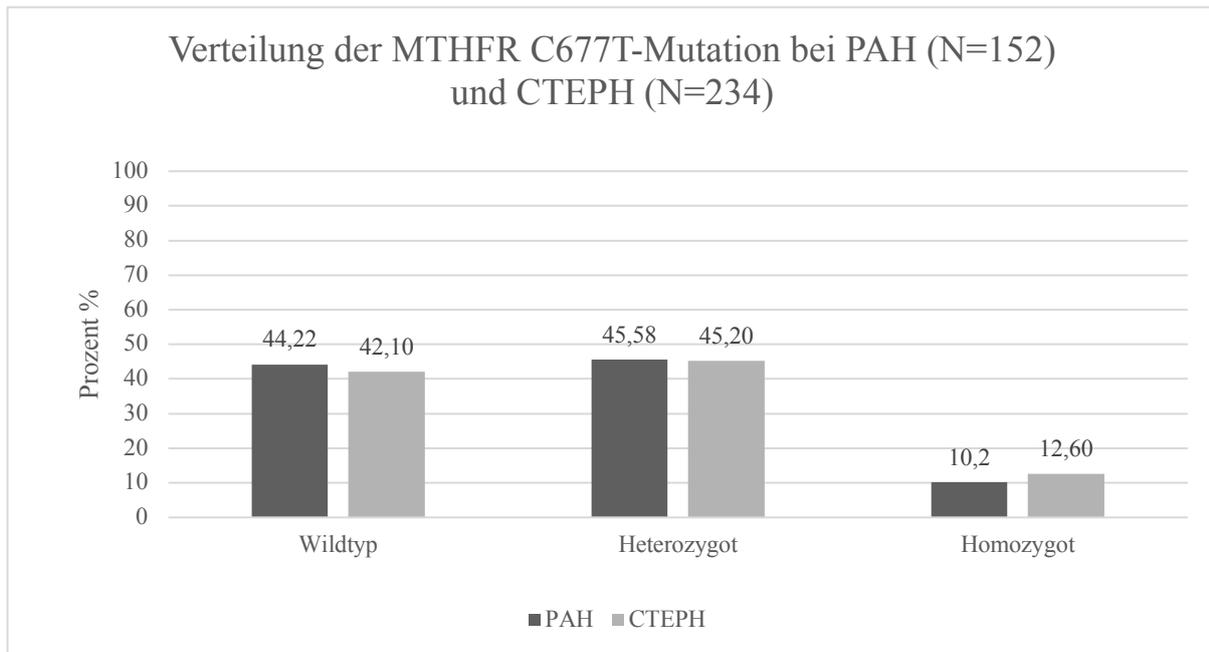


Abbildung 13: Verteilung der MTHFR C677T-Mutation unter den PAH- und CTEPH-Patienten

Die homozygote MTHFR C677T-Mutation entsprach in ihrem Vorkommen mit 10% unter den PAH-Patienten und 13% unter den CTEPH-Patienten dem erwarteten Wert in der europäischen Normalbevölkerung (10-15% Mutationen). (ROZEN, 2000)

Es fanden sich 46% heterozygote Träger der MTHFR C677T-Mutation unter PAH-Patienten und 45% unter CTEPH-Patienten. Der Wildtyp lag mit jeweils 44% unter PAH-Patienten und 42% unter den CTEPH-Patienten vor.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der MTHFR C677T-Mutation zwischen PAH- und CTEPH-Patienten ($p=0,783$).

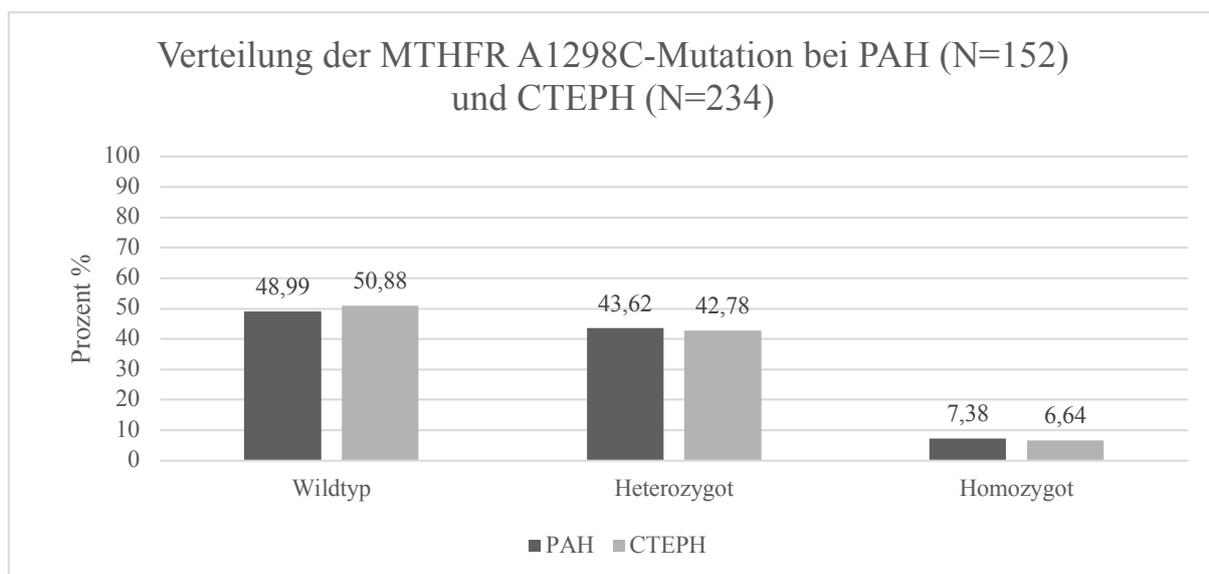


Abbildung 14: Verteilung der MTHFR A1298C-Mutation unter den PAH- und CTEPH-Patienten

Der Anteil der homozygoten MTHFR A1298C-Mutation lag mit 7,38% unter den PAH-Patienten und 6,64% unter den CTEPH-Patienten in beiden Gruppen leicht niedriger als erwartet (etwa 10% in Mitteleuropa).

Die heterozygote Mutation fand sich bei 43,62% der PAH-Patienten und bei 42,78% der CTEPH-Patienten. Der Wildtyp fand sich ebenfalls mit einer gleichen Verteilung zwischen PAH- und CTEPH-Patienten (PAH=48,99% und CTEPH=50,88%).

Zwischen den Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der MTHFR A1298C-Mutation ($p=0,92$).

Die Compound-Heterozygotie war mit 23% in beiden Gruppen gleich verteilt. Die Gruppe der Patienten, die homozygot oder heterozygot für jeweils nur eine der Mutationen waren oder in beiden Mutationen einen Wildtyp vorwiesen, sind unter „Andere“ zusammengefasst.

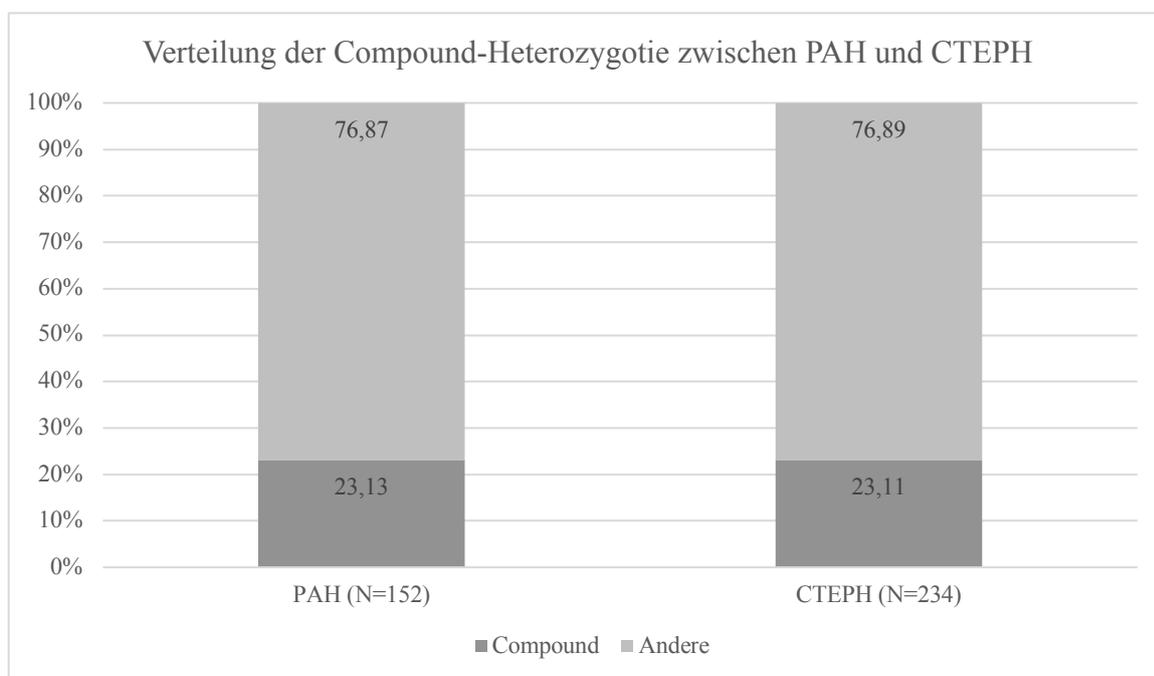


Abbildung 15: Verteilung der Compound-Heterozygotie zwischen PAH und CTEPH: Die Gruppe der „Anderen“ umfasst homozygote bzw. heterozygote Mutationsträger der isolierten MTHFR C677T- oder A1298C-Mutation und den Wildtyp beider Mutationen

Tabelle 39: Übersicht über die Häufigkeiten der beiden MTHFR-Mutationen zwischen PAH und CTEPH

	Nizza 1 / PAH N=152			Nizza 4 / CTEPH N=234		
	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
MTHFR C677T	44,22%	45,58%	10,20%	42,17%	45,22%	12,61%
MTHFR A1298C	48,99%	43,62%	7,38%	50,88%	42,78%	6,64%
Compound		23,13%			23,11%	

Tabelle 40: Ergebnisse der Signifikanztestung

	χ^2 -Test		Fischer-Test
	χ^2	p- Wert	p- Wert
MTHFR C677T	0,53	0,7657	0,783
MTHFR A1298C	0,16	0,92	0,93
Compound-Heterozygotie	1,16	1	1

4.3.2 Unterschiede von MTHFR C677T, MTHFR A1298 C und der Compound-Heterozygotie unter den Zentren

Betrachtet man die Mutationen in Abhängigkeit Ihrer Herkunft, so findet sich in den Proben aus Amsterdam ein kleinerer Anteil an homozygoten MTHFR C677T-Mutationsträgern verglichen mit den beiden Patientengruppen der Routinediagnostik und der PH-Ambulanz aus Homburg (3,89% vs. 12,65% und 18,18%).

Die heterozygote Mutation fand sich unter den Proben aus Amsterdam und der Ambulanz mit jeweils 51%. Unter den Patienten der Homburger Routine lagen 42,45% heterozygote MTHFR C677T-Mutationsträger vor. Der Wildtyp lag unter den Patienten aus Amsterdam mit 45,46% vor. Unter den Homburger Ambulanzpatienten fanden sich 30,91% und unter den Routinepatienten 44,9% Träger des MTHFR C677T-Wildtyps.

Der Unterschied zwischen den Zentren für die MTHFR C677T-Mutation zeigte sich signifikant ($p=0,046$). Auffällig waren hierbei vor allem der geringe Anteil homozygoter Mutationsträger unter den Proben aus Amsterdam, verglichen mit den beiden Patientenkollektiven aus Homburg.

Die homozygote MTHFR A1298C-Mutation war unter den Proben aus Amsterdam zwar ebenfalls seltener als unter den Patienten aus Homburg (3,7% vs. 7,41% und 7,92%), der Unterschied war aber nicht signifikant ($p=0,699$). Die heterozygote A1298C-Mutation fand sich unter den Patienten aus Amsterdam und den Ambulanzpatienten mit jeweils 46%. Unter den Patienten der Routine lagen 41,25% heterozygote Mutationsträger vor. Der MTHFR A1298C-Wildtyp kam unter den Patienten aus Amsterdam und der Routine mit jeweils 51% vor. Unter den Patienten der Homburger Ambulanz fand sich ein nur geringgradig niedrigerer Anteil (46%).

Die Compound-Heterozygotie ließ sich in den Proben der Homburger PH-Ambulanz etwas häufiger nachweisen (29,09%) als in den Proben aus Amsterdam (23,38%) und der Routinediagnostik (21,67%), dieser Unterschied ist ebenfalls nicht signifikant ($p=0,50$).

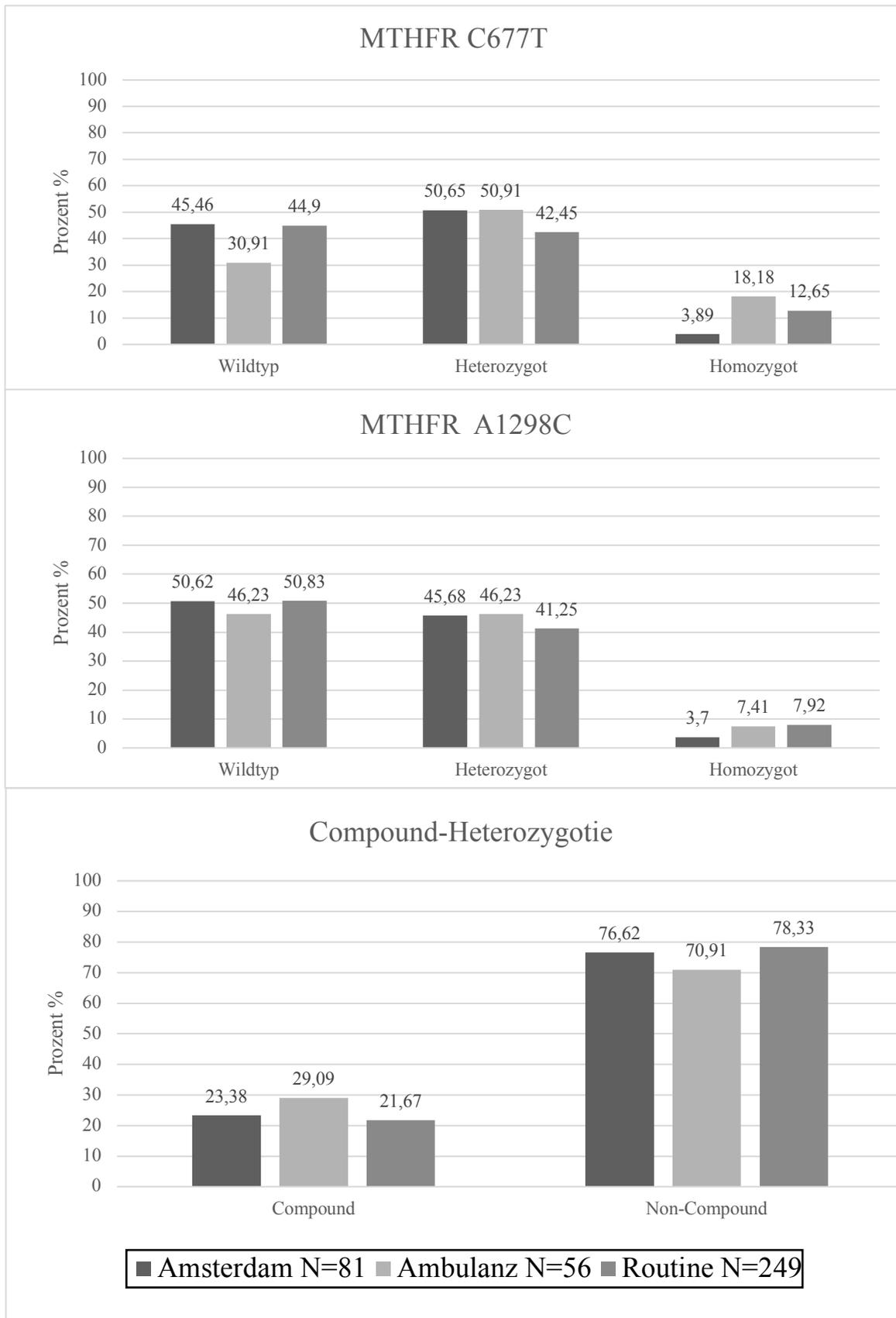


Abbildung 16: Verteilung der MTHFR C677T- und MTHFR A1298C-Mutation sowie der Compound-Heterozygotie unter den Zentren

Tabelle 41: Übersicht über die relative Mutationshäufigkeit nach Zentrum

		MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Compound
Amsterdam N=81 PAH=81	Wildtyp	45,46%	50,62%	76,62%
	Heterozygot	50,65%	45,68%	23,38%
	Homozygote Mutation	3,89%	3,70%	
Homburger Ambulanz N=56 PAH=36 CTEPH=20	Wildtyp	30,91%	46,23%	70,91%
	Heterozygot	50,91%	46,23%	29,09%
	Homozygote Mutation	18,18%	7,41%	
Homburger Routine N=249 PAH=35 CTEPH=214	Wildtyp	44,9%	50,83%	78,33%
	Heterozygot	42,45%	41,25%	21,67%
	Homozygote Mutation	12,65%	7,92%	
χ^2 -Test	χ^2	9,68	2,1995	1,39
	p-Wert	0,046	0,699	0,4988
Fischer-Test	p-Wert	0,032	0,71	0,50

4.3.3 FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G

Die FVL-Mutation fand sich signifikant häufiger unter den CTEPH-Patienten.

10,53% der CTEPH-Patienten waren heterozygot für die FVL-Mutation und 0,44% homozygot. Unter der Gruppe der PAH-Patienten fand sich eine deutlich kleinere Anzahl an Mutationsträgern (3,95% heterozygot, keine homozygoten), die auch in etwa dem Vorkommen der Mutation in der Normalbevölkerung entspricht (3-7% heterozygote). (REES et al., 1995) Der Anteil der Mutationsträger unter den CTEPH-Patienten ist somit nicht nur signifikant höher als unter den PAH-Patienten ($p=0,046$), er liegt auch etwas höher als der Referenzwert, der für Kaukasier üblicherweise angegeben wird.

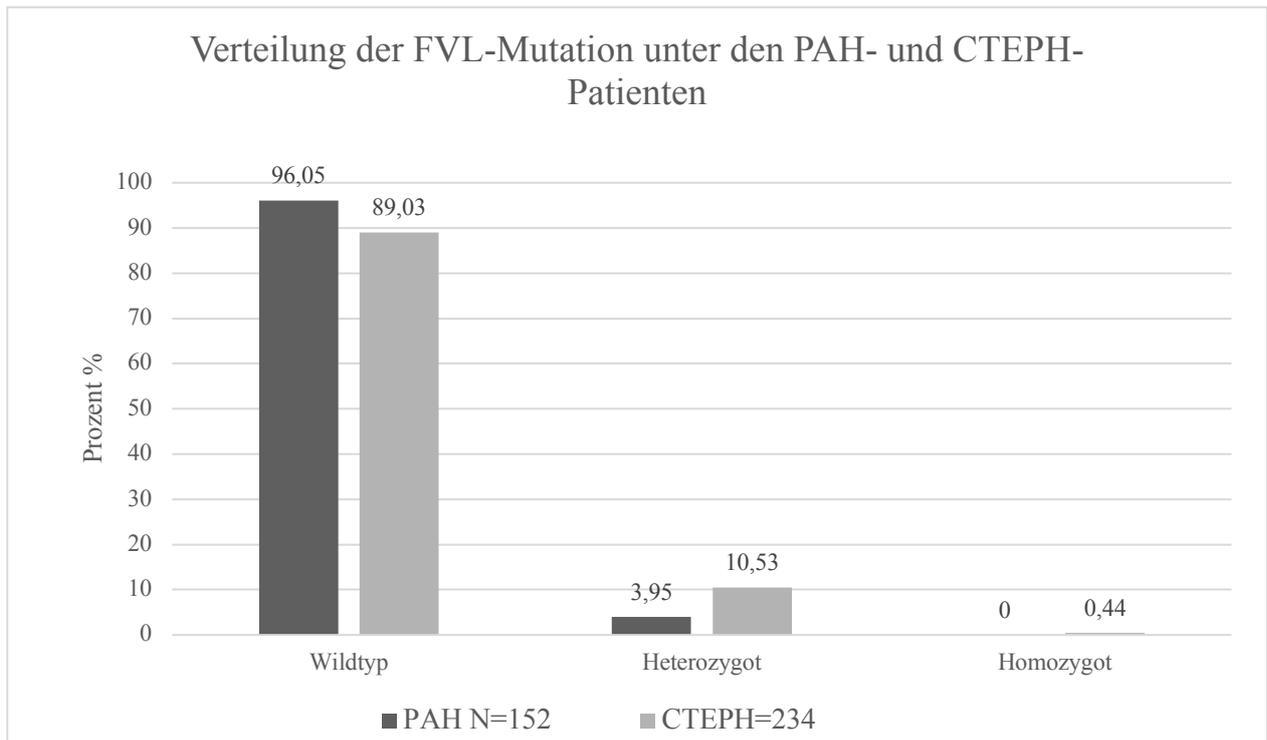


Abbildung 17: Verteilung der FVL-Mutation unter den PAH- und CTEPH-Patienten

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch für die Prothrombinmutation. Es fanden sich unter den CTEPH-Patienten signifikant mehr heterozygote Mutationsträger ($p=0,04$) und die Anzahl der Mutationen in der Gruppe der PAH-Patienten entsprach mit 2,63% dem Erwartungswert in der Normalbevölkerung (2%). (ROSENDAAL et al., 1998)

Unter den CTEPH-Patienten fanden sich dagegen 8,3% Mutationsträger, was in etwa der Häufigkeit bei Patienten nach Thrombembolien entspricht (7%). (POORT et al., 1996)

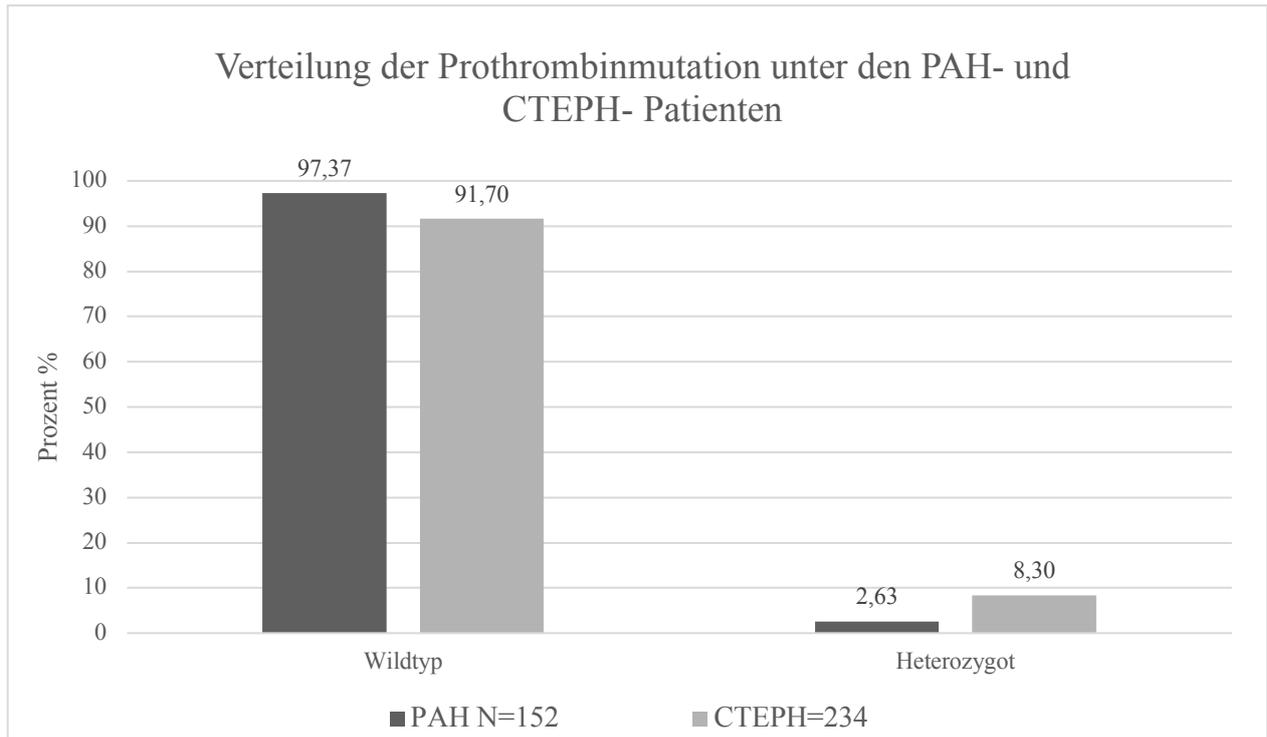


Abbildung 18: Verteilung der Prothrombinmutation unter den PAH- und CTEPH-Patienten

Der PAI-1 4G/5G-Polymorphismus fand sich in beiden Gruppen in einer ähnlichen Verteilung. Die Anzahl der homozygoten Mutationsträger war unter den CTEPH-Patienten etwas höher (31,58%) als unter den PAH-Patienten (25%). Die heterozygote Mutation lag unter den PAH-Patienten mit 51,97% und unter den CTEPH-Patienten mit 50,44% vor. Unter den PAH-Patienten fanden sich 23,03% und unter den CTEPH-Patienten 17,98% des Wildtyps. Der Unterschied der PAI-1 4G/5G-Mutation zwischen PAH- und CTEPH-Patienten war nicht signifikant ($p=0,28$).

Die Analyse zeigte bei CTEPH-Patienten einen höheren Anteil heterozygoter FVL- und Prothrombinmutationen gegenüber PAH-Patienten. Der Anteil homozygoter Mutationen unterschied sich nicht. Es lagen keine Unterschiede des PAI-1 4G/5G-Polymorphismus vor.

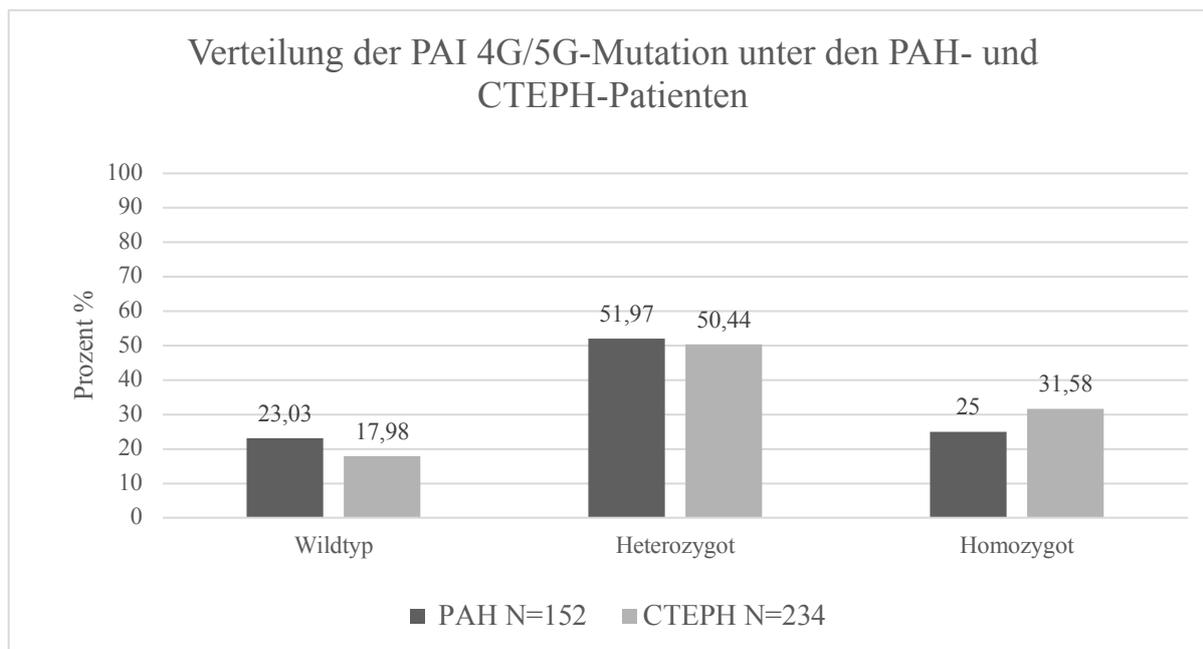


Abbildung 19: Verteilung der PAI 4G/5G-Mutation unter den PAH- und CTEPH-Patienten

Tabelle 42: Häufigkeiten von FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G im Vergleich zwischen PAH und CTEPH

	PAH N=152			CTEPH N=234		
	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
FVL	96,05%	3,95%	0,00 %	89,03%	10,53%	0,44%
Prothrombin	97,37%	2,63%	0,00%	91,70%	8,30%	0,00%
PAI-1 4G/5G	23,03%	51,97%	25,00%	17,98%	50,44%	31,58%

Tabelle 43: Ergebnisse der Signifikanztestung

	χ^2 -Test		Fischer-Test
	χ^2	p- Wert	p- Wert
FVL	6,16	0,046	0,024
Prothrombin	4,22	0,04	0,027
PAI-1 4G/5G	2,57	0,28	0,28

4.3.4 Unterschiede von FVL, Prothrombin G2010A und PAI-1 4G/5G unter den Zentren

FVL war unter den Routinepatienten am häufigsten (10,25% heterozygote Träger und 0,44% homozygote Träger), hierbei handelt es sich auch um die Gruppe mit den meisten CTEPH-Patienten. Unter den Proben der Homburger Ambulanz fanden sich 9,09% heterozygote und keine homozygoten Mutationsträger. Unter der Gruppe der PAH-Patienten aus Amsterdam war die Mutation nicht nachweisbar.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Prothrombinmutation. Bei den Patienten aus Amsterdam war der Anteil heterozygoter Mutationsträger mit 1,23% deutlich niedriger als unter den beiden Patientenkollektiven aus Homburg (Routine=7,14% und Ambulanzpatienten=5,45%). Homozygote Mutationsträger fanden sich in allen drei Gruppen keine.

Der PAI-1-Polymorphismus 4G/5G konnte in allen Patientenkollektiven mit einer ähnlichen Verteilung nachgewiesen werden. In den Proben aus Amsterdam und aus der Routinediagnostik war der Anteil an homozygoten Mutationsträgern etwas höher als unter den Homburger Ambulanzpatienten (Amsterdam=29,63%, Ambulanz=21,82%, Routine=30,33%). Die heterozygote Mutation fand sich in allen drei Zentren mit einer sehr ähnlichen Verteilung (Amsterdam=54%; Ambulanz=49%; Routine=50%). Der Wildtyp war unter den Patienten der Homburger Ambulanz etwas häufiger vertreten als unter den Patienten aus Amsterdam und der Homburger Routine (Amsterdam=16%; Ambulanz=29%; Routine=19%).

Der Unterschied der FVL-Mutation zwischen den Zentren ist signifikant ($p=0,05$). Die Auswertung der Daten der Prothrombinmutation und des PAI 4G/5G-Polymorphismus ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen.

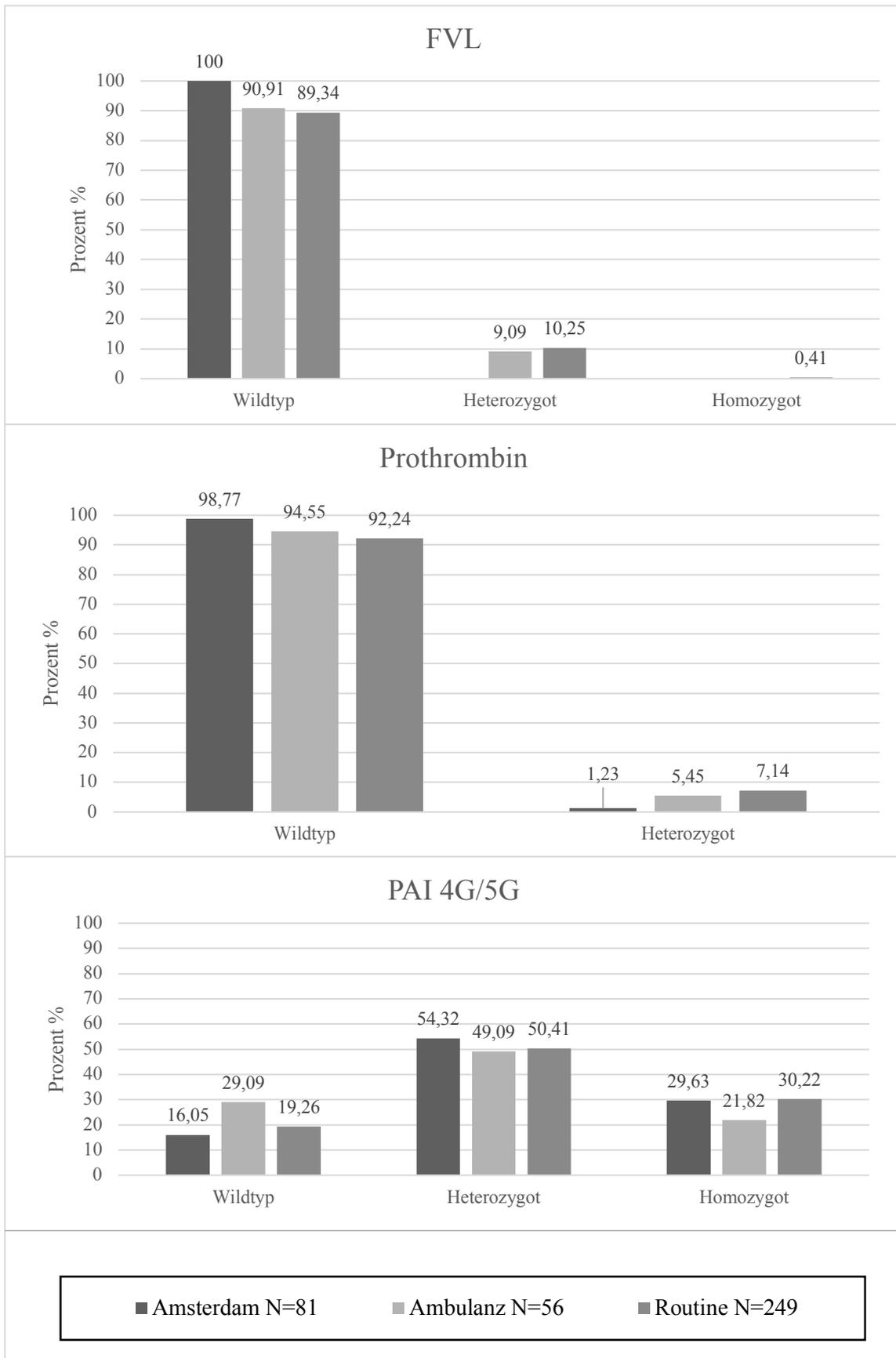


Abbildung 20: Verteilung von FVL, Prothrombin und PAI 4G/5G zwischen den Zentren

Tabelle 44: Übersicht über die relative Mutationshäufigkeit nach Zentrum

		FVL	Prothrombin	PAI-1 4G/5G
Amsterdam N=81 PAH=81	Wildtyp	100%	98,77%	16,05%
	Heterozygot	0,00%	1,23%	54,32%
	Homozygote	0,00%	0,00%	29,63%
Homburger Ambulanz N=56 PAH=36 CTEPH= 20	Wildtyp	90,91%	94,55%	29,09%
	Heterozygot	9,09%	5,45%	49,09%
	Homozygote	0,00%	0,00%	21,82%
Homburger Routine N= 249 PAH= 35 CTEPH=214	Wildtyp	89,34%	92,24%	19,26%
	Heterozygot	10,25%	7,14%	50,41%
	Homozygot	0,41%	0,00%	30,33%
χ^2 -Test	χ^2	9,52	4,60	4,34
	p-Wert	0,05	0,10	0,36
Fischer-Test	p-Wert	0,0037	0,09	

4.4 Unterschiede der Patienten mit PAH unter den Zentren

4.4.1 MTHFR C677T, MTHFR A1298C und Compound-MTHFR bei Patienten mit PAH

Bei isolierter Betrachtung der Patienten mit PAH zeigten sich teilweise große Unterschiede der Verteilung der Mutationen zwischen den drei Patientenkollektiven.

Der Anteil an Patienten mit einer homozygoten MTHFR C677T-Mutation war unter den Proben aus Amsterdam mit 3,9% signifikant niedriger ($p=0,048$) verglichen mit den PAH-Patienten der anderen beiden Gruppen (jeweils 17,14% unter den Routinepatienten und den Patienten der Gendatenbank). Die heterozygote MTHFR C677T-Mutation fand sich unter den Patienten der Homburger Routine seltener als unter den Patienten aus Amsterdam und der Ambulanz (31,42% vs. 50,64% und 48,57%). Der Wildtyp war unter den Patienten aus Amsterdam und der Routine etwas häufiger als unter den Ambulanzpatienten (45,45% bzw. 51,43% vs. 34,29%).

Der Anteil an homozygoten MTHFR A1298C-Mutationsträgern war unter beiden Patientengruppen aus Homburg höher als unter den Patienten aus Amsterdam (jeweils 11,76%

vs. 3,70%). Die heterozygote Mutation, ebenso der Wildtyp, zeigte in allen drei Patientenkollektiven eine ähnliche Verteilung unter PAH-Patienten.

Die Compound-Heterozygotie fand sich unter den PAH-Patienten der Ambulanz am häufigsten (27,77%), unter den PAH-Patienten der Homburger Routine fanden sich nur 17,65% Träger der Compound-Heterozygotie und unter den Proben aus Amsterdam 23,38%.

Die Unterschiede der Mutationen unter den PAH-Patienten zwischen den Zentren waren nur für die MTHFR C677T-Mutation signifikant ($p=0,048$). Für MTHFR A1298C und die Compound-Heterozygotie ergab die Auswertung keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 45: Unterschiede zwischen den PAH-Patienten für die MTHFR-Mutationen zwischen den drei Gruppen

		MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Compound
Amsterdam N=81	Wildtyp	45,45%	50,62%	76,62%
	Heterozygot	50,64%	45,68%	23,38%
	Homozygot	3,90%	3,70%	
Homburg Ambulanz N=36	Wildtyp	34,29%	47,6%	72,22%
	Heterozygot	48,57%	41,18%	27,77%
	Homozygot	17,14%	11,76%	
Homburg Routine N=35	Wildtyp	51,43%	47,6%	82,35%
	Heterozygot	31,42%	41,18%	17,65%
	Homozygot	17,14%	11,76%	
χ^2 -Test	χ^2	9,565	3,52	1,01
	p-Wert	0,048	0,47	0,6
Fischer-Test	p-Wert	0,034	0,43	0,63

Tabelle 46: Unterschiede zwischen den PAH-Patienten für die MTHFR-Mutationen zwischen Homburg und Amsterdam

		MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Compound- Heterozygotie
Amsterdam N=81	Wildtyp	45,45%	50,62%	76,62%
	Heterozygot	50,65%	45,68%	23,38%
	Homozygot	3,90%	3,70%	
Homburg N=71	Wildtyp	42,86%	47,06%	77,14%
	Heterozygot	40%	41,17%	22,86%
	Homozygot	17,14%	11,76%	
χ^2 -Test	χ^2	7.2737	3,521	0
	p-Wert	0,03	0,172	1
Fischer-Test	p-Wert	0,025	0,20	1

In einer zweiten Auswertung wurden die PAH-Patienten der Homburger Ambulanz und der Routine zusammengefasst und den Patienten aus Amsterdam gegenübergestellt. So ergeben sich zwei ähnlich große Stichproben, die sich durch ihre geographische Herkunft unterscheiden. Bei dieser Betrachtung fanden sich ebenfalls deutlich weniger homozygote MTHFR C677T-Mutationsträger unter den Patienten aus Amsterdam gegenüber den PAH-Patienten aus Homburg (3,90% vs. 17,14%). Die heterozygote MTHFR C677T-Mutation war dagegen unter den Proben aus Amsterdam häufiger (50,65% vs. 40%). Der Wildtyp fand sich in beiden Gruppen mit einer ähnlichen Verteilung. Der Unterschied der MTHFR C677T-Mutation zwischen den Proben aus Amsterdam und Homburg ist signifikant ($p=0,03$).

Die MTHFR A1298C-Mutation war ebenfalls unter den PAH-Patienten aus Amsterdam seltener als unter den PAH-Patienten aus Homburg (3,70% vs. 11,76%). Die heterozygote Mutation und der Wildtyp waren ähnlich verteilt. Der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen war nicht signifikant ($p=0,172$).

Die Compound-Heterozygotie fand sich in beiden Zentren mit einer Häufigkeit von etwa 23%. Zusammenfassend ergab die Auswertung, dass signifikant weniger homozygote MTHFR C677T-Mutationsträger unter den Patienten aus Amsterdam vorliegen, hierfür aber ein etwas höherer Anteil an heterozygoten Mutationsträgern. Für die MTHFR A1298C-Mutation und die Compound-Heterozygotie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten aus Amsterdam und Homburg.

4.4.2 FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G bei Patienten mit PAH

Unter den Proben aus Amsterdam fanden sich keine FVL-Mutationsträger. In den Proben der Homburger PH-Ambulanz mit einer PAH fanden sich 2,78% heterozygote und keine homozygoten Mutationsträger. Unter den Routinepatienten mit einer PAH fanden sich 14,29% heterozygote Mutationsträger und damit signifikant mehr als unter den PAH-Patienten aus Amsterdam und den Proben der PAH-Ambulanz ($p=0,00098$).

Bei der Prothrombinmutation zeigte sich ebenfalls eine sehr unterschiedliche Verteilung. Während sich unter den Proben der PH-Ambulanz keine Mutationsträger fanden, lag der Anteil unter den Amsterdamer Proben mit 1,23% etwas unter dem Referenzwert einer gesunden mitteleuropäischen Normalbevölkerung (~2%). (ROSENDAAL et al., 1998)

In den Proben der Routinediagnostik lag der Anteil heterozygoter Mutationen dagegen deutlich höher (8,57%).

Tabelle 47: Unterschiede zwischen den PAH-Patienten für FVL und Prothrombin zwischen den drei Gruppen

		FVL	Prothrombin
Amsterdam N=81	Wildtyp	100%	98,77%
	Heterozygot	0%	1,23%
	Homozygot	0,00%	0,00%
Homburg Ambulanz N=36	Wildtyp	97,22%	100,00%
	Heterozygot	2,78%	0,00%
	Homozygot	0,00%	0,00%
Homburg Routine N=35	Wildtyp	85,71%	91,42%
	Heterozygot	14,29%	8,57%
	Homozygot	0,00%	0,00%
χ^2 -Test	χ^2		6,41
	p-value		0,041
Fischer-Test	p-value	0,00098	0,07

Tabelle 48: Unterschiede zwischen den PAH-Patienten für FVL und Prothrombin zwischen Homburg und Amsterdam

		FVL	Prothrombin
Amsterdam Nur PAH N=81 (von 81)	Wildtyp	100%	98,77%
	Heterozygot	0,00%	1,23%
	Homozygote Mutation	0,00%	0,00%
Homburg Beide Subgruppen zusammengefasst Nur PAH N=71 (von 305)	Wildtyp	91,55%	95,77%
	Heterozygot	8,45%	4,23%
	Homozygote Mutation	0,00%	0,00%
χ^2 -Test	χ^2		0,411
	p-Wert		0,52
Fischer-Test	p-Wert	0,00924	0,34

In einer weiteren Analyse wurden die PAH-Patienten der Homburger Routine und der Ambulanz zusammengefasst und mit den Proben aus Amsterdam verglichen.

Hierbei zeigt sich, dass die heterozygote FVL-Mutation unter den Proben aus Homburg deutlich häufiger vorliegt als unter den Proben aus Amsterdam (8,45% vs. 0%). Homozygote Mutationsträger fanden sich in beiden Gruppen keine.

Die heterozygote Prothrombinmutation war ebenfalls unter den PAH-Patienten aus Homburg häufiger zu finden (4,23% vs. 1,23%). Auch hier fanden sich keine homozygoten Mutationsträger.

Sowohl die FVL als auch die Prothrombinmutation lag unter den Proben der PAH-Patienten aus Homburg häufiger vor als unter den Proben aus Amsterdam. Der Unterschied ist jedoch nur für die FVL-Mutation signifikant (FVL: $p=0,00924$ und Prothrombin: $p=0,34$).

Die PAI 4G/4G-Mutation war mit 29,63% unter den Proben aus Amsterdam häufiger als unter den beiden anderen Gruppen (~20%). In den Proben aus Amsterdam fand sich ein sehr kleiner Teil des Wildtyps (16,05%) gegenüber den Patienten aus der Homburger PH-Ambulanz (27,28%) und den Patienten, die eine Thrombophiliediagnostik im Rahmen der Routinediagnostik erhalten haben (34,29%).

Fasst man auch hier die Homburger Proben zusammen, zeigt sich ein statistischer Trend zu mehr PAI 4G/4G-Mutationen unter den PAH-Proben aus Amsterdam als unter den Proben aus Homburg (Amsterdam: 29,63%; Homburg: 19,72% p=0,069).

Tabelle 49: Unterschiede zwischen den PAH-Patienten für PAI 4G/5G zwischen den drei Gruppen

		PAI 4G/5G
Amsterdam N=81	Wildtyp	16,05%
	Heterozygot	54,32%
	Homozygot	29,63%
Homburg Ambulanz N=36	Wildtyp	27,78%
	Heterozygot	52,78%
	Homozygote	19,44%
Homburg Routine N=35	Wildtyp	34,29%
	Heterozygot	45,71%
	Homozygote	20,00%
χ^2 -Test	χ^2	5,84
	p-value	0,212
Fischer-Test	p-value	0,22

Tabelle 50: Unterschiede zwischen den PAH-Patienten für PAI 4G/5G zwischen Homburg und Amsterdam

		PAI 4G/5G
Amsterdam Nur PAH N=81 (von 81)	Wildtyp	16,05%
	Heterozygot	54,32%
	Homozygot	29,63,%
Homburg Beide Subgruppen zusammengefasst Nur PAH N=71 (von 305)	Wildtyp	30,99%
	Heterozygot	49,30%
	Homozygot	19,72%
χ^2 -Test	χ^2	5,34
	p-Wert	0,069
Fischer-Test	p-Wert	0,072

4.4.3 Zusammenfassung der Unterschiede der Mutationen zwischen Patienten aus Homburg und aus Amsterdam

Unter den Proben aus Amsterdam fanden sich deutlich weniger Patienten mit einer homozygoten MTHFR C677T-Mutation als unter den Proben aus Homburg (3,90% vs. 7,14%; $p=0,03$).

Außerdem war der Anteil der PAH-Patienten mit einer FVL- oder Prothrombinmutation unter den Homburger Patienten, die ihr Thrombophiliescreening über die Routinediagnostik erhalten haben, deutlich höher ist als unter den Patienten aus Amsterdam und der PH-Ambulanz. So fanden sich unter den PAH-Patienten der Routine 14,29% heterozygote FVL-Mutationsträger und 8,57% heterozygote Träger der Prothrombinmutation. Für beide Mutationen lagen keine homozygoten Mutationsträger vor. Unter den Patienten der PH-Ambulanz fanden sich dagegen nur 2,78% heterozygote FVL-Mutationsträger und keine Träger der Prothrombinmutation. Auch hier lagen keine homozygoten Mutationsträger vor. Die Allelfrequenz der FVL und der Prothrombinmutation unter den Proben der Homburger PH-Ambulanz unterschied sich damit kaum von den Ergebnissen der Amsterdamer Proben. Unter den Proben aus Amsterdam lag keine FVL-Mutation vor, Prothrombin war mit 1,23% ebenfalls sehr niedrig. Beide Gruppen unterschieden sich aber deutlich von den Proben der Routinediagnostik.

Die homozygote PAI 4G/5G-Mutation fand sich um etwa 10% häufiger unter den Proben aus Amsterdam als in den Proben aus Homburg. Die Proben der Ambulanz und der Routine unterschieden sich hier aber nicht (19,44% vs. 20%).

MTHFR C677T und PAI 4G/5G lagen in den beiden Subgruppen aus Homburg in einer ähnlichen Verteilung vor und unterscheiden sich hiermit allerdings deutlich von den Proben aus Amsterdam.

FVL und Prothrombin lagen dagegen unter den Proben aus Amsterdam und der Ambulanz relativ selten vor und unterscheiden sich deutlich von der Gruppe der Routinepatienten aus Homburg.

Tabelle 51: Unterschiede der PAH-Patienten aus Amsterdam und der Homburger PAH-Ambulanz für FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G

		FVL	Prothrombin	PAI 4G/5G
Amsterdam N=81	Wildtyp	100%	98,77%	16,05%
	Heterozygot	0%	1,23%	54,32%
	Homozygot	0,00%	0,00%	29,63%
Homburg Ambulanz N=36	Wildtyp	97,22%	100,00%	27,78%
	Heterozygot	2,78%	0,00%	52,78%
	Homozygot	0,00%	0,00%	19,44%

Tabelle 52: Unterschiede der PAH-Patienten aus Amsterdam und der PAH-Ambulanz für MTHFR C677T, MTHFR A1298C und Compound-MTHFR

		MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Compound- MTHFR
Amsterdam N=81	Wildtyp	45,45%	50,62%	76,62%
	Heterozygot	50,64%	45,68%	23,38%
	Homozygot	3,90%	3,70%	
Homburg Ambulanz N=36	Wildtyp	34,29%	47,6%	72,22%
	Heterozygot	48,57%	41,18%	27,77%
	Homozygot	17,14%	11,22%	

4.5 Einfluss der Polymorphismen auf die Letalität bei CTEPH

Neben der Frage, ob die Genetik Einfluss auf die Pathophysiologie der Erkrankung hat, ist auch die Frage interessant, ob bestimmte Polymorphismen die Prognose beeinflussen. Im Folgenden wird daher die Verteilung der Mutationen jeweils zwischen den überlebenden Patienten und den verstorbenen betrachtet.

Von den insgesamt 234 Patienten mit CTEPH waren bei der Verlaufskontrolle 16 verstorben.

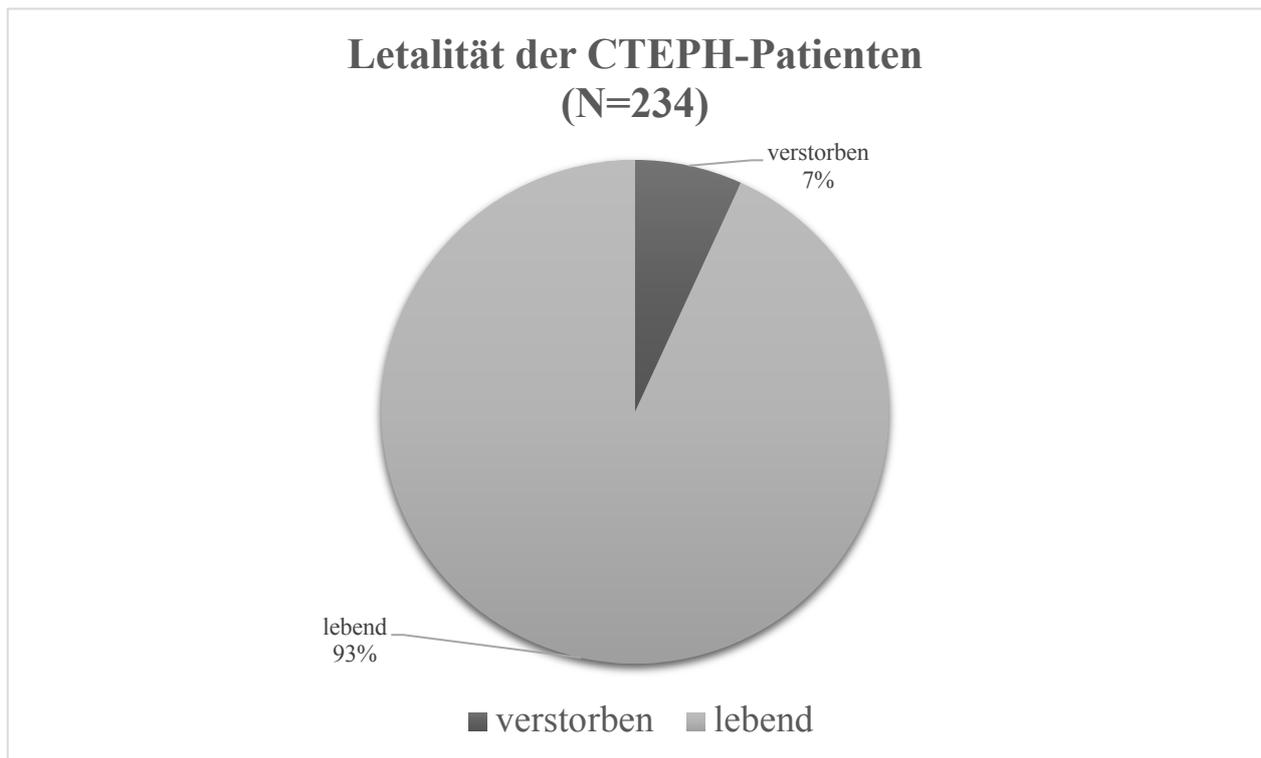


Abbildung 21: Letalität der CTEPH-Patienten

4.5.1 Einfluss von MTHFR C677T, A1298C und der Compound-Heterozygotie

Beim MTHFR C677T fanden sich 13,08% homozygote und 46,26% heterozygote Mutationsträger bei den Überlebenden. Der Anteil war unter den verstorbenen CTEPH-Patienten mit 6,25% homozygoten Trägern und 31,25% heterozygoten etwas geringer.

Der Wildtyp war unter den verstorbenen Patienten häufiger (62,5% vs. 40,65%).

Beim MTHFR A1298C fand sich ein deutlich höherer Teil sowohl an homozygoten als auch an heterozygoten Mutationsträgern unter den Verstorbenen (20% bzw. 53,33%) als unter den Überlebenden (5,69% bzw. 41,71%).

Die Compound-Heterozygotie fand sich bei 22,86% der Überlebenden und bei 26,67% der Verstorbenen.

Nur für die MTHFR A1298C-Mutation ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Mutationen ($p=0,036$), allerdings muss berücksichtigt werden, dass unter den Verstorbenen nur eine geringe Probenzahl ($N=16$) vorliegt.

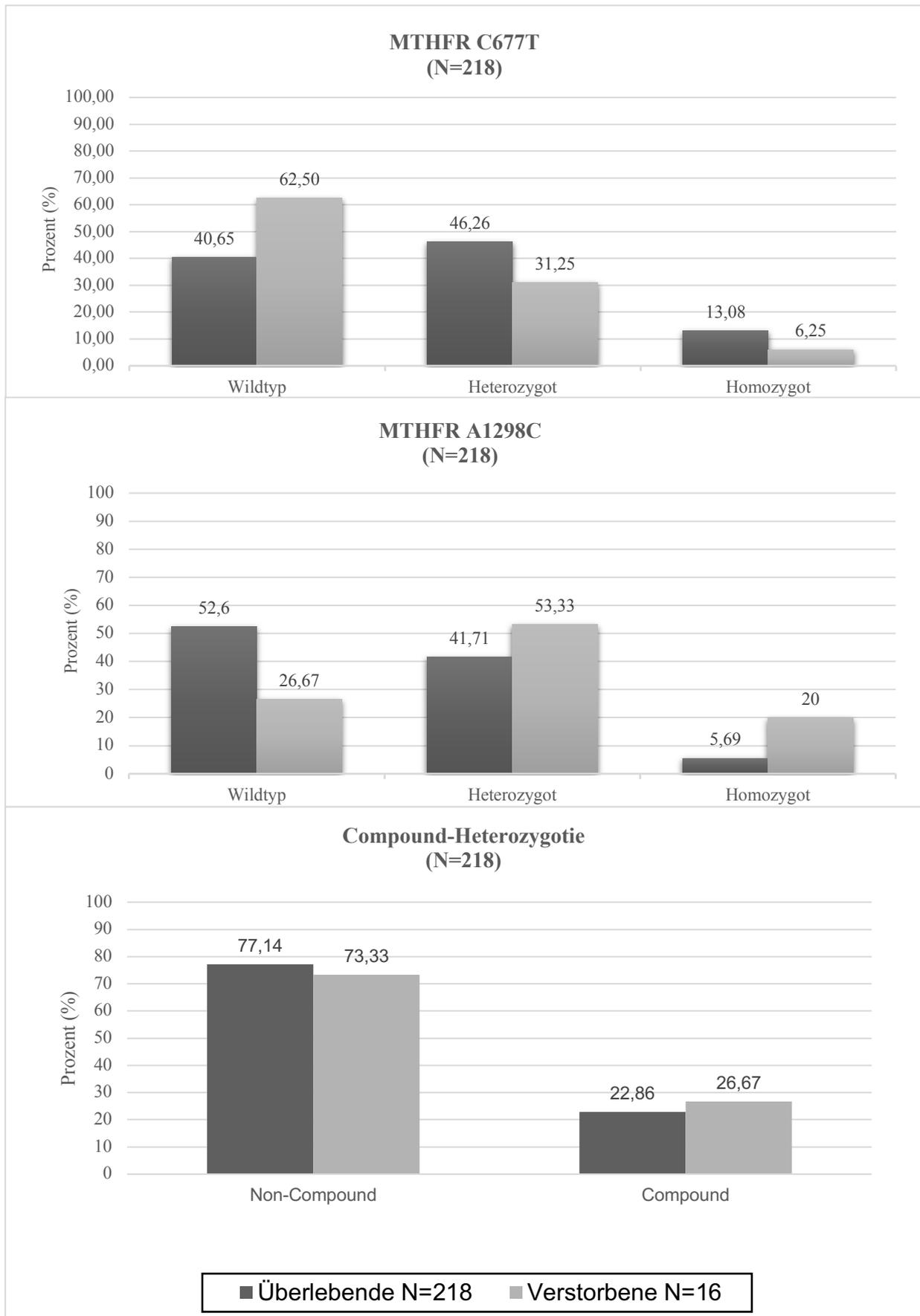


Abbildung 22: Unterschiede zwischen überlebenden und verstorbenen CTEPH-Patienten für MTHFR C677T, A1298C und die Compound-Heterozygotie

Tabelle 53: Unterschiede der relativen Häufigkeiten zwischen überlebenden und verstorbenen CTEPH-Patienten für MTHFR C677T, A1298C und die Compound-Heterozygotie

		MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Compound- Heterozygotie
Überlebend N=218	Wildtyp	40,65%	52,6%	77,14%
	Heterozygot	46,26%	41,71%	22,86%
	Homozygot	13,08%	5,69%	
Verstorben N=16	Wildtyp	62,50%	26,67%	73,33%
	Heterozygot	31,25%	53,33%	26,67%
	Homozygot	6,25%	20,00%	
χ^2 -Test	χ^2	2,978	6,62	0,00044663
	p-Wert	0,2256	0,036	0,9831
Fischer-Test	p-Wert	0,2781	0,03652	0,75

4.5.2 Einfluss von FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G

Unter den überlebenden CTEPH-Patienten fanden sich 8,41% Mutationsträger der Prothrombinmutation. Der Anteil unter den Verstorbenen lag mit 6,67% nur knapp darunter, eine Signifikanz besteht nicht ($p=1$).

Bei der FVL-Mutation war der Anteil unter den Verstorbenen etwas höher als unter den Überlebenden (13,33% vs. 10,32%). Der Unterschied war auch hier nicht signifikant ($p=0,9$).

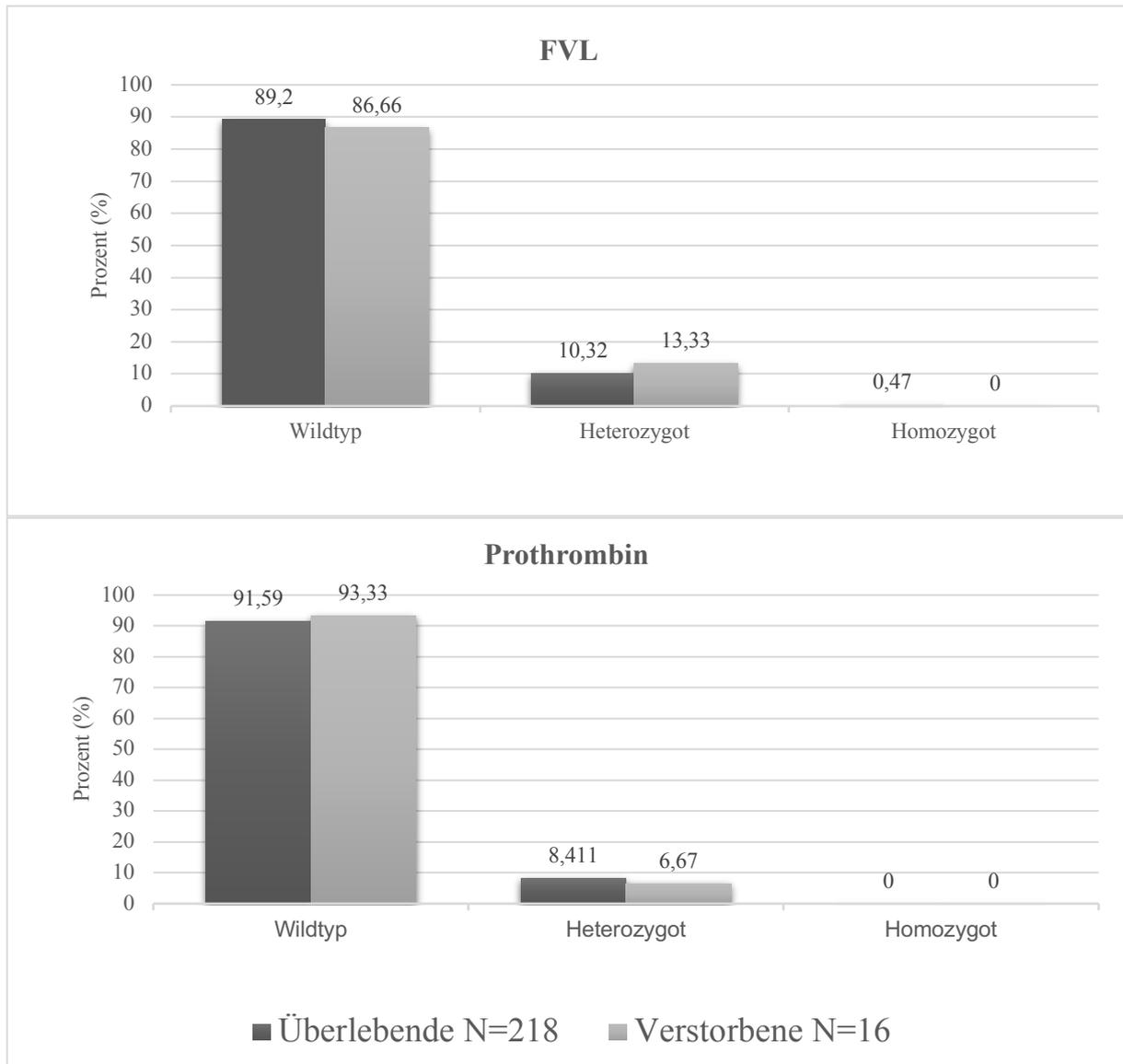


Abbildung 23: Verteilung der FVL-und Prothrombinmutation G2010A zwischen überlebenden und verstorbenen CTEPH-Patienten

Beim PAI 4G/5G-Polymorphismus fand sich eine ähnliche Verteilung der homozygoten Mutationsträger (überlebend=31,46%; verstorben=33,33%). Der Anteil der heterozygoten Mutationen war unter den Überlebenden mit 51,17% etwas höher als unter den Verstorbenen (40%). Die Unterschiede zwischen den überlebenden und den verstorbenen CTEPH-Patienten waren nicht signifikant (p=0,56).

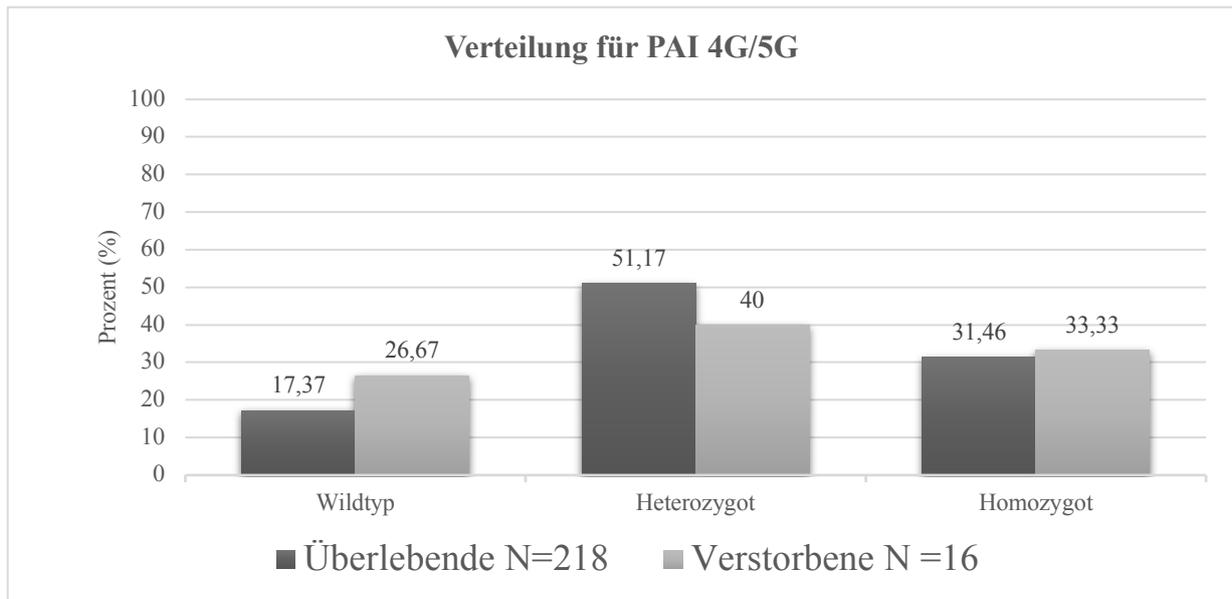


Abbildung 24: Verteilung der PAI 4G/5G-Mutation zwischen überlebenden und verstorbenen CTEPH-Patienten

Tabelle 54: Unterschiede der relativen Häufigkeiten der CTEPH-Patienten für Prothrombin G2010A, FVL und PAI 4G/5G unter Überlebenden und Verstorbenen

		Prothrombin	FVL	PAI 4G/5G
Überlebend N=218	Wildtyp	91,59%	89,2%	17,37%
	Heterozygot	8,411%	10,32%	51,17%
	Homozygot	0,00%	0,47%	31,46%
Verstorben N=16	Wildtyp	93,33%	86,66%	26,67%
	Heterozygot	6,67%	13,33%	40,00%
	Homozygot	0,00%	0,00%	33,33%
χ^2 -Test	χ^2	6,193	0,20073	1,0359
	p-Wert	1	0,9045	0,5957
Fischer-Test	p-Wert	1	0,6	0,5604

4.6 Einfluss der Polymorphismen auf die Letalität bei PAH

Unter den PAH-Patienten zeigte sich eine höhere Sterblichkeit als unter den Patienten mit einer CTEPH. Insgesamt waren 44 von 152 Patienten zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung verstorben.

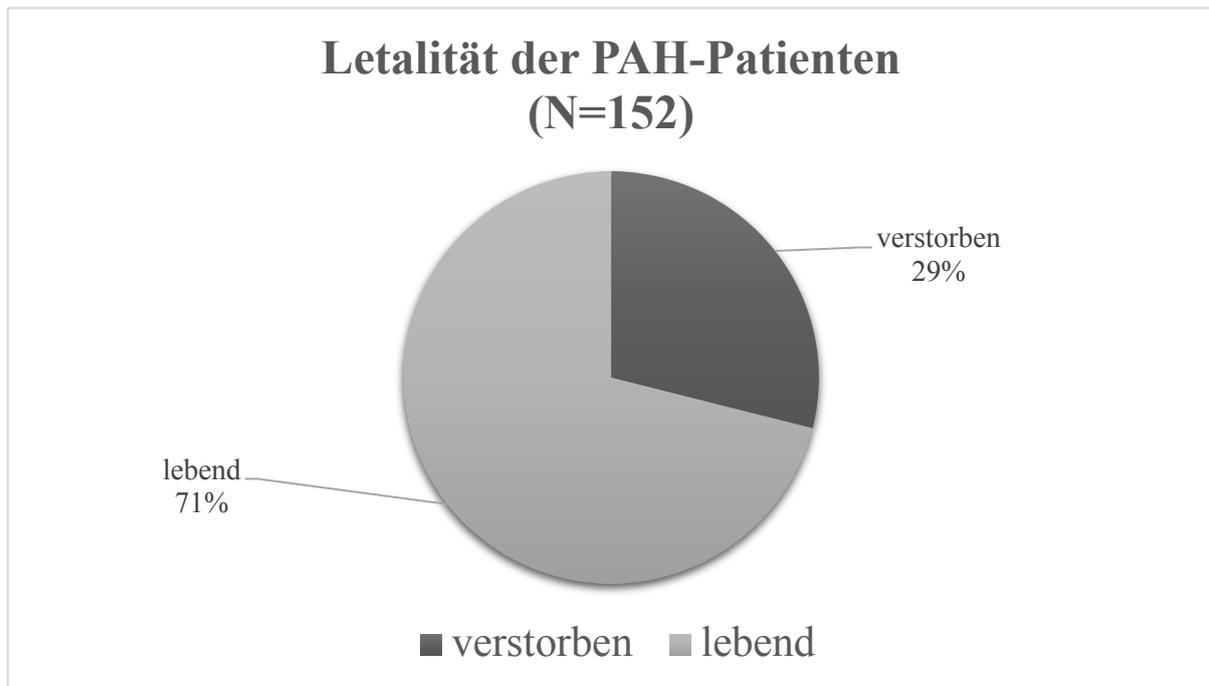


Abbildung 25: Letalität der PAH-Patienten

4.6.1 Einfluss von MTHFR C677T, MTHFR A1298C und Compound-Heterozygotie

Die MTHFR C677T-Mutation war sowohl bei den überlebenden als auch bei den verstorbenen PAH-Patienten ähnlich verteilt. (10,48% unter den Überlebenden; 9,52% unter den Verstorbenen). Es fanden sich etwa 10% mehr heterozygote Mutationsträger unter den Verstorbenen als unter den Überlebenden ($p=0,57$).

Bei der MTHFR A1298C-Mutation fand sich ein höherer Anteil an homozygoten Mutationsträgern unter den überlebenden PAH-Patienten als unter den verstorbenen (9,43% gegenüber 2,33%). Der Anteil der heterozygoten Mutation war dagegen ähnlich (43,4% bei den Überlebenden, 44,19% bei den Verstorbenen). Die Unterschiede erreichten keine Signifikanz ($p=0,3$).

Auch für die Compound-Heterozygotie fand sich eine sehr ähnliche Verteilung. Unter den überlebenden PAH-Patienten fanden sich 23,58% Compound-Mutationen und unter den verstorbenen 21,95%. Zusammenfassend ergaben sich für MTHFR C677T, MTHFR A1298C

und die Compound-Heterozygotie keine signifikanten Unterschiede zwischen überlebenden und verstorbenen CTEPH-Patienten im χ^2 -Test und im Fischer-Test.

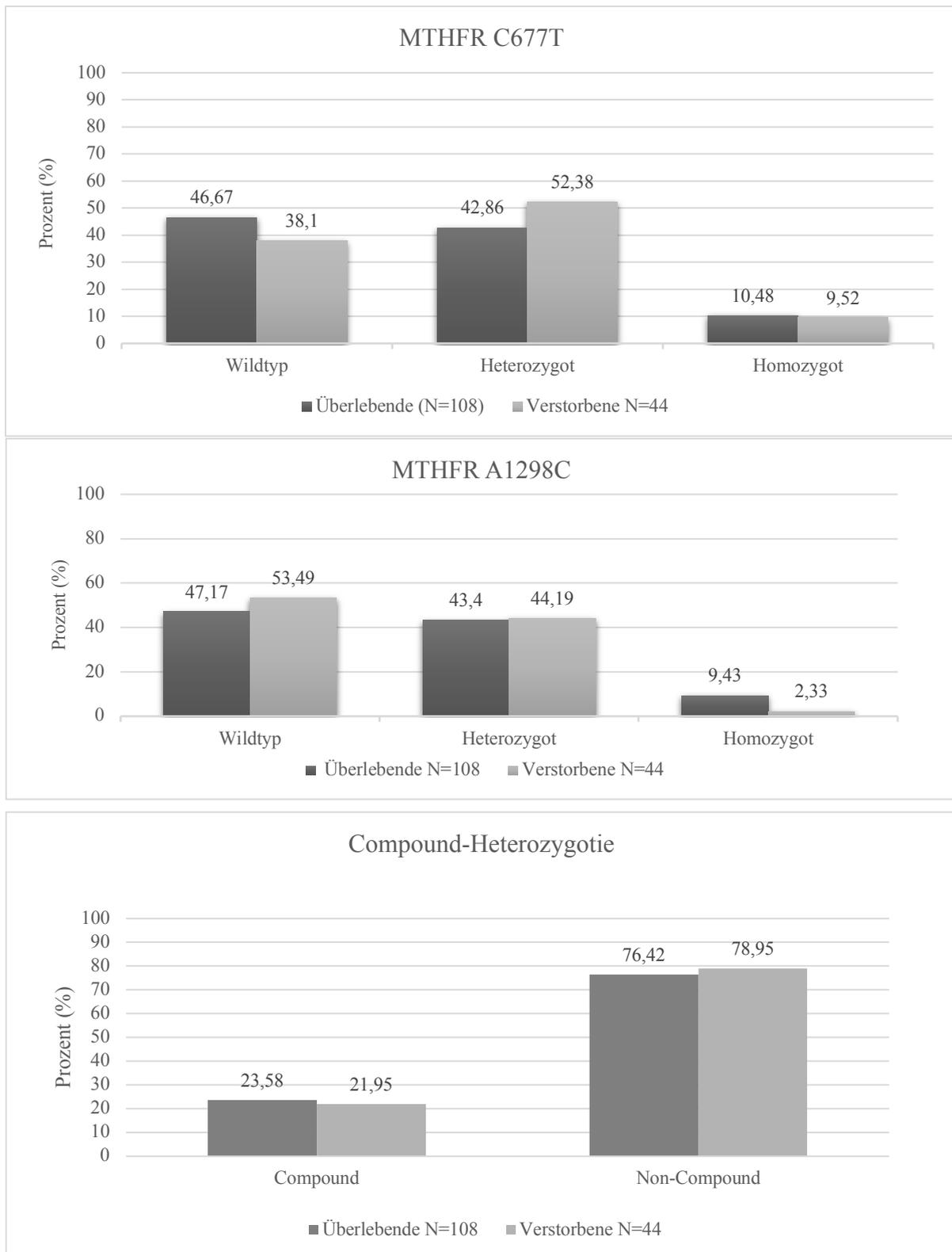


Abbildung 26: Verteilung der MTHFR-Mutationen zwischen überlebenden und verstorbenen PAH-Patienten

Tabelle 55: Unterschiede der relativen Häufigkeit der MTHFR C677T- und A1298C-Mutation und der Compound-Heterozygotie zwischen überlebenden und verstorbenen PAH-Patienten

		MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Compound-MTHFR
Überlebende N=108	Wildtyp	46,67%	47,17%	76,42%
	Heterozygot	42,86%	43,40%	23,58%
	Homozygot	10,48%	9,43%	
Verstorbene N=44	Wildtyp	38,10%	53,49%	78,95%
	Heterozygot	52,38%	44,19%	21,95%
	Homozygot	9,52%	2,33%	
χ^2 -Test	χ^2	1,1221	2,3474	1,549
	p-Wert	0,5706	0,30	1
Fischer-Test	p-Wert	0,6011	0,3505	1

4.6.2 Einfluss von Prothrombin G2010A, FVL und PAI-1 4G/5G

Die FVL-Mutation fand sich unter den überlebenden und den verstorbenen PAH-Patienten mit einer ähnlichen Häufigkeit (3,7% bei den Überlebenden; 4,55% bei den Verstorbenen).

Die heterozygote Prothrombinmutation lag unter den verstorbenen PAH-Patienten etwas häufiger vor als unter den Überlebenden (4,55% vs. 1,85%). Homozygote Mutationsträger fanden sich weder bei der Prothrombinmutation G2010A noch bei der FVL-Mutation. Sowohl für die FVL als auch für die Prothrombinmutation G2010A fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen verstorbenen und überlebenden PAH-Patienten.

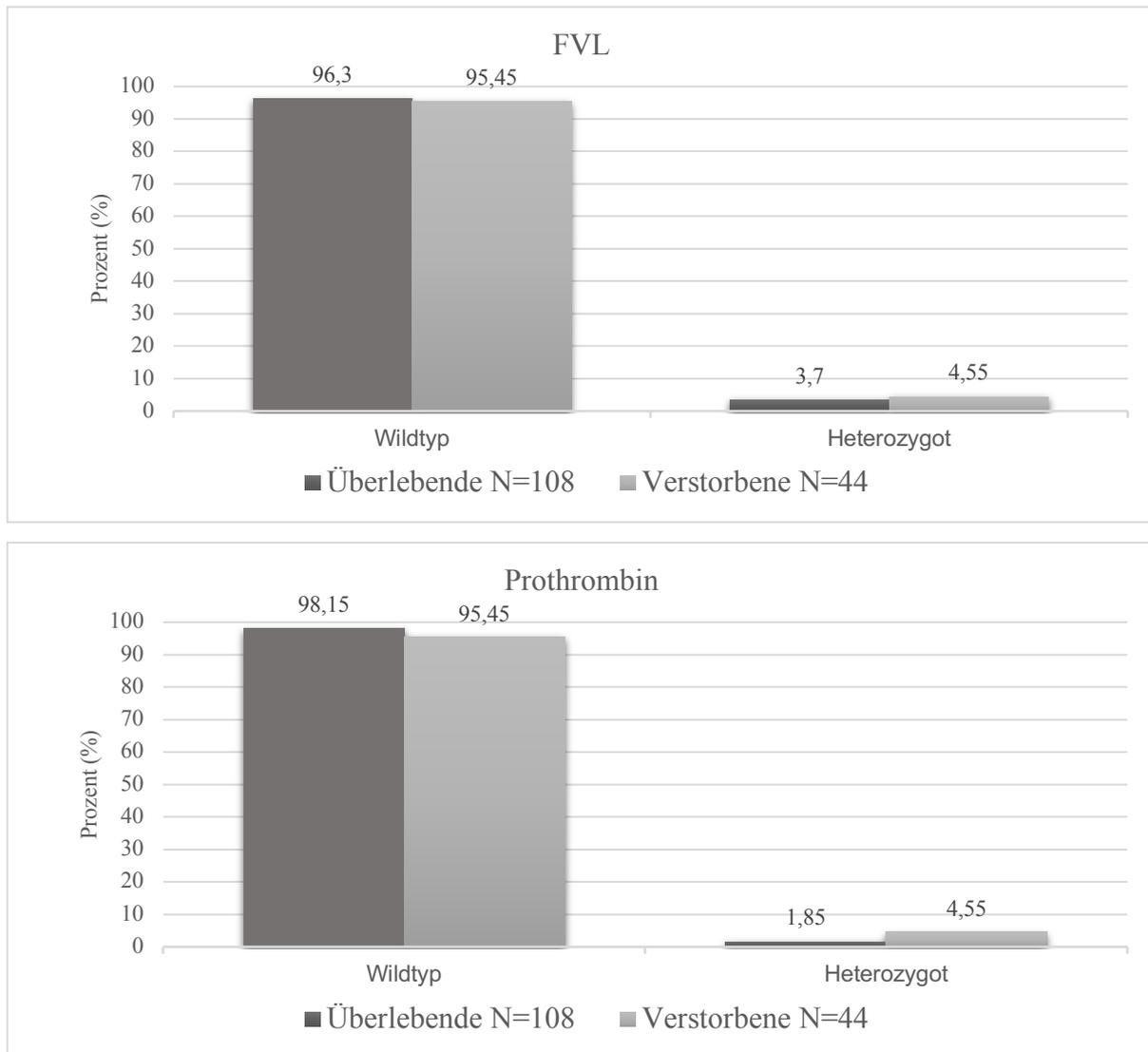


Abbildung 27: Verteilung der FVL- und Prothrombinmutation zwischen überlebenden und verstorbenen PAH-Patienten

Auch bei der PAI 4G/5G-Mutation ergaben sich ähnliche Häufigkeiten zwischen den beiden Gruppen. Unter den Überlebenden fanden sich 25,93% mit einem 4G/4G-Genotyp und unter den Verstorbenen 22,73%. Heterozygotie fand sich bei 50% der Überlebenden und 56,82% der Verstorbenen. Der Wildtyp lag bei 24,07% der überlebenden und bei 20,45% der verstorbenen PAH-Patienten vor. Der Unterschied der Verteilung der PAI 4G/5G-Mutation war ebenfalls nicht signifikant ($p=0,75$).

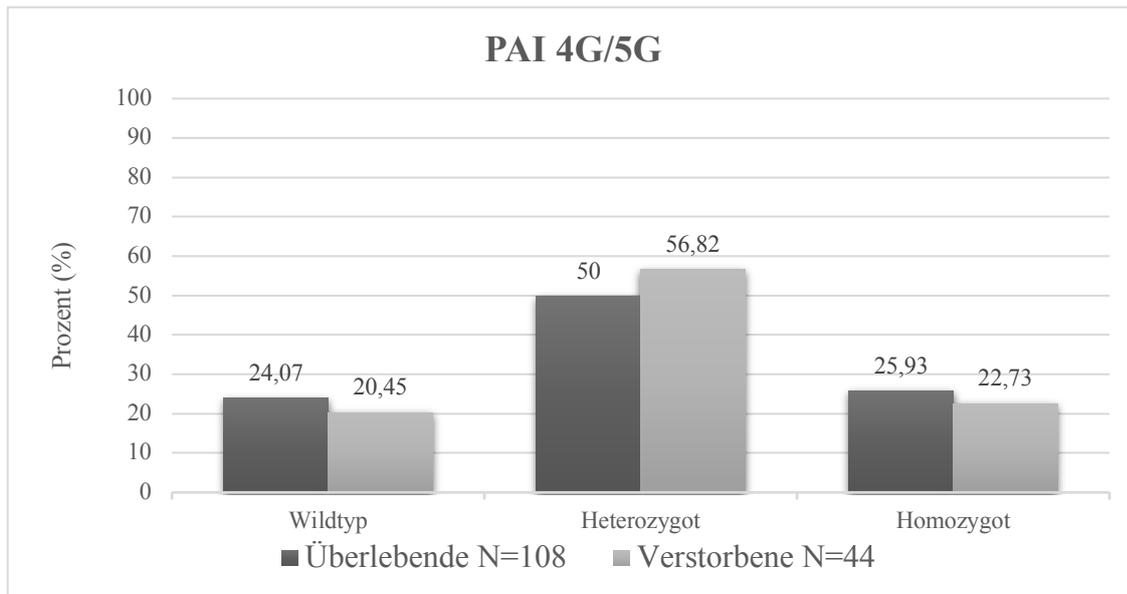


Abbildung 28: Verteilung der PAI 4G/5G-Mutation zwischen überlebenden und verstorbenen PAH-Patienten

Tabelle 56: Unterschiede der relativen Häufigkeiten der Mutationen Prothrombin G2010A, FVL und PAI 4G/5G zwischen überlebenden und verstorbenen PAH-Patienten

		Prothrombin	FVL	PAI 4G/5G
Überlebende N=108	Wildtyp	98,15%	96,30%	24,07%
	Heterozygot	1,85%	3,70%	50,00%
	Homozygot	0,00%	0,00%	25,93%
Verstorbene N=44	Wildtyp	95,45%	95,45%	20,45%
	Heterozygot	4,55%	4,55%	56,82%
	Homozygot	0,00%	0,00%	22,73%
χ^2 -Test	χ^2	0,1461	3,8586	0,58545
	p-Wert	0,7023	1	0,7462
Fischer-Test	p-Wert	0,5797	1	0,7927

4.7 Vergleich der Mutationshäufigkeit zwischen CTEPH-Patienten mit peripherer und zentraler Verteilung der Gefäßläsionen

Von den 234 Patienten mit einer CTEPH wurde bei 153 die Indikation zur PEA gestellt, bei 81 Patienten lag dagegen ein zu peripheres Verteilungsmuster der Gefäßokklusionen vor. Dies entspricht allerdings nicht der Anzahl der tatsächlich operierten Patienten, da bei einigen Patienten die OP aufgrund anderer Ursachen abgelehnt wurde. Mit der Fragestellung, ob die Genetik Einfluss auf das Verteilungsmuster bzw. die Operabilität hat, werden im Folgenden die Mutationen zwischen peripherem und zentralem Verteilungsmuster verglichen.

Für MTHFR C677T fanden sich in der Gruppe der Patienten mit einem peripheren Verteilungsmuster 43,04% heterozygote und 18,99% homozygote Mutationsträger. Der Anteil der homozygoten Mutationsträger war mit 9,33% unter den Patienten mit einem zentralen Verteilungsmuster der Gefäßläsionen etwas geringer, allerdings nicht signifikant ($p=0,1104$). Die homozygote MTHFR C677T-Mutation fand sich unter den Patienten mit einem peripheren Verteilungsmuster häufiger als unter den Patienten mit einem eher zentralen Verteilungsmuster (18,99% vs. 9,33%). Unter den Patienten mit einer zentralen Verteilung fand sich hingegen ein höherer Anteil an heterozygoten Mutationsträgern (46,67% vs. 43,04%) und des Wildtyps (44% vs. 37,97%). Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0,1104$).

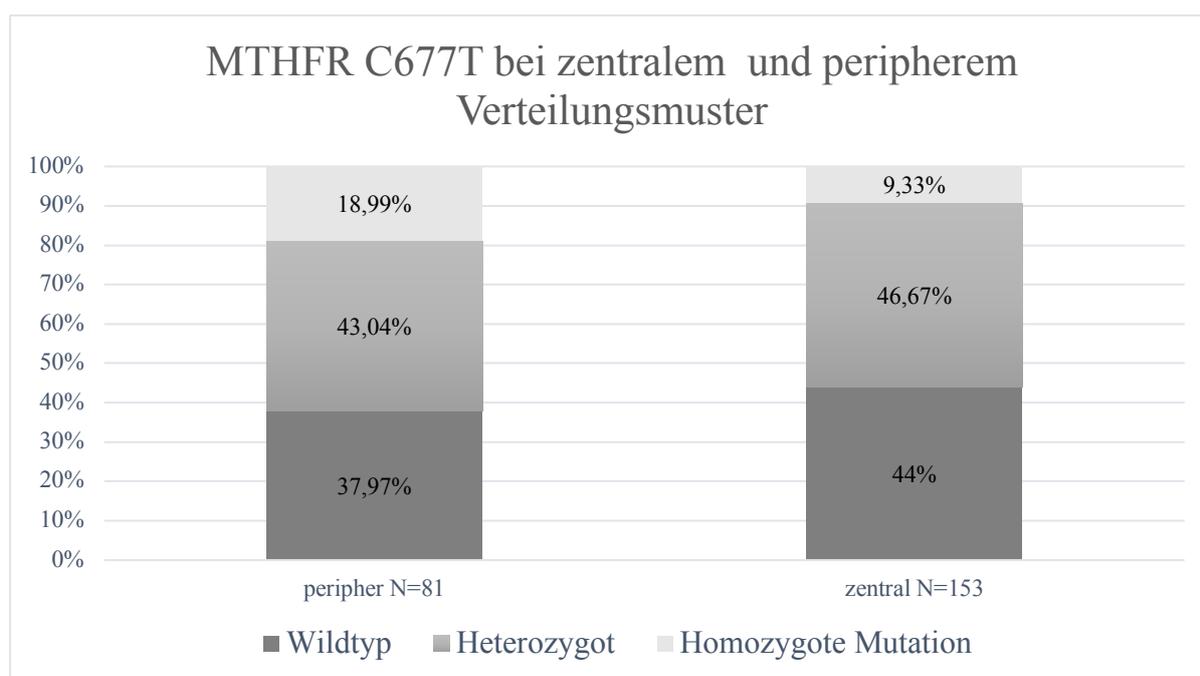


Abbildung 29: Häufigkeit der MTHFR C677T-Mutation bei CTEPH-Patienten mit zentralem und peripherem Verteilungsmuster der Gefäßveränderungen

Für MTHFR A1298C zeigte sich ebenfalls eine ähnliche Verteilung unter den beiden Gruppen. Der Anteil der Mutationsträgern lag bei 5,13% homozygoten Trägern und 37,18% heterozygoten Trägern unter den Patienten mit einem peripheren Verteilungsmuster und bei 7,43% homozygoten bzw. 45,28% heterozygoten Trägern bei den Patienten mit einem zentralen Verteilungsmuster ($p=0,3384$).

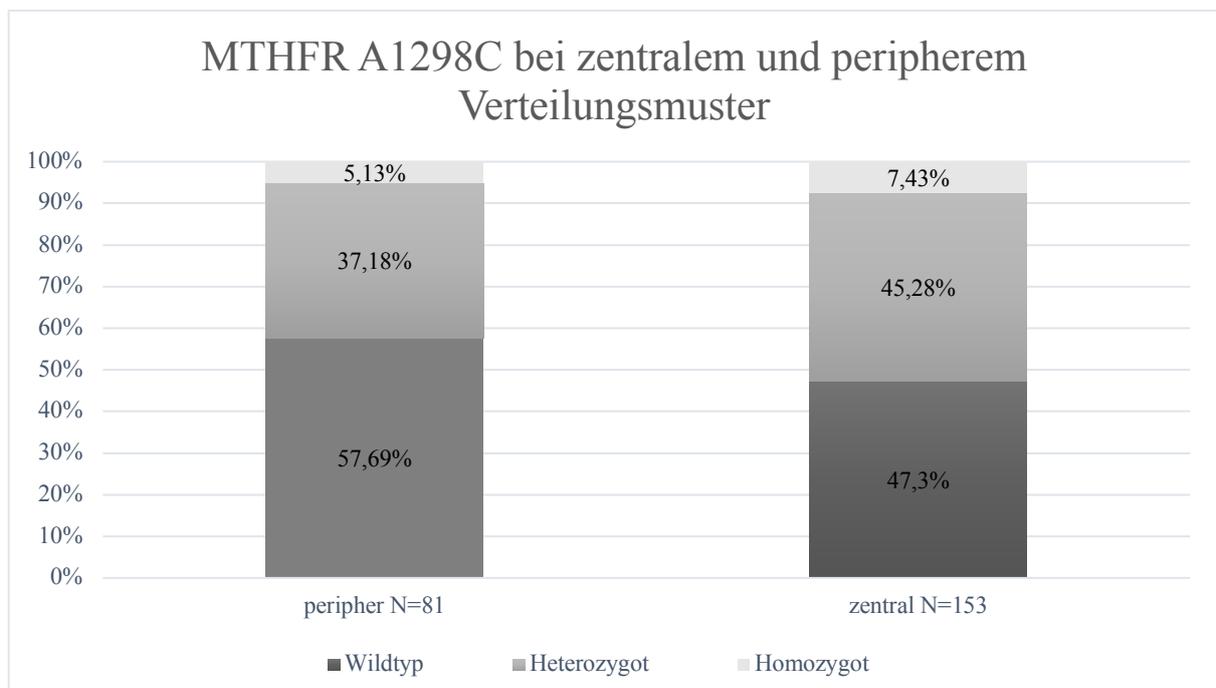


Abbildung 30: Verteilung der MTHFR A1298C-Mutation bei CTEPH-Patienten mit zentralem und peripherem Verteilungsmuster der Gefäßveränderungen

Unter den 81 Patienten mit einer peripheren Verteilung der Läsionen fanden sich 20,78% mit einer Compound-Heterozygotie, der Anteil unter den Patienten mit einer zentralen Verteilung lag bei 24,32%. Auch hier war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,6659$).

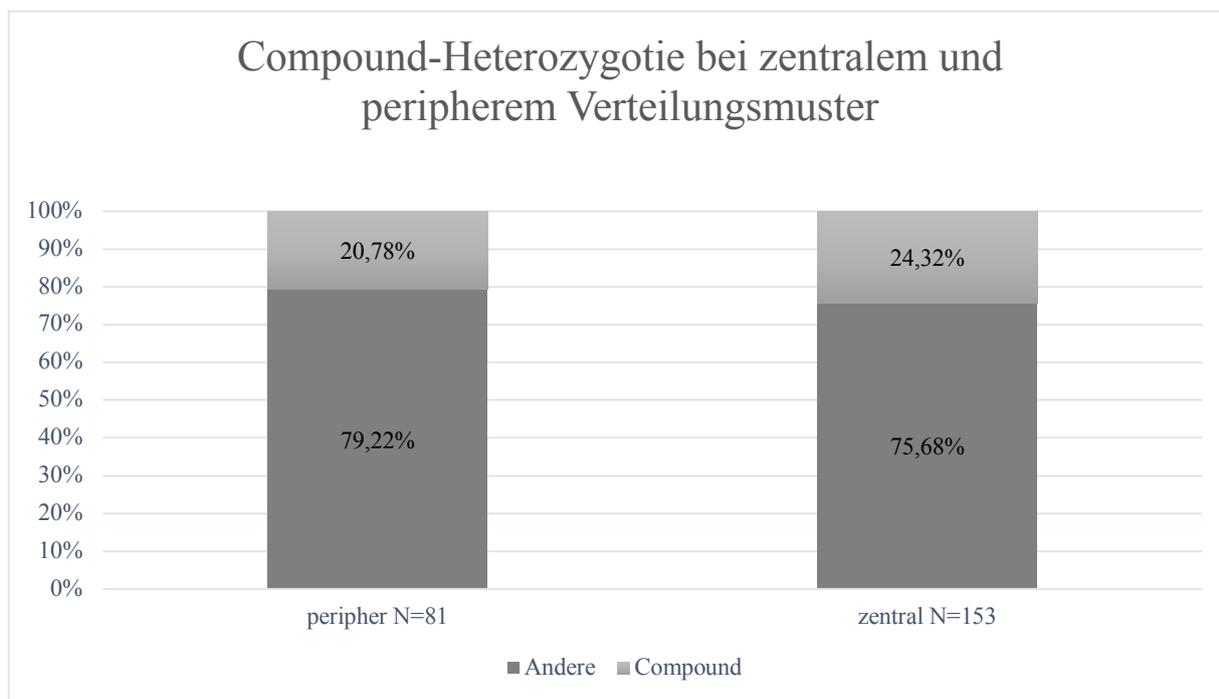


Abbildung 31: Verteilung der Compound-Heterozygotie bei CTEPH-Patienten mit zentralem und peripherem Verteilungsmuster der Gefäßveränderungen

Tabelle 57: Unterschiede der relativen Häufigkeiten für MTHFR C677T, A1298C und Compound-MTHFR zwischen zentraler und peripherer Gefäßverteilung

		MTHFR C677T	MTHFR A1298C	Compound- Heterozygotie
Peripher N=81	Wildtyp	37,97%	57,69%	79,22%
	Heterozygot	43,04%	37,18%	20,78%
	Homozygot	18,99%	5,13%	
Zentral N=153	Wildtyp	44%	47,30%	75,68%
	Heterozygot	46,67%	45,28%	24,32%
	Homozygot	9,33%	7,43%	
χ^2 -Test	χ^2	4,4065	2,2805	0,18649
	p-Wert	0,1104	0,3197	0,6659
Fischer-Test	p-Wert	0,1164	0,3384	0,6189

Bei der FVL-Mutation war der Anteil an Mutationsträgern mit 12% unter den Patienten mit einer zentralen Verteilung etwas höher als unter den Patienten mit einem peripheren Verteilungsmuster (7,79%). In der Gruppe mit einem peripheren Verteilungsmuster war ein

Patient Träger einer homozygoten FVL-Mutation. Der Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich im χ^2 -Test ebenfalls nicht signifikant ($p=0,4721$).

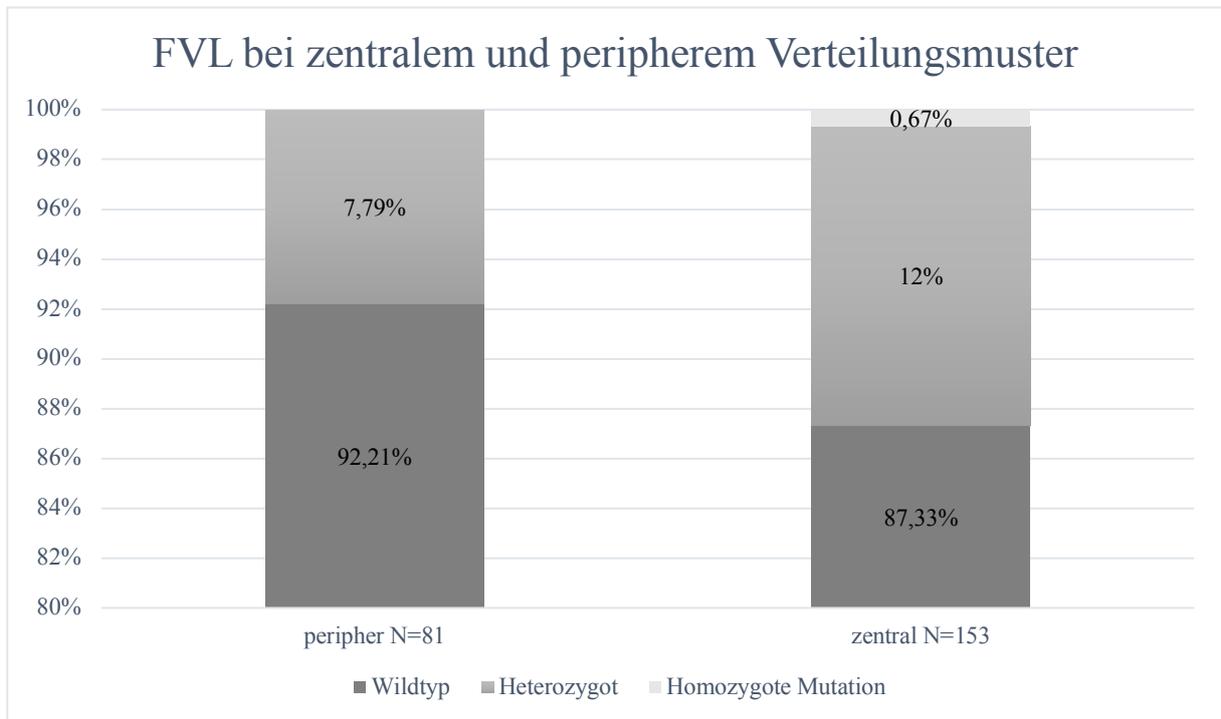


Abbildung 32: Häufigkeit der FVL-Mutation bei CTEPH-Patienten mit zentralem und peripherem Verteilungsmuster der Gefäßveränderungen

Die Prothrombinmutation fand sich bei 6,41% der Patienten mit einem peripheren Verteilungsmuster und bei 9,33% der Patienten mit einem zentralen Verteilungsmuster. Der Unterschied zeigte sich nicht signifikant ($p=0,61$).

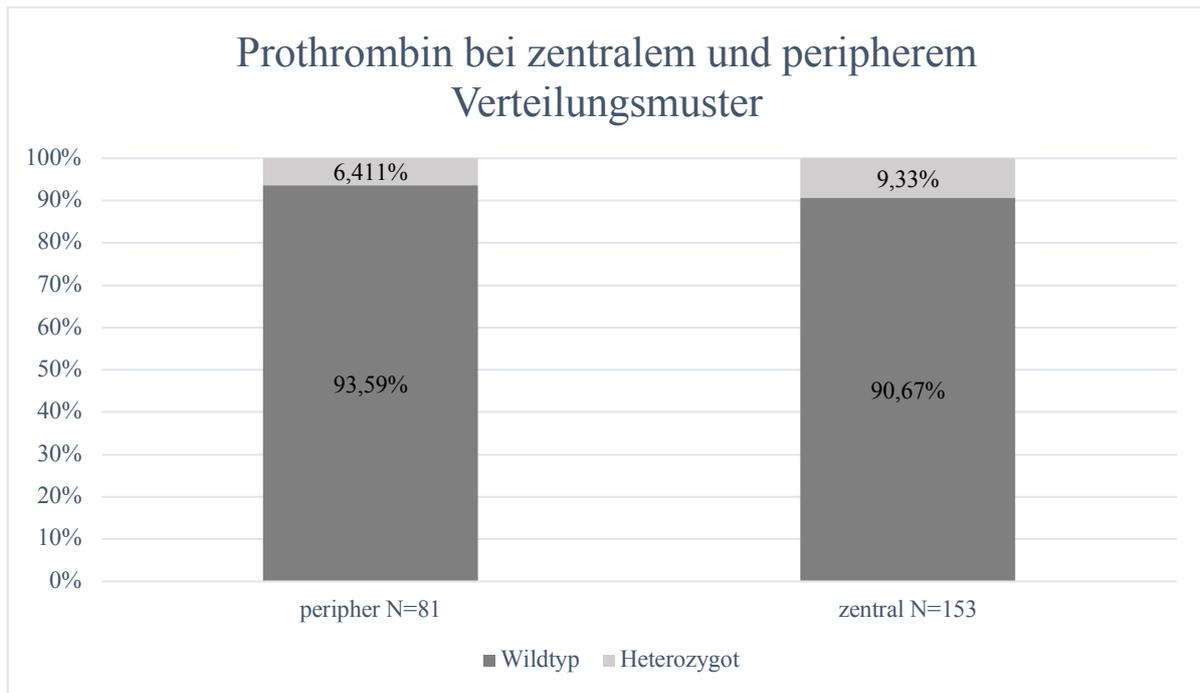


Abbildung 33: Häufigkeit der Prothrombinmutation bei CTEPH-Patienten mit zentralem und peripherem Verteilungsmuster der Gefäßveränderungen

Die Verteilung der PAI 4G/5G-Mutation war ebenfalls in beiden Subgruppen ähnlich. Der Anteil des 4G/4G-Genotypes lag bei 30,77% unter den Patienten mit einer peripheren Verteilung und bei 31,54 % unter den Patienten mit einer zentralen Verteilung. Heterozygot waren jeweils 51,28% der Patienten mit peripherem und 50,33% der Patienten mit zentralem Verteilungsmuster. Es lagen jeweils 18% des Wildtyps in beiden Gruppen vor. Auch für PAI 4G/5G fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Zusammengefasst ergaben sich für alle untersuchten Mutationen keine signifikanten Unterschiede zwischen einem zentralen und einem peripheren Verteilungsmuster der Gefäßveränderungen der Lungenstrombahn.

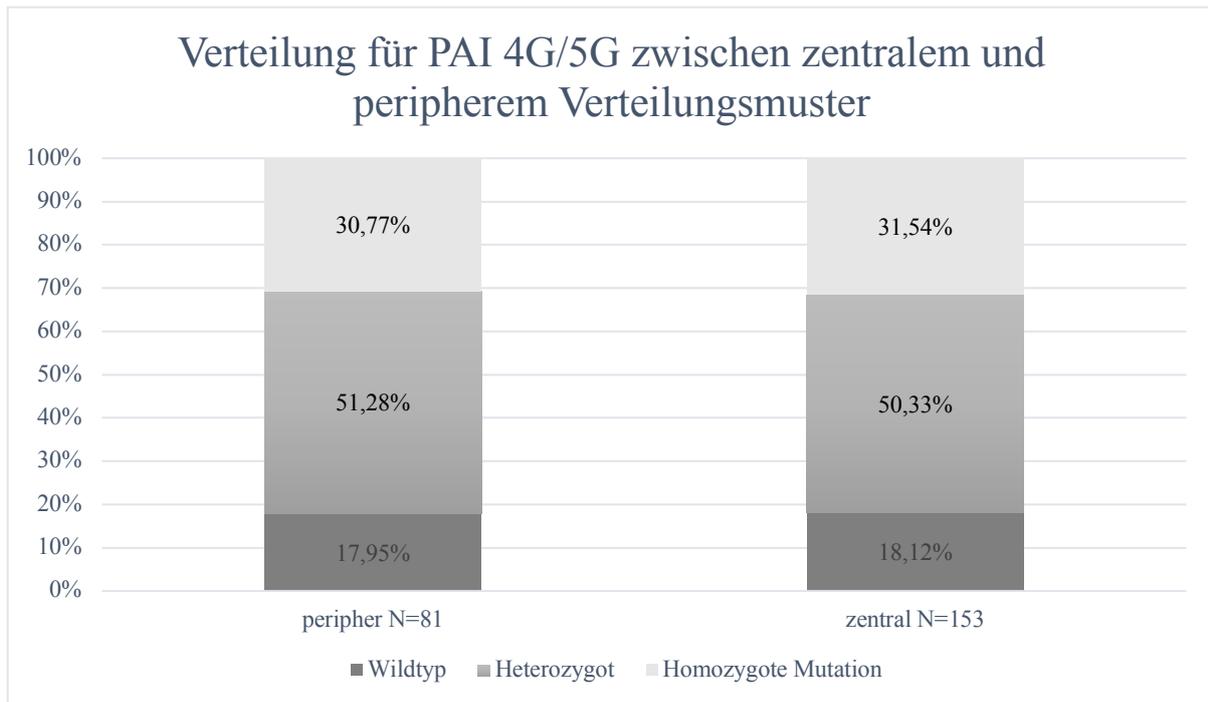


Abbildung 34: Verteilung der PAI 4G/5G-Mutation bei CTEPH-Patienten mit zentralem und peripherem Verteilungsmuster der Gefäßveränderungen

Tabelle 58: Unterschiede der relativen Häufigkeiten für FVL, Prothrombin G2010A und PAI 4G/5G zwischen zentraler und peripherer Verteilung der Gefäßläsionen

		Prothrombin	FVL	PAI 4G/5G
peripher N=81	Wildtyp	93,59%	92,21%	17,95
	Heterozygot	6,41%	7,79%	51,28
	Homozygot	0%	0%	30,77
zentral N=153	Wildtyp	90,67%	87,33%	18,12
	Heterozygot	9,33%	12%	50,33
	Homozygot	0%	0,67%	31,54
χ^2 -Test	χ^2	0,2551	1,5013	0,0179709
	p-Wert	0,6135	0,4721	0,9902
Fischer-Test	p-Wert	0,6148	0,584	1

5 Diskussion

5.1 Epidemiologie der Mutationen innerhalb Europas

Die vorliegende Arbeit umfasst keine Kontrollgruppe und daher müssen die Ergebnisse mit Referenzwerten aus der Literatur verglichen werden. Eine besondere Herausforderung stellt hierbei die Tatsache dar, dass die Patienten aus verschiedenen Einzugsgebieten stammen (Niederlande und Deutschland) und sich hieraus möglicherweise unterschiedliche Prävalenzen innerhalb der gesunden Bevölkerung ergeben. Hinzu kommt, dass die Herkunft auch mit der Einteilung korreliert, da alle Patienten aus den Niederlanden eine PAH vorweisen, während das Patientenkollektiv aus Deutschland einen größeren Anteil an Patienten mit CTEPH beinhaltet. Es ist daher unumgänglich, die Verteilung der Mutationen in den beiden Ländern genauer zu betrachten und kritisch zu hinterfragen, ob unsere Ergebnisse möglicherweise durch die unterschiedliche Herkunft der Proben beeinflusst worden sind.

5.1.1 MTHFR C677T und A1298C

Für beide MTHFR-Mutationen besteht ein Nord-Süd-Gefälle innerhalb Europas. (NEFIC et al., 2018) Die Niederlande und Deutschland liegen beide zwischen 40° und 60° nördlicher Breite und in diesem Gebiet ist eine ähnliche Verteilung zu erwarten. Dies zeigt sich auch, wenn man die Verteilung der Genotypen von gesunden Probanden aus anderen Studien betrachtet. Insgesamt scheint sowohl die homozygote MTHFR C677T-Mutation als auch die MTHFR A1298C-Mutation in beiden Ländern im unteren Bereich der angegebenen Referenzwerte für Kaukasier zu liegen. In Deutschland finden sich 9,5-11,5% homozygote Mutationsträger der MTHFR C677T-Mutation und in den Niederlanden 9-12%. (DE MAAT et al., 2004; KURZWELLY et al., 2010; NEFIC et al., 2018; THIRUMARAN et al., 2005; WU et al., 2015) Beim MTHFR A1298C-Polymorphismus scheint die Verteilung mit 8% homozygoten Mutationen in Deutschland und 9% in den Niederlanden ebenfalls gleich. (KURZWELLY et al., 2010; LACHMEIJER et al., 2001; NEFIC et al., 2018; WU et al., 2015)

Tabelle 59: Prävalenz von *MTHFR C677T* und *MTHFR A1298C* in Deutschland und den Niederlanden

	Literatur	Genotyp (%)
MTHFR C677T	Deutschland N=212 (KURZWELLY et al., 2010; NEFIC et al., 2018)	CC=45,28% CT=45,28% TT=9,434%
	Deutschland N=1448 (NEFIC et al., 2018; THIRUMARAN et al., 2005)	CC=41,44% CT=47,03% TT=11,53%
	Niederlande N=157 (DE MAAT et al., 2004; WU et al., 2015)	CC=40,13% CT=47,78% TT=12,10%
	Niederlande N=120 (LACHMEIJER et al., 2001; WU et al., 2015)	CC=48,33% CT=42,5% TT=9,17%
MTHFR A1298C	Deutschland N=212 (KURZWELLY et al., 2010; NEFIC et al., 2018)	AA=50% AC=41,98% CC=8,02%
	Niederlande N=120 (LACHMEIJER et al., 2001; WU et al., 2015)	AA=37,5% AC=53,33% CC=9,17%

In der vorliegenden Arbeit fand sich die homozygote *MTHFR C677T*-Mutation unter den Patienten aus Amsterdam deutlich seltener als unter den Patienten aus Homburg (3,89% vs. 18,18% und 12,65%; $p=0,046$) und lag damit auch deutlich unter dem Wert, der in der Literatur für die Niederlande angegeben wird. Der Unterschied der Patienten aus Amsterdam und Homburg zeigte sich auch bei isolierter Betrachtung der PAH-Patienten. Unter den PAH-Patienten aus Homburg lagen ebenfalls deutlich mehr homozygote Mutationsträger vor als unter den PAH Patienten aus Amsterdam (17,14% vs. 3,89%).

Die Ergebnisse für *MTHFR A1298C* waren ähnlich. Unter den Patienten aus Amsterdam fanden sich nur 3,7% homozygote Mutationsträger gegenüber 7,41% unter den Proben der Homburger PH-Ambulanz und 7,92% unter den Routinepatienten. Auch bei *MTHFR A1298C* bestand der Unterschied bei reiner Betrachtung der PAH-Patienten aus Amsterdam und Homburg (3,7% vs. 11,76%).

Für *MTHFR C677T* ist der Unterschied zwischen den Zentren signifikant ($p=0,046$), für *MTHFR A1298C* nicht.

Der geringe Anteil an homozygoten Mutationsträgern in Amsterdam ist durch die Herkunft der Proben nicht zu erklären, da die Werte von der Literatur deutlich abweichen. Dass der Anteil an beiden heterozygoten MTHFR-Mutationen unter den Proben aus Amsterdam etwa denen in Homburg entspricht, deutet ebenfalls daraufhin, dass die Allelfrequenz in Amsterdam durchaus ähnlich ist, aber homozygote Mutationsträger dennoch seltener sind.

Auch die Differenzierung in PAH oder CTEPH scheint keine Ursache darzustellen, da sich beim Vergleich der homozygoten Mutationsträger sowohl für MTHFR C677T (10,2% vs. 12,6%) als auch für MTHFR A1298C (7,38% vs. 6,64%) kein signifikanter Unterschied zwischen PAH und CTEPH ergibt.

Die niedrige Prävalenz scheint nur für die PAH-Patienten aus Amsterdam zu gelten, die Mutationshäufigkeit unter den Homburger PAH-Patienten entspricht dem erwarteten Wert der Literatur.

Hieraus ergibt sich, dass sowohl die unterschiedliche Herkunft als auch die Einteilung in PAH gegenüber CTEPH keine plausible Erklärung für den niedrigen Anteil an Mutationsträgern unter den Patienten aus Amsterdam darstellt. Eine Ursache könnte daher in der unterschiedlichen Zusammensetzung der PAH-Patienten aus Homburg und Amsterdam liegen. Unter den Proben aus Amsterdam befinden sich nur Patienten mit einer IPAH oder HPAH. Unter den PH-Proben aus Homburg dagegen stellen assoziierte Formen und IPAH-Patienten die größten Gruppen dar und die Zusammensetzung ist deutlich heterogener (siehe Abb. 35). Ein isolierter Vergleich der IPAH- und HPAH-Patienten zwischen Homburg und Amsterdam ergäbe seitens der Patienten aus Homburg eine zu kleine Subgruppe (N=24), sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass unter IPAH/HPAH ein niedrigerer Anteil an homozygoten MTHFR C677T-Mutationen vorliegt als unter den anderen Formen der PAH.

Auch interessant bei der Betrachtung der Zusammensetzung ist der hohe Anteil der HPAH-Patienten unter den Patienten aus Amsterdam (25%). Da bei den Patienten mit HPAH bereits eine genetische Prädisposition vorliegt, könnten sich diese Patienten bezüglich der Mutationshäufigkeiten von den übrigen PAH-Patienten unterscheiden. Grundsätzlich wäre sowohl eine Häufung einzelner Mutationen als auch eine niedrigere Anzahl an Mutationsträgern unter Patienten mit einer HPAH denkbar.

Tabelle 60 stellt die Häufigkeiten der MTHFR C677T-Mutation der IPAH- und HPAH-Patienten aus Amsterdam gegenüber. Zwischen den Gruppen findet sich bezüglich der MTHFR C677T-Mutation kein relevanter Unterschied. Der höhere Anteil an HPAH-Patienten scheint kein Grund für die niedrige Prävalenz der MTHFR C677T-Mutation unter den Patienten aus Amsterdam zu sein. Einschränkend sei allerdings auf die kleine Patientenzahl hingewiesen.

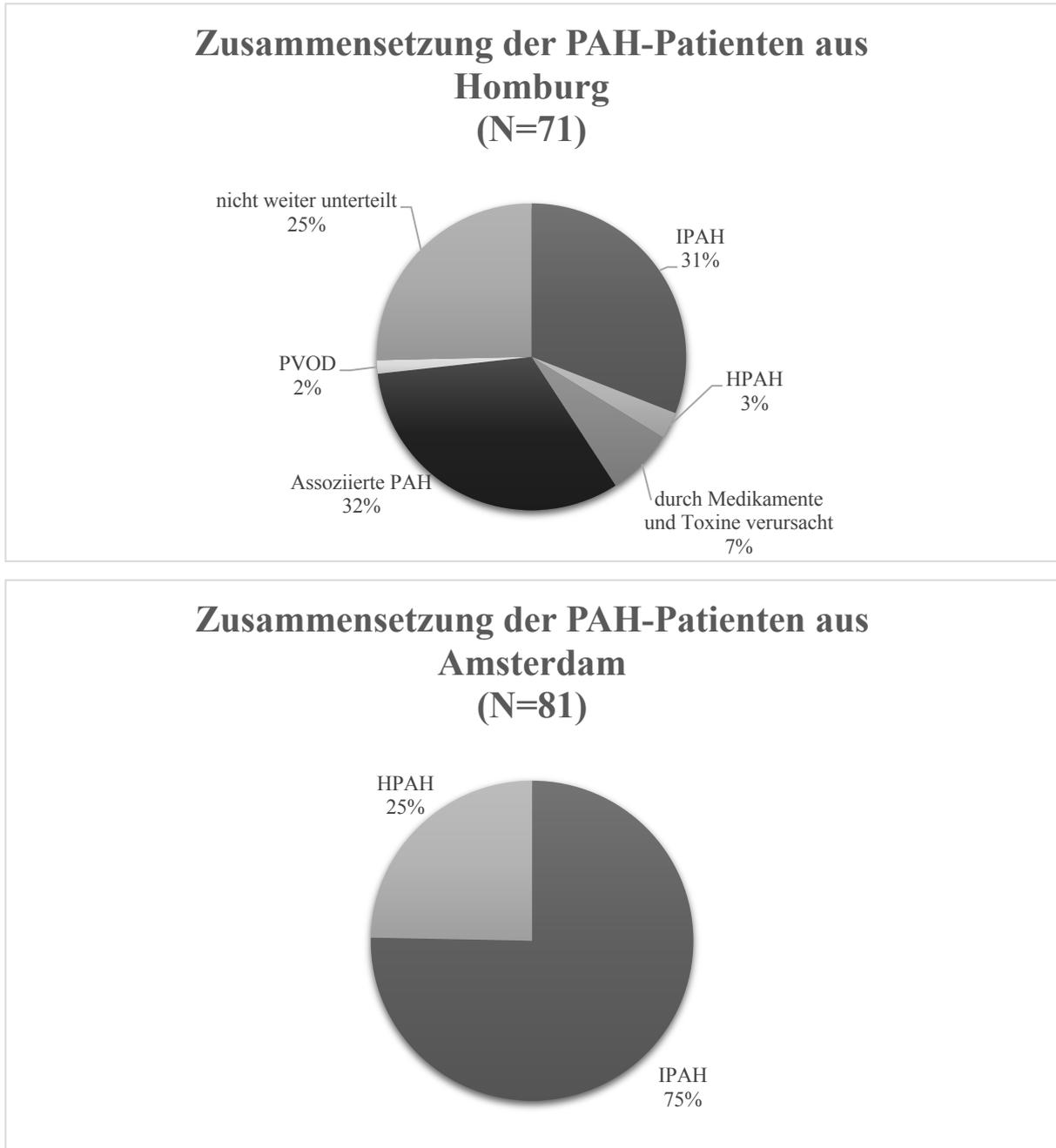


Abbildung 35: Zusammensetzung der PAH-Patienten dieser Studie aus Homburg und Amsterdam

Tabelle 60: Unterschiede zwischen HPAH und IPAH bezüglich MTHFR C677T unter den Patienten aus Amsterdam

	Homozygot	Heterozygot	Wildtyp
HPAH N=20	5%	50%	45%
IPAH N=61	3,29%	47,54%	49,18%

Ein vermindertes Auftreten von Mutationsträgern unter bestimmten Formen der PAH könnte mehrere Ursachen haben. So könnte die Mutation einen protektiven Effekt auf die Entstehung der Erkrankung gegenüber dem Wildtyp zeigen.

Während die Mutation vorwiegend mit Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, haben Polymorphismen mit weiter Verbreitung auch gewisse Selektionsvorteile, sodass auch ein positiver Effekt bei einigen Erkrankungen möglich ist.

So konnte der TT-Genotyp mit einem geringeren Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome in Zusammenhang gebracht werden. (XU et al., 2017) Auch ein geringeres Risiko zur Entwicklung einer akuten lymphatischen Leukämie für Mutationsträger der MTHFR C677T- und MTHFR A1298C-Mutation konnte nachgewiesen werden. (SKIBOLA et al., 1999)

Umgekehrt wäre es möglich, dass Mutationsträger besonders fulminante Verläufe unter IPAH/HPAH-Patienten zeigen und durch die kürzere Überlebenszeit seltener in der Gendatenbank aus Amsterdam vertreten sind. In diesem Zusammenhang wäre ebenso denkbar, dass weitere hereditäre Ursachen der IPAH/HPAH-Patienten in Kombination mit der MTHFR C677T-Mutation zu einem genetischen Selektionsnachteil führen. Die Extremform dieser These würde bedeuten, dass die Kombination bestimmter mit IPAH/HPAH assoziierter Gene bei gleichzeitigem Vorliegen des MTHFR-Polymorphismus nicht mit dem Leben vereinbar ist. Eine weitere Erklärung könnte in der Beeinflussung der Form der PH liegen. Träger der MTHFR C677T-Mutation könnten dazu neigen, andere Subformen der PH auszubilden. So käme es beispielsweise unter Mutationsträgern eher zur Ausbildung einer CTEPH als zur Entstehung einer IPAH .

Letztlich sind dies allerdings Theorien und bei der Beurteilung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Patientengruppe der PAH-Patienten aus Amsterdam nur eine relativ kleine Kohorte (N=81) umfasst. Viele Prävalenzstudien der MTHFR-Mutationen umfassen über 1000 Patienten. Es zeigen sich in der Literatur zur Prävalenz der MTHFR-Mutation einzelne Studien mit kleineren Stichproben, die von den Ergebnissen größerer Metaanalysen abweichen. Eine abschließende Erklärung, warum sich vergleichsweise wenig MTHFR C677T-Mutationsträger unter den Proben aus Amsterdam finden, liefert die vorliegende Arbeit nicht.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass sich in der vorliegenden Arbeit unter den Patienten aus Amsterdam ein niedriger Anteil an homozygoten MTHFR-Mutationen fand und dass dieser

Unterschied nicht mit den regionalen Unterschieden erklärt werden kann. Eine niedrigere Prävalenz unter Patienten mit IPAH und HPAH scheint möglich.

5.1.2 Faktor-V-Leiden

Für die FVL-Mutation besteht innerhalb Europas eine zunehmende Inzidenz Richtung Süden, außerdem findet sich ein Anstieg von Westen nach Osten. (LUCOTTE, MERCIER, 2001)

In Deutschland muss daher von einer leicht höheren Allelfrequenz ausgegangen werden als in den Niederlanden.

Dies findet sich so auch in größeren Studien mit Vergleichsgruppen, in Deutschland liegt die Prävalenz bei etwa 7%, in den Niederlanden dagegen bei etwa 3% (siehe Tabelle 61). (LUCOTTE, MERCIER, 2001; ROSENDAAL et al., 1995; SCHRÖDER et al., 1996)

Die FVL-Mutation findet sich in der vorliegenden Arbeit unter den CTEPH-Patienten häufiger als unter Patienten mit einer PAH. Unter den CTEPH-Patienten wiesen 10,53% eine heterozygote und 0,44% eine homozygote FVL-Mutation vor. Unter den PAH-Patienten fanden sich nur 3,95% heterozygote Mutationsträger, homozygoten Mutationen lagen nicht vor. Der Unterschied erwies sich als signifikant ($p=0,024$).

Hierbei können die lokalen Unterschiede nicht ganz vernachlässigt werden, da in Deutschland eine höhere Prävalenz für die FVL-Mutation vorliegt und die CTEPH-Patienten ausschließlich aus Homburg stammen, während etwa 53% der Patienten mit PAH in Amsterdam angebunden sind. Es ergibt sich daher die Frage, ob der niedrigere Anteil der FVL-Mutation unter PAH-Patienten durch die Herkunft der Proben zu erklären ist. Hierzu ist es sinnvoll, die PAH-Patienten isoliert zu betrachten. Unter den PAH-Patienten aus Homburg finden sich deutlich mehr Mutationsträger der FVL-Mutation als unter den Proben aus Amsterdam (8,45% vs. 0,00%). Die Häufigkeit der Mutation unter den PAH-Patienten aus Deutschland ist vergleichbar mit dem Wert in der Literatur. Der Anteil der Mutationsträger unter den CTEPH-Patienten liegt dagegen mit 10,53% heterozygoten und 0,44% homozygoten etwas über dem Wert, der sich in der Literatur findet.

Entsprechend der MTHFR C677T-Mutation stellt sich auch für die FVL-Mutation die Frage, ob der höhere Anteil an HPAH-Patienten die niedrige Prävalenz unter den Proben aus Amsterdam bedingt. Es fanden sich allerdings sowohl unter HPAH- als auch unter IPAH-Patienten keine Mutationsträger.

Der hohe Anteil der Mutationsträger unter den CTEPH-Patienten gegenüber den PAH-Patienten ist sicherlich teilweise der unterschiedlichen Herkunft der Proben verschuldet, allerdings zeichnet sich ein Trend ab zu einer leicht höheren Prävalenz unter CTEPH-Patienten.

Tabelle 61: Prävalenz der FVL-Mutation in Deutschland und den Niederlanden

FVL	Literatur	Mutation
	Niederlande N=474 <small>(ROSENDAAL et al., 1995)</small>	Heterozygot=2,95% Homozygot=0
	Deutschland N=814 <small>(LUCOTTE, MERCIER, 2001; SCHRÖDER et al., 1996)</small>	Heterozygot=6,88 Homozygot=0,25

5.1.3 Prothrombin G2010A

Auch für die Prothrombinmutation G2010A besteht ein Nord-Süd-Gradient. Rosendaal et al. konnte zeigen, dass in Ländern nördlich des 50° Breitengrades (Leiden, Amsterdam, Sheffield, Malmö) eine etwas niedrigere Prävalenz vorliegt (<2%) als in südlicheren Zentren (Paris, Wien, Tel Aviv) mit einer Prävalenz um 3%, die auch der Prävalenz in Deutschland entspricht. (ROSENDAAL et al., 1998)

Auch für Prothrombin G2010A kann man diskutieren, ob die Herkunft der Patienten die Unterschiede zwischen PAH und CTEPH beeinflusst hat. Unter den CTEPH-Patienten fanden sich allerdings mit 8,3% heterozygoten Mutationsträgern nicht nur signifikant mehr Mutationsträger als unter den Patienten mit einer PAH (2,63%; p=0,027), sondern auch deutlich mehr, als in Deutschland eigentlich zu erwarten wären (2-3%). (REUNER et al., 1998)

Die Daten legen daher nahe, dass die Prothrombinmutation G2010A einen Risikofaktor zur Entwicklung einer CTEPH darstellt. Ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer PAH scheint dagegen für Mutationsträger nicht zu bestehen.

Tabelle 62: Prävalenz von Prothrombin G2010A in Deutschland und den Niederlanden

Prothrombin G2010A	Literatur	Mutation
	Deutschland N=354 (REUNER et al., 1998)	Heterozygot=2,26 %
	Niederlande N=646 (DOGGEN et al., 1998)	Heterozygot=1,2 %

5.1.4 PAI 4G/5G

Für den PAI 4G/5G-Polymorphismus scheinen keine lokalen Unterschiede zwischen den Niederlanden und Deutschland vorzuliegen. Zwei große Fall-Kontroll-Studien aus Deutschland und den Niederlanden zeigen die gleiche Allelhäufigkeit unter gesunden Probanden in beiden Ländern. In diesen Studien fanden sich jeweils 29% homozygote Mutationsträger und 50% heterozygote Träger (siehe Tabelle 63).

Tabelle 63: Prävalenz von PAI 4G/5G in Deutschland und den Niederlanden

	Literatur	Mutation
PAI 4G/5G	Niederlande N=294 (DOGGEN et al., 1999)	5G/5G=21,8% 5G/4G=49,7% 4G/4G=28,6%
	Deutschland N=951 (NOWAK-GOTTL et al., 2001)	5G/5G=21,4% 5G/4G=49,7% 4G/4G=28,9%

Die Unterschiede zwischen PAH und CTEPH in der vorliegenden Arbeit zeigten sich nicht signifikant. Außerdem entspricht die Verteilung für beide Gruppen in etwa der Verteilung, die sich in der Literatur findet.

Beim Vergleich der Mutationen zwischen den Zentren fand sich die homozygote PAI 4G/5G-Mutation etwas häufiger unter den PAH-Patienten aus Amsterdam als unter den Proben aus Homburg (29% vs. 19%; $p=0.069$). Dies deutet einen statistischen Trend an. Da auch für die PAI 4G/5G-Mutation keine regionalen Unterschiede zu erwarten sind, könnte der Effekt, wie

bereits für die MTHFR C677T-Mutation diskutiert, auf die Gruppenzusammensetzung zurückzuführen sein. Allerdings entspricht der Anteil unter den Proben aus Amsterdam dem erwarteten Wert, sodass sich eher die Frage ergibt, warum der Anteil unter den Patienten aus Homburg geringer ist.

PAI-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Fibrosierung vieler Organe, in dem es die fibrinolytische Aktivität von Serinproteasen hemmt. (GHOSH, VAUGHAN, 2012) Da die Proben aus Homburg einen größeren Anteil an assoziierten Formen der PAH vorweisen, hierunter auch einige mit Kollagenose, ist eine potentielle Assoziation mit dem Wildtyp schwer zu erklären. Die Gruppe der PAH-Patienten aus Homburg ist insgesamt sehr heterogen, sodass ein möglicher Effekt der Subgruppenzugehörigkeit schwer abzuleiten ist. Möglicherweise könnte eine größere Patientenzahl der einzelnen Subgruppen in einer weiteren Studie diese Frage klären. Allerdings scheint es insgesamt fraglich, ob aufgrund der vorliegenden Daten eine Assoziation zwischen Wildtyp und PAH-Patienten mit Ausnahme der IPAH/HPAH-Patienten angenommen werden kann.

5.2 Unterschiede der Mutationen zwischen PAH und CTEPH

5.2.1 MTHFR A1298C, C677T und Compound-Heterozygotie

Die MTHFR C677T- und A1298C-Mutationen gelten als gesicherte Risikofaktoren atherosklerotischer Erkrankungen, der Zusammenhang mit Thrombembolien wird allerdings aktuell noch diskutiert.

Die aktuelle Leitlinie der AWMF zur „Diagnostik und Therapie der Venenthrombose und der Lungenembolie“ lehnt im Rahmen eines routinemäßigen Thrombophiliescreenings sogar ausdrücklich von einer genetischen Diagnostik auf das Vorliegen der beiden MTHFR-Mutationen ab. (GERLACH et al., 2015)

Diese Empfehlung beruht darauf, dass ein klinischer Nutzen des Befundes aktuell nicht sicher erbracht ist. Die homozygoten MTHFR C677T- und A1298C-Mutationen führen zu einem erhöhten Homocysteinspiegel und dieser ist auch mit einem erhöhten Risiko arterieller Embolien und möglicherweise auch venöser Thrombembolien verbunden. Der tatsächliche Homocysteinspiegel wird aber neben der Genetik von vielen weiteren Aspekten wie Ernährung, Bewegung und Komorbiditäten beeinflusst, sodass die Genetik nur bedingt Aufschluss über das tatsächliche Risiko gibt. (MA et al., 1996)

Ob Mutationen des MTHFR-Gens das Risiko für Thrombembolien erhöhen, wurde in diversen Studien mit teilweise konträrem Ergebnis untersucht. Eine niederländische Studie mit 4375 Patienten mit stattgehabter tiefer Beinvenenthrombose oder Lungenembolie und 4865 Kontrollen zeigte kein erhöhtes Risiko für Mutationsträger der MTHFR C677T-Mutation. (BEZEMER et al., 2007)

Eine weitere Studie untersuchte neben der Korrelation der MTHFR C677T-Mutation auch den Zusammenhang erhöhter Homocysteinspiegel mit tiefen Beinvenenthrombosen und konnte nur bei Männern ein leicht erhöhtes Risiko aufzeigen, während bei Frauen keine Korrelation zwischen erhöhten Homocysteinspiegeln und tiefen Beinvenenthrombosen gezeigt werden konnte. Das alleinige Vorliegen der MTHFR C677T-Mutation war in dieser Studie kein Risikofaktor für Thrombosen. (NAESS et al., 2008)

Eine große, insgesamt 99 weltweit durchgeführte Studien umfassende Metaanalyse von Zeng et al., konnte dagegen eine klare Korrelation zwischen der homozygoten MTHFR C677T-Mutation und TVT sowie Lungenembolie aufzeigen. Für die homozygote MTHFR A1298C-Mutation ergab sich ebenfalls ein gesteigertes Risiko für Lungenembolien (MTHFR C677T-Wildtyp: OR=0,83 vs. MTHFR A1298C-Wildtyp: OR=0,55). (ZENG, ZENG, 2019)

Zusammenfassend scheinen die beiden MTHFR-Mutationen einen milden Risikofaktor für Thrombembolien darzustellen, allerdings kann das Risiko durch sekundäre Faktoren, die den Homocysteinspiegel senken, reduziert werden, was die teilweise widersprüchlichen Studienergebnisse erklären könnte.

Ein Zusammenhang zwischen hohen Homocysteinspiegeln und PH ist durchaus möglich, da Homocystein in einige pathophysiologische Mechanismen eingreift, die bei der Entstehung einer PH bereits nachgewiesen wurden.

So gibt es einige in-vitro-Untersuchungen, die zeigen, dass erhöhte Homocysteinspiegel eine Endotheldysfunktion, eine gesteigerte Aktivität der Gerinnungskaskade und eine Zellproliferation der glatten Muskelzellen des Endothels bewirken. (LENTZ, 1998; LENTZ et al., 1996; TSAI et al., 1994)

Hohe Homocysteinspiegel führen außerdem zur Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, die unter anderem mit endotheliale NO reagieren und die so vermittelte Gefäßdilatation hemmen. (UPCHURCH et al., 1997)

Der Zusammenhang zwischen PH und Homocystein wurde daher in der Literatur bereits untersucht, mit ebenfalls widersprüchlichen Ergebnissen.

Eine Arbeit aus Mailand aus dem Jahr 1996 untersuchte den Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und PAH und fand unter PAH-Patienten ähnliche

Plasmahomocysteinspiegel verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe. (ZIGHETTI et al., 1997)

Arroliga et al. untersuchte ebenfalls die Homocysteinspiegel von PAH-Patienten und fand hingegen deutlich höhere Plasmaspiegel. Insgesamt 44,4% der Patienten mit einer PAH hatten in dieser Arbeit erhöhte Plasmahomocysteinspiegel und nur 8,3% der gesunden Kontrollen. (ARROLIGA et al., 2003)

In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein Hinweis darauf, dass die MTHFR C677T- und A1298C-Mutation Einfluss auf die Ausbildung einer PAH oder einer CTEPH haben. Die Verteilung der Mutationen der beiden Gruppen untereinander unterschieden sich nicht. Die Häufigkeit unter der Gruppe der PAH-Patienten und der CTEPH-Patienten entsprach außerdem den Werten der Literatur für eine gesunde Kontrollgruppe (siehe Abb. 36). Eine Ausnahme hierzu stellten die Patienten aus Amsterdam dar, die einen niedrigen Anteil der MTHFR C677T und A1298C-Mutationen vorweisen, was bereits in Kapitel 5.1.1 diskutiert wurde. Die vorliegende Studie betrachtet allerdings ausschließlich die Genetik. Es bleibt daher die Frage offen, ob eine Korrelation mit den Homocysteinspiegeln im Blut besteht.

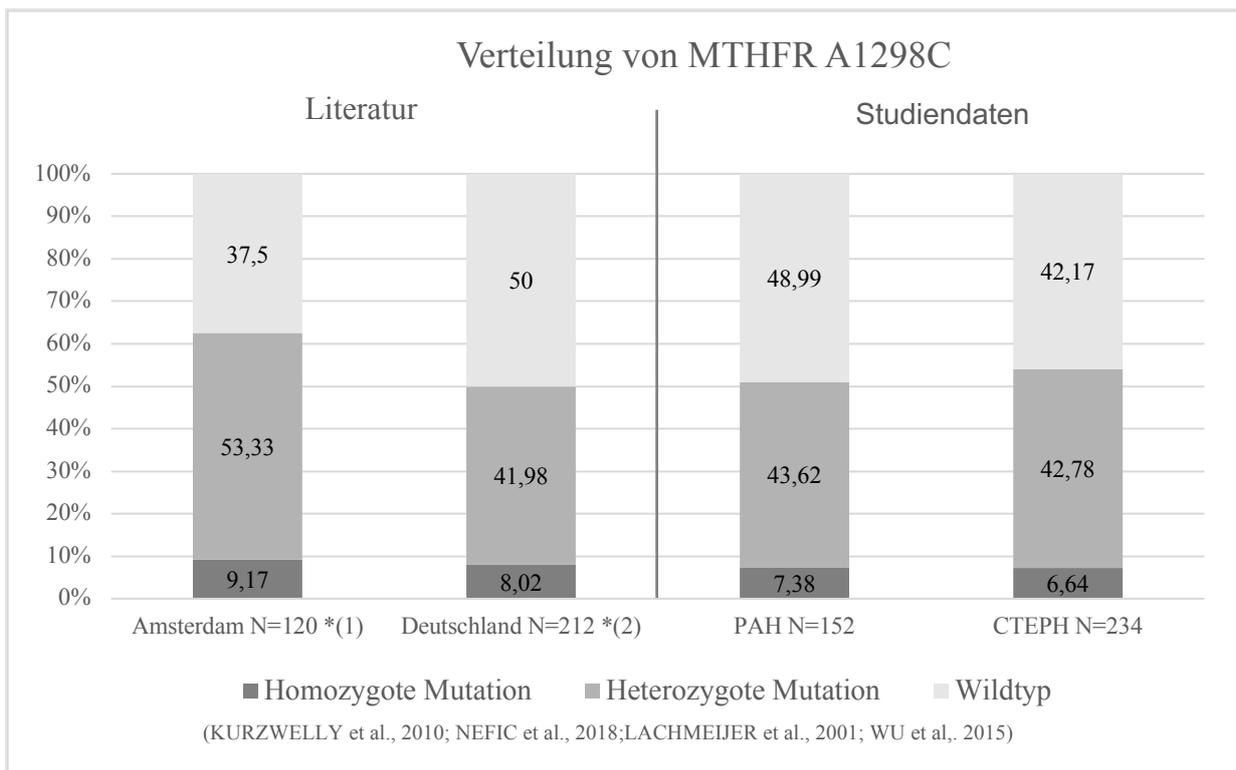
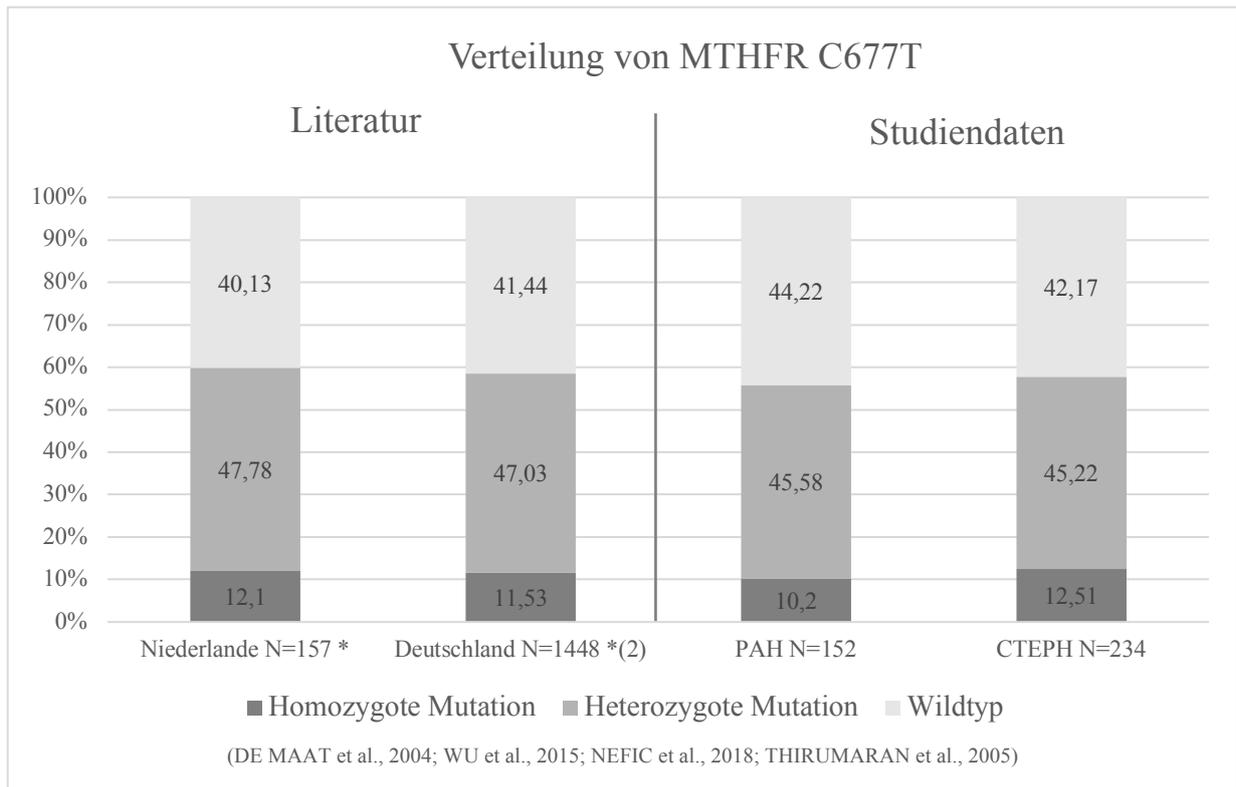


Abbildung 36: Vergleich der Verteilung von MTHFR A1298C und MTHFR C677T zwischen gesunden Referenzgruppen in Amsterdam und Deutschland sowie den CTEPH- und PAH-Patienten unserer Studie

Unter den insgesamt 152 Patienten mit einer PAH und den 234 Patienten mit einer CTEPH lagen 23% Compound-Mutationen vor, ein Unterschied zwischen den Gruppen ergab sich nicht.

Thirumaran et al. untersuchte die Häufigkeit der Mutation unter Kindern mit akuter Leukämie. Die Kontrollgruppe der Arbeit umfasst 1472 gesunde deutsche Probanden. Für die Compound-Heterozygotie fand sich in dieser Arbeit ebenfalls eine Prävalenz von 23% (siehe Abb. 37). (THIRUMARAN et al., 2005)

Fasst man diese Daten mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie zusammen, ergibt sich kein Zusammenhang der Compound-Heterozygotie mit PAH oder CTEPH.

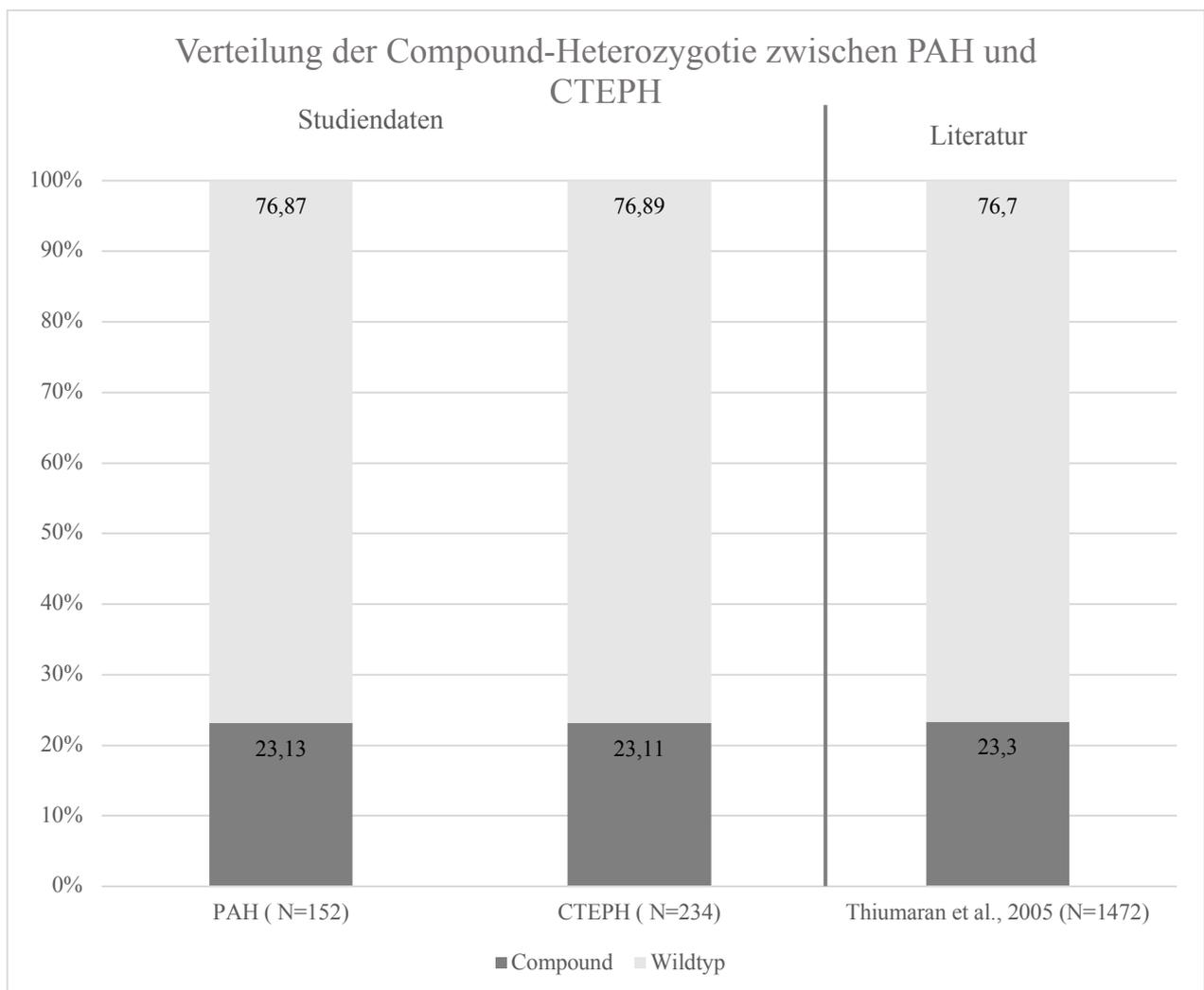


Abbildung 37: Verteilung der Compound-Heterozygotie zwischen PAH und CTEPH

Zusammenfassend entspricht die Häufigkeit der MTHFR C677T- und A1298C-Mutation sowie der Compound-Heterozygotie unter PAH- und CTEPH-Patienten, die wir in dieser Arbeit gefunden haben, den Vergleichswerten der Literatur. Unterschiede zwischen PAH und CTEPH

fanden sich ebenfalls nicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die MTHFR C677T- und A1298C-Mutation keinen Einfluss auf die Entwicklung einer PAH oder CTEPH haben.

Eine Besonderheit ergab sich unter den Patienten aus Amsterdam, hier fanden sich weniger homozygote Mutationsträger der beiden Mutationen, was auf ein geringeres Vorliegen unter IPAH und HPAH hinweisen könnte.

5.2.2 Faktor-V-Leiden

Die FVL-Mutation ist die häufigste Ursache für hereditäre Thrombembolien und findet sich unter Patienten mit einem thrombembolischen Ereignis in der Anamnese mit einer Prävalenz von bis zu 20%. (DAHLBACK, 1995)

Eine der wenigen Gerinnungsanomalien, für die ein klarer Zusammenhang mit CTEPH nachgewiesen werden konnte, ist ein erhöhter Faktor-VIII-Plasmaspiegel.

Faktor VIII, der ebenso wie FV die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin bewirkt, ist bei etwa 40% der CTEPH-Patienten erhöht. (BONDERMAN et al., 2003) Diese Tatsache könnte entweder darauf hindeuten, dass Faktor VIII einen Risikofaktor zur Entwicklung einer CTEPH oder eine Folgeerscheinung der Erkrankung darstellt. Eine Pathologie der Lungengefäße könnte eine endotheliale Aktivierung zur Folge haben, welche zu einer Hochregulierung von Faktor VIII an der Endotheloberfläche führt. Inwieweit dies für die weitere Entwicklung der CTEPH eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um genetische Prädispositionen handelt, wurde Faktor VIII in den vorliegenden Analysen nicht betrachtet. Die Tatsache, dass der Gerinnungsfaktor VIII eine ähnliche Wirkung in der Gerinnungskaskade hat wie FV, macht einen pathophysiologischen Zusammenhang der FVL-Mutation mit CTEPH aber denkbar.

In der vorliegenden Arbeit fand sich unter den Patienten mit einer CTEPH ein signifikant höherer Anteil an heterozygoten Mutationsträgern für FVL gegenüber den Patienten mit einer PAH (CTEPH=10,53% vs. PAH=3,95%; $p=0,046$).

Während sich die Gruppe der CTEPH-Patienten ausschließlich aus Patienten zusammensetzt, die am UKS angebunden sind, stammt etwas mehr als die Hälfte der Patienten mit einer PAH (81 von 152) aus Amsterdam, sodass ein Einfluss der Herkunft der Proben auf die Mutationshäufigkeit angenommen werden muss. Vergleicht man die 3 Gruppen miteinander, findet sich unter beiden Studiengruppen aus Homburg ein deutlich höherer Anteil an FVL-Mutationen als unter den Proben aus Amsterdam. Hierbei muss bedacht werden, dass es sich unter den Patienten aus Amsterdam ausschließlich um PAH-Patienten handelt, während in den

beiden anderen Gruppen ein hoher Anteil an CTEPH-Patienten vorliegt (N=20 von insgesamt 56 Patienten bei den gesammelten Proben und N=214 von 249 bei der Routinediagnostik).

Für FVL finden sich in der Literatur für Deutschland höhere Referenzwerte als für die Niederlande (siehe Kap. 5.1.2), sodass die unterschiedliche Herkunft der Patienten eine etwas höhere Mutationsrate unter den CTEPH-Patienten erklärt. Der beobachtete Effekt scheint hierfür jedoch zu stark. Bei isolierter Betrachtung der Patienten mit einer PAH aus der Homburger Ambulanz findet sich eine deutlich geringere Prävalenz für FVL (2,78%).

Wäre der Unterschied zwischen den PAH- und CTEPH-Patienten allein durch die Herkunft zu erklären, müsste der Anteil an Mutationen unter diesen Patienten ebenfalls höher sein. Anzumerken bleibt allerdings, dass es sich bei isolierter Betrachtung der Homburger PAH-Patienten um eine kleine Stichprobenzahl handelt (N=36).

Unter den Proben aus Amsterdam (N=81) fanden sich keine Mutationsträger für die FVL-Mutation.

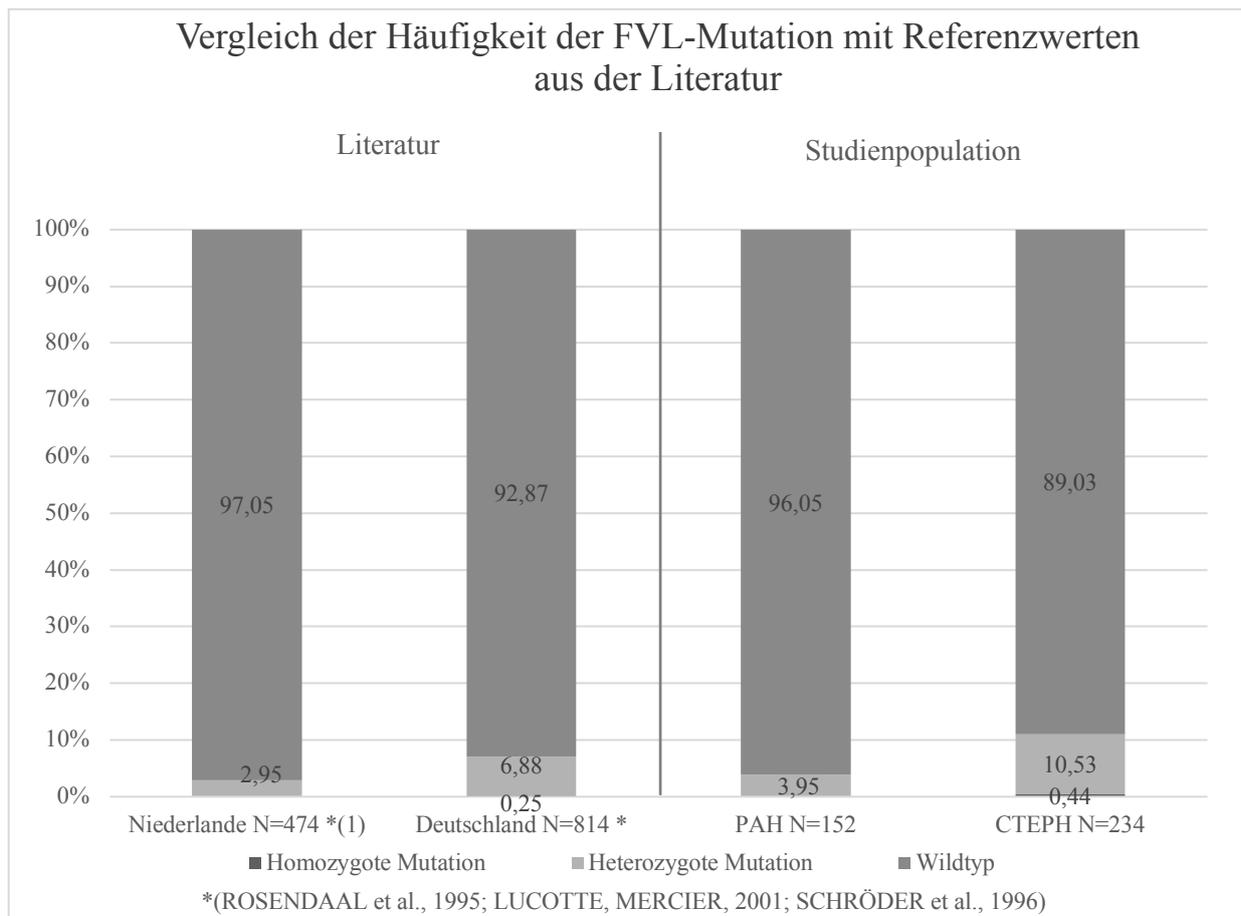


Abbildung 38: Vergleich der Verteilung der FVL-Mutation zwischen gesunden Referenzgruppen in den Niederlanden und Deutschland sowie den CTEPH- und PAH-Patienten dieser Studie

Interessant ist daher auch der Vergleich der CTEPH-Patienten mit dem erwarteten Wert in Deutschland.

Der Anteil an FVL-Mutationsträgern unter unseren CTEPH-Patienten lag mit 10,53% höher als in der Literatur angegeben (6,88%). Vergleicht man die Ergebnisse der CTEPH-Patienten dieser Arbeit mittels χ^2 -Test mit den Ergebnissen von Schröder et. al., ergibt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,0785$), aber ein leichter Trend. (SCHRÖDER et al., 1996)

Die beobachteten 10,53% unter CTEPH-Patienten liegen deutlich unter dem Wert, den man für eine Patientengruppe mit thrombembolischen Ereignissen in der Anamnese eigentlich erwarten würde, wenn man Thrombosen und Lungenembolien zusammenfasst. Studien, die die Prävalenz unter Patienten mit Thrombembolieanamnese untersuchen, zeigen einen Anteil von über 20% Mutationsträgern. (IVANOV et al., 2008)

Ein kleiner Teil der Patienten mit einer PAH (N=35) erhielt ein Thrombophiliescreening im Rahmen einer Routinediagnostik.

Der Anteil an FVL-Mutationsträgern war unter diesen Patienten mit 14,29% heterozygoten Mutationsträgern deutlich höher als unter den übrigen Studienpatienten mit einer PAH.

Dieser große Unterschied ist mit regionalen genetischen Unterschieden ebenfalls eher nicht zu erklären, zumal sonst auch unter den PAH-Patienten aus Homburg, die nicht routinemäßig ein Thrombophiliescreening erhalten haben, eine höhere Prävalenz vorliegen müsste. Möglicherweise erhielten unter den Routinepatienten mit PAH unbeabsichtigt bevorzugt solche mit Thrombembolien in der Anamnese ein Thrombophiliescreening, z. B. weil bei diesen Patienten initial an eine CTEPH gedacht wurde. Es bleibt zudem zu bedenken, dass es sich auch hierbei um eine kleine Stichprobe handelt (N=35).

Zusammenfassend deutet der Unterschied zwischen den PAH-Patienten und den Patienten mit einer CTEPH darauf hin, dass die Prävalenz der FVL-Mutation unter CTEPH-Patienten etwas höher ist und die Mutation möglicherweise einen milden Risikofaktor der CTEPH darstellt.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte auch die Studie von Suntharalingam et al., die die Prävalenz verschiedener mit Thrombophilie assoziierter Polymorphismen an 214 CTEPH-Patienten und 200 Kontrollen untersuchte. Hier zeigten sich deutlich mehr Patienten mit einer FVL-Mutation als unter den Kontrollen, auch wenn der Unterschied nicht ganz das 95%-Konfidenzintervall erreichte ($p=0,051$). Die PAI-1 4G/5G-Mutation und die Prothrombinmutationen wurden in dieser Studie ebenfalls untersucht. Hier konnte keine höhere Prävalenz aufgezeigt werden. (SUNTHARALINGAM et al., 2008)

Zwei sehr häufig zitierte Studien zu der Frage, ob die FVL-Mutation mit einer höheren Prävalenz einer CTEPH einhergeht, sind die Studien von Wolf et al. und Wong et al..

Die erste Arbeit eines französischen Referenzzentrums für PH untersuchte 64 Patienten mit einer PAH, 46 Patienten mit einer CTEPH und 100 Kontrollen auf die FVL-Mutation. Der Anteil der FVL-Mutation war mit 6,5% unter den CTEPH-Patienten höher als unter den PAH Patienten (1,5%) und den Kontrollen (3%), erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. (WOLF et al., 2000)

Die zweite Arbeit aus England untersuchte 245 Patienten, davon 45 mit einer CTEPH und 200 mit anderen Formen der PH, auf das Vorliegen hereditärer Risikofaktoren von Thrombosen. Insgesamt 160 der Patienten wurden auf die FVL-Mutation untersucht, hierunter 31 mit CTEPH und 129 mit anderen Formen der PH. Es fanden sich 29% heterozygote Mutationsträger unter den CTEPH-Patienten und nur 7,8% Mutationsträger unter den Nicht-CTEPH-Patienten. (WONG et al., 2010) Die Letzte Studie umfasst allerdings eine sehr kleine Fallzahl an Patienten mit einer CTEPH.

Fasst man die genannten Studien zusammen, deuten alle auf eine leicht erhöhte Prävalenz der FVL-Mutation unter CTEPH-Patienten hin. Mit Ausnahme der letztgenannten Arbeit, die eine kleine Stichprobe umfasst, ergab sich zwar kein signifikanter Unterschied, allerdings zumindest ein statistischer Trend. Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Unter CTEPH-Patienten fanden sich signifikant mehr Mutationsträger der FVL-Mutation gegenüber PAH-Patienten. Der Vergleich mit einer gesunden Kohorte aus der Literatur erreichte nicht ganz das Signifikanzniveau, zeigt aber ebenfalls einen statistischen Trend zu etwas mehr Mutationsträgern unter CTEPH-Patienten. Insgesamt scheint für die FVL-Mutation trotz der eindeutigen Korrelation mit Thrombembolien nur ein leicht erhöhtes Risiko zur Ausbildung einer CTEPH für Mutationsträger zu bestehen.

5.2.3 Das Faktor-V-Leiden-Paradox

Auf den ersten Blick scheint es verwunderlich, dass die FVL-Mutation keine höhere Prävalenz unter CTEPH-Patienten aufweist, obwohl sich die Mutation bei bis zu 20% der Patienten nach Thrombembolien nachweisen lässt. Diese Arbeit konnte eine Prävalenz von 10,53% nachweisen, andere Autoren geben niedrigere Prävalenzen unter Patienten mit CTEPH an (6,5%-7,3%). (SUNTHARALINGAM et al., 2008; WOLF et al., 2000)

Die tiefe Beinvenenthrombose und Lungenembolie werden häufig als eine gemeinsame Krankheitsentität betrachtet, da sich die Risikofaktoren überschneiden und eine tiefe Beinvenenthrombose in eine Lungenembolie übergehen kann. (LIJFERING et al., 2010)

Die FVL-Mutation scheint aber nicht für beide Entitäten ein äquivalentes Risiko darzustellen. Seit der Entdeckung der FVL-Mutation in den 1990er Jahren (DAHLBÄCK et al., 1993) konnten mehrere Studien zeigen, dass die Mutation zwar mit einem deutlich höheren Risiko für Thrombosen der tiefen Beinvenen einhergeht, Mutationsträger aber seltener sekundär eine Lungenembolie entwickeln. (BOUNAMEAUX, 2000)

Untersucht man des Weiteren Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose, so findet sich bei 17% die FVL-Mutation. Patienten mit isolierter Lungenembolie weisen eine Prävalenz von 9% auf und Patienten, die eine tiefe Beinvenenthrombose mit konsekutiver Lungenembolie erleiden, zeigen eine mittlere Prävalenz von 13%. (MANTEN et al., 1996)

Das Risiko, eine Lungenembolie zu entwickeln, ist für Mutationsträger also insgesamt erhöht, aber Mutationsträger neigen eher zu einer primären tiefen Beinvenenthrombose mit sekundärer Embolisierung als zu einer isolierten Lungenembolie.

Das Risiko, im Rahmen einer tiefen Beinvenenthrombose eine Lungenembolie zu entwickeln, scheint außerdem bei Vorliegen der FVL-Mutation etwas geringer. Anscheinend erfolgt eine Embolisierung hier seltener als es bei Nicht-Mutationsträgern der Fall ist. (HOOPER, DE STAERCKE, 2002; IVANOV et al., 2008)

Dieses Phänomen gilt als FVL-Paradox und mehrere Erklärungsmodelle wurden hierfür postuliert. So wird eine höhere Letalität unter Mutationsträgern bei Patienten mit einer fulminanten Lungenembolie diskutiert. Hiergegen spricht, dass sich in Autopsiestudien kein größerer Anteil an Mutationsträgern findet als unter Überlebenden nach Lungenembolie. (KUISMANEN et al., 1999) Auch die Lokalisation der Thrombose könnte einen Einfluss auf das Risiko einer Lungenembolie haben. Björgell et al. konnte mittels Phlebographie zeigen, dass FVL-Mutationsträger vermehrt distale Thrombosen entwickeln und die Inzidenz Iliofemoraler Thrombosen, die wiederum häufiger mit einer Lungenembolie assoziiert sind, geringer ist. (BJÖRGELL et al., 2000)

Auch der Einfluss der FVL-Mutation auf die Stabilität des Thrombus ist eine mögliche Erklärung. Die Mutation sorgt für einen stabileren Thrombus, der seltener embolisiert. Dieser Effekt konnte am Mausmodell gezeigt werden. Hier wurde bei Mäusen mit der FVL-Mutation und Wildtypmäusen eine Thrombose ausgelöst und beobachtet, ob es zu einer Embolisierung kommt. Hierbei zeigte sich, dass die FVL-Mäuse größere Thromben entwickeln, die aber

seltener embolisieren. Hierbei war sowohl die Anzahl der Embolien als auch die Größe der Embolisation kleiner als unter den Wildtypmäusen. (SHAYA et al., 2019)

Pathophysiologisch ergibt diese Beobachtung durchaus Sinn, denn die Mutation bewirkt eine Resistenz gegen das profibrinolytisch wirkende Protein C, hierdurch kommt es zu einer vermehrten Fibrinbildung, die zu einem stabileren Thrombus führt. (BAJZAR et al., 1996)

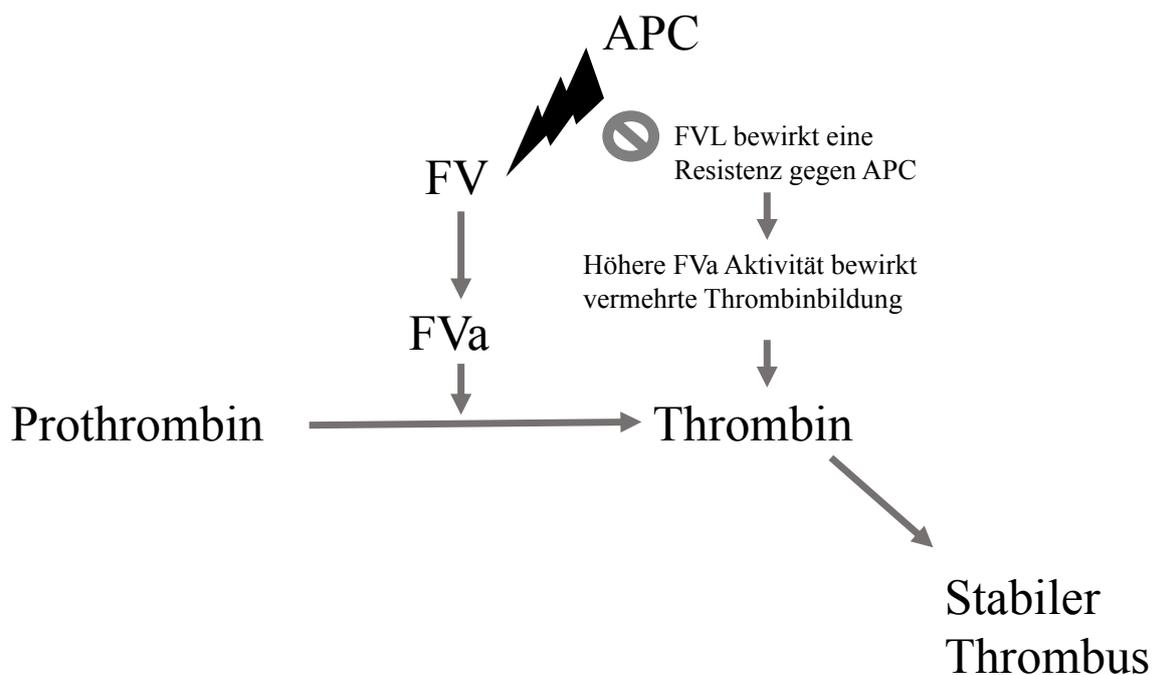


Abbildung 39: Einfluss der Resistenz gegen APC auf die Stabilisierung des Thrombus

Diese thrombusstabilisierende Wirkung könnte bei einigen Erkrankungen sogar einen protektiven Effekt zeigen. So konnte bei ARDS-Patienten ein verbessertes 30-Tage-Überleben unter heterozygoten Mutationsträgern gezeigt werden. (ADAMZIK et al., 2008)

Neben dem inhibierten profibrinolytischen Effekt des Protein C wird als mögliche Erklärung die Auswirkung des APCs auf proinflammatorische Akute-Phase-Proteine wie Interleukin 1 und 6 oder TNF-alpha diskutiert. Auch eine gehemmte Migration von Monozyten ins Endothel könnte zu einer verminderten Entzündungsreaktion führen. (ESMON, ESMONN, 1988)

Diese Befunde zeigen, dass sich die FVL-Mutation auch protektiv bei der Genese einiger Erkrankungen auswirkt und auch Mechanismen denkbar wären, die die Pathogenese der PAH oder CTEPH positiv beeinflussen.

Sowohl für FVL als auch für Prothrombin konnte gezeigt werden, dass die Mutationen nicht mit der Schwere der Lungenembolie korrelieren. (OGUZULGEN et al., 2002)

Prothrombin G2010A findet sich unter Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose und einer primären Lungenembolie mit einer ähnlichen Prävalenz, hier scheint also kein Einfluss auf die Lokalisation oder die Stabilität des Thrombus zu bestehen. (DE MOERLOOSE et al., 2000)

Die doppelt heterozygoten Mutationsträger für Prothrombin und FVL haben ein deutlich erhöhtes Thrombembolierisiko. Ob sich aber auch hier ein Unterschied zwischen isolierter Lungenembolie und Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose zeigt, ist nicht ganz sicher. (COEN et al., 2001)

Zusammenfassend bewirkt das Vorliegen der FVL-Mutation das Ausbilden stabilerer Thromben, die sich bevorzugt als periphere Thrombose zeigen und insgesamt seltener embolisieren. Das könnte für die Entstehung einer CTEPH bedeuten, dass es im Rahmen einer Lungenembolie zu stabileren Thromben kommt, die schlechter durch die körpereigene Fibrinolyse beeinflusst werden. Letztlich könnte das geringere Risiko für Lungenembolien gegenüber tiefen Beinvenenthrombosen jedoch auch die vergleichsweise geringe Assoziation der FVL-Mutation mit CTEPH erklären.

Die Tatsache, dass FVL einen deutlich höheren Einfluss auf das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose hat als auf die Entstehung einer Lungenembolie, muss in die Bewertung der Prävalenz der Mutation unter CTEPH-Patienten einfließen. Vergleicht man die Prävalenz mit der Prävalenz unter Patienten nach stattgehabter Thrombembolie (Lungenembolie und Beinvenenthrombose zusammengefasst), so ist die Prävalenz unter CTEPH-Patienten deutlich niedriger, wie vorangegangene Studien bereits zeigen konnten. (WOLF et al., 2000)

Eine Prävalenz von 9% Mutationsträgern, wie sie von Mantén et al. unter Patienten mit einer isolierten Lungenembolie gefunden wurde, entspricht allerdings etwa dem Anteil an Mutationsträgern, die wir in unserer Arbeit unter Patienten mit einer CTEPH gefunden haben. (MANTÉN et al., 1996)

Die Bedeutung der Mutation als Risikofaktor der CTEPH scheint aber insgesamt nur gering zu sein. Ein Zusammenhang zur PAH fand sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Auch wenn die Pathogenese der CTEPH noch nicht vollständig verstanden ist, deutet vieles darauf hin, dass vor allem die gestörte Lyse des Thrombus zur Entstehung einer CTEPH beiträgt. Eine Embolisation der Lungenstrombahn führt nicht zwangsläufig zur Entwicklung einer CTEPH, so entwickeln nur etwa 3-4% der Patienten nach Lungenembolie eine CTEPH. (PENGO et al., 2004) Die Embolisation stellt daher möglicherweise nicht den zentralen Pathomechanismus der Erkrankung dar. Nun könnte man an dieser Stelle vermuten, dass vor allem stabilere Thromben resistenter gegen die Lyse sind. Allerdings zeigt die vorliegende Arbeit, dass die FVL-

Mutation, die eine Stabilisierung des Thrombus bewirkt, keinen größeren Effekt auf die Entstehung einer CTEPH hat. Einschränkend muss jedoch der retrospektive Charakter der Analyse berücksichtigt werden.

Interessant ist an dieser Stelle auch die Frage, ob es einen Unterschied in der Pathogenese zwischen einer zentraleren oder einer peripheren Verteilung unter CTEPH-Patienten gibt. So könnte die periphere Form durch eine gestörte Lyse von Mikrothrombosen, die sich zufällig oder durch einen Auslöser bedingt ausbilden, entstehen und nicht durch Embolisation eines größeren Thrombus. Bei Gesunden würden solche kleinere Mikrothrombosen durch die physiologische Thrombolysen einfach aufgelöst werden, bei Patienten mit CTEPH könnte dieser Mechanismus versagen.

Die Ausbildung der zentralen Form könnte dagegen initial dem Pathomechanismus einer Lungenembolie ähneln, wobei auch hier die Thrombolysen versagt. Dass die Häufigkeit der FVL-Mutation unter CTEPH-Patienten in der vorliegenden Arbeit der unter Patienten mit Lungenembolie entspricht, könnte hierfür sprechen.

Das FVL-Paradox zeigt, dass sich für unterschiedliche Lokalisationen von Thrombembolien verschiedene Risikofaktoren ergeben können. Ähnlich könnten sich die Risikofaktoren der CTEPH abhängig vom Muster der Erkrankung unterscheiden. Auch wenn FVL nur einen milden Risikofaktor für eine CTEPH darstellt, sind weitere Studien über die genetische Prädisposition bei CTEPH nötig, da sich möglicherweise andere Risikofaktoren zeigen. Deren Kenntnis könnte ein besseres Verständnis der Pathogenese der CTEPH ermöglichen. Vor allem für die periphere Form, bei der die Therapieoptionen trotz einiger neuer Medikamente schlechter sind als bei der zentralen, könnte die Entdeckung solcher Risikofaktoren auch zu neuen therapeutischen Ansätzen führen.

5.2.4 Prothrombin

Der Anteil an Prothrombinmutationen zeigte sich unter den CTEPH-Patienten signifikant höher als unter den PAH-Patienten (2,63% heterozygote Patienten unter den PAH-Patienten und 8,30% unter den CTEPH-Patienten; $p=0,04$).

Dieser Unterschied ist nicht mit den sehr geringen regionalen Unterschieden der Mutation erklärbar, Abb. 40 vergleicht die Mutationshäufigkeit bei PAH und CTEPH mit der Prävalenz in den Niederlanden und Deutschland.

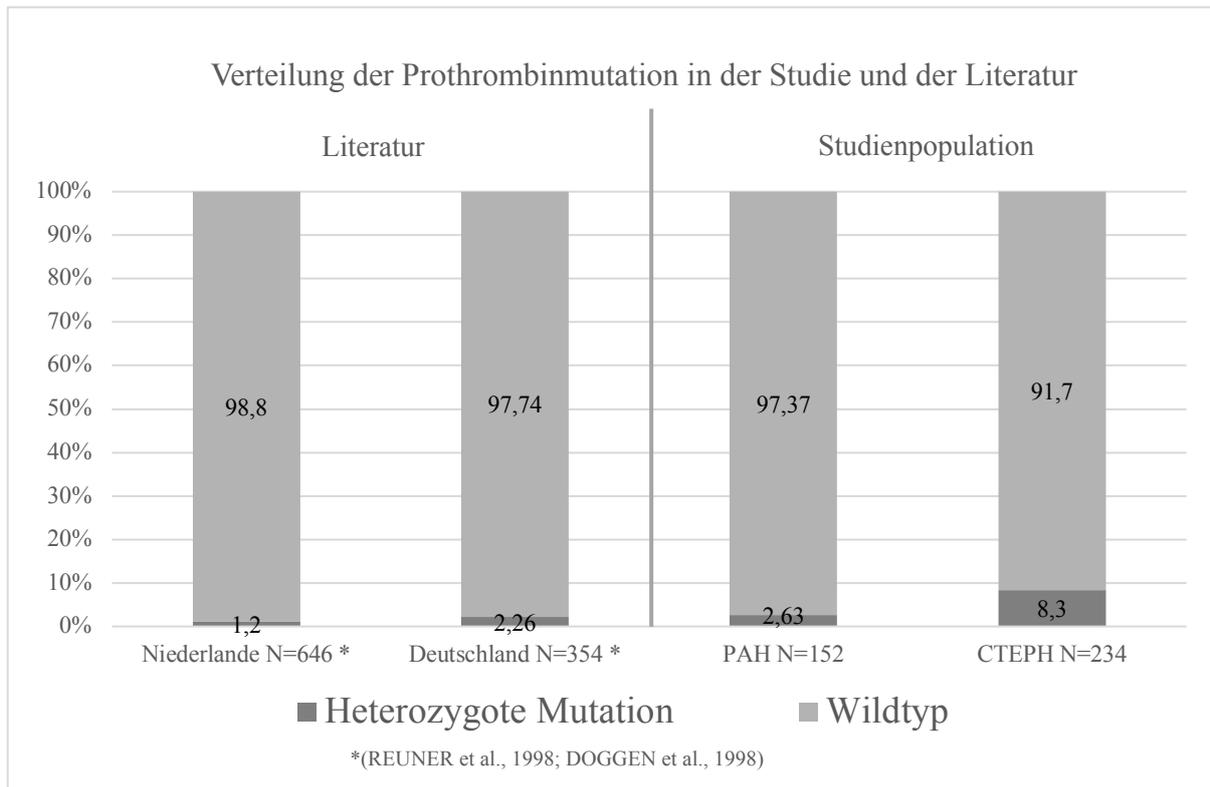


Abbildung 40: Vergleich der Häufigkeit der Prothrombinmutation mit Referenzwerten aus der Literatur

Der Anteil von 8,3% heterozygoten Mutationen unter CTEPH-Patienten lag nicht nur deutlich über dem Anteil an Mutationsträgern unter den PAH-Patienten (2,63%), sondern entspricht in etwa dem Anteil an Mutationsträgern unter Patienten mit einer Thrombose in der Vergangenheit, der bei etwa 7% liegt. (COEN et al., 2001; POORT et al., 1996)

Bei isolierter Betrachtung der PAH-Patienten findet sich für Prothrombin ein ähnlicher Effekt unter den Zentren, wie er für die FVL-Mutation vorliegt. Unter den PAH-Patienten der Homburger Routine liegt ein deutlich höherer Anteil an Mutationsträgern vor als unter den Patienten der Homburger PH-Ambulanz und den Proben aus Amsterdam (8,57% vs. 0% und 1,23%). Auch hier könnte diese Verteilung widerspiegeln, dass unter den stationären Patienten vermehrt diejenigen PAH-Patienten ein Thrombophiliescreening erhalten haben, die eine Thrombose in der Anamnese vorwiesen.

Vergleicht man die Mutationshäufigkeit mit den Ergebnissen der Literatur, zeigt sich, dass unter den CTEPH-Patienten signifikant mehr Träger der Prothrombinmutation vorliegen als in der Kontrollgruppe von Reuner et al. in Deutschland nachgewiesen wurden ($p < 0,001$). (REUNER et al., 1998)

Die Daten deuten daher auf einen klaren Zusammenhang zwischen der Prothrombinmutation und CTEPH hin. Zwischen PAH und der Prothrombinmutation scheint keine Korrelation zu

bestehen. Dieses Ergebnis widerspricht den bisherigen Daten bezüglich Prothrombin unter CTEPH-Patienten.

Die bereits angesprochene Arbeit von Wolf et al. untersuchte ebenfalls die Prothrombinmutation G2010A zwischen PAH-Patienten, CTEPH-Patienten und Kontrollen und fand eine gleiche Verteilung von 1,6%-2,5% zwischen den Gruppen und eine ähnliche Verteilung, wie sie in der gesunden Bevölkerung zu erwarten ist. (WOLF et al., 2000) Suntharalingam et al. untersuchte die Prävalenz der Prothrombinmutation unter 214 CTEPH Patienten und 200 Kontrollen. Hierbei zeigte sich zwar eine leicht höhere Prävalenz unter den CTEPH-Patienten, der Unterschied war allerdings nicht signifikant. (SUNTHARALINGAM et al., 2008) Die vorliegende Arbeit deutet dagegen eindeutig darauf hin, dass Prothrombin G2010A gehäuft bei Patienten mit einer CTEPH vorkommt.

Der Rolle der Mutation bei der Entstehung der CTEPH könnte auf verschiedenen Pathomechanismen beruhen, da Prothrombin innerhalb der Gerinnungskaskade eine zentrale Rolle einnimmt. Es aktiviert die Thrombozyten, Fibroblasten sowie mehrere Gerinnungsfaktoren und initiiert die Fibrinbildung, was die Ausbildung eines stabilen Thrombus bewirkt. Die Vorstellung, dass ein stabilerer Thrombus zu einer erschwerten Thrombolyse und damit Prädisposition einer CTEPH führen könnte, ist naheliegend. (DE RIDDER et al., 2016; LANE et al., 2005)

Allerdings bewirkt auch die FVL-Mutation eine gesteigerte Synthese von Thrombin und hat damit ähnliche Effekte auf die Gerinnungskaskade wie Prothrombin.

Es scheint also naheliegend, dass die beiden Mutationen durch andere Pathomechanismen die Entstehung der CTEPH beeinflussen.

In vielen Studien zur Risikoabschätzung von Thrombembolien zeigte sich die Prothrombinmutation eher als Cofaktor, der bei zusätzlichen Risikofaktoren wie der FVL-Mutation ein vermehrtes Risiko bewirkt. Isolierte Mutationsträger zeigen nur ein sehr geringes Risiko für Thrombembolien. (DE STEFANO et al., 1999; EMMERICH et al., 2001; ZOLLER et al., 1998)

Prothrombin und Thrombin haben neben der zentralen Rolle in der Gerinnungskaskade auch eine Wirkung auf die Zellproliferation und die Endothelfunktion. Für Prothrombin konnte ein apoptotischer Effekt auf Endothelzellen gezeigt werden, der die Endotheldysfunktion als einen der zentralen Pathomechanismen der PH verstärken könnte. (D'AGNILLO et al., 2003)

Dies könnte neben der thrombogenen Wirkung ein Erklärungsmodell sein, warum sich Prothrombin G2010A unter CTEPH häufiger zeigt. Für Thrombin konnte dagegen ein

Apoptose-hemmender Effekt auf Endothelzellen, sowie eine gesteigerte Angiogenese nachgewiesen werden. (CAUNT et al., 2003; ZANIA et al., 2008)

Dies könnte erklären, warum die FVL-Mutation, die zu höheren Thrombinplasmaspiegeln führt, einen geringeren Effekt auf die Pathogenese der CTEPH zu haben scheint als Prothrombin G2010A.

Wenn der Einfluss der Prothrombinmutation G2010A auf die Pathogenese der CTEPH nicht über die Thrombogenese, sondern über die endotheliale Dysfunktion zu erklären ist, wäre es jedoch naheliegend, dass die Mutation in diesem Fall auch mit PAH assoziiert ist. Die Ergebnisse dieser Studie konnten allerdings keinen Zusammenhang zwischen PAH und Prothrombin G2010A aufzeigen.

Im Gegensatz zu FVL hat die Prothrombinmutation G2010A keinen Einfluss auf die Lokalisation der Thromben, Mutationsträger finden sich gleich häufig unter Patienten mit Lungenembolie und Thrombose, dies konnte in einer großen Metaanalyse der Universität Palermo gezeigt werden. Insgesamt wurden in der Arbeit 7062 Patienten nach TVT und 2515 Patienten mit isolierter Lungenembolie untersucht. Der Anteil an Mutationsträgern unter Patienten nach TVT lag nur leicht über dem der Patienten nach Lungenembolie (9,2 vs. 7,4). (DENTALI et al., 2012)

Ob die Lungenembolie und die CTEPH eine ähnliche Pathogenese aufweisen, wird seit langem erforscht und während sich einige etablierte Risikofaktoren unter beiden Patientengruppen finden, trifft das auf andere nicht zu. Die Prävalenz unter den CTEPH-Patienten dieser Studie entspricht der unter Patienten mit Lungenembolie oder TVT von Dentali et. al.. Dies deutet daraufhin, dass die Prothrombinmutation einen Risikofaktor für beide Erkrankungen darstellt und sich die Rolle des Prothrombin bei der Genese beider Erkrankungen möglicherweise ähnelt.

Eine 2020 veröffentlichte Arbeit aus Japan versuchte durch Exom-Sequenzierung zu klären, ob Patienten mit Lungenembolie die gleichen hereditären Risikofaktoren wie Patienten mit CTEPH aufweisen. Bei Betrachtung dieser Arbeit muss berücksichtigt werden, dass sich die Allelfrequenz einiger Gene zu der in Europa signifikant unterscheidet. So kommt die FVL-Mutation in Japan praktisch nicht vor, dafür aber andere, bei uns sehr seltene Polymorphismen des FV-Gens. Eine dieser Subformen, FV c.3980A>G, fand sich unter CTEPH-Patienten mit einer höheren Allelfrequenz als in der Vergleichsgruppe. Wirklich interessant ist hierbei jedoch, dass sich die Mutation vor allem unter Patienten mit stattgehabter Lungenembolie mit einer erhöhten Allelfrequenz fand, während sie unter Patienten ohne anamnestische Embolie deutlich

seltener vorkam und etwa der Prävalenz der Vergleichsgruppe entsprach (Allelfrequenz: 21,7 vs. 7,1 und 6,2). (YAOITA et al., 2020)

Selbige Arbeit fand auch eine höhere Allelfrequenz eines Gens, das für Thrombomodulin codiert. THBD c.1418 C>T zeigte nur unter den Patienten ohne anamnestische Lungenembolie eine erhöhte Allelfrequenz gegenüber der Kontrollgruppe (Allelfrequenz: 50 vs. 27,6).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich CTEPH-Patienten mit Lungenembolie von der Patientengruppe ohne Embolie bezüglich ihrer hereditären Risikofaktoren unterscheiden, was vielleicht sogar auf einen unterschiedlichen Pathomechanismus hinweist.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass Prothrombin G2010A einen Risikofaktor zur Entwicklung einer CTEPH darstellt. Unklar bleibt, ob dies für alle Formen der CTEPH gilt oder das Risiko nur für die Patientengruppe mit anamnestischer Lungenembolie gilt.

5.2.5 PAI 4G/5G

Erhöhte PAI-1-Plasmaspiegel lassen sich bei vielen Erkrankungen nachweisen und sind hier oft funktionell bedingt. Bei der Sepsis konnte sogar ein gewisser prognostischer Aussagewert aufgezeigt werden. (TIPOE et al., 2018) Neben der Rolle als Antifibrinolytikum geht man davon aus, dass PAI-1 auch eine Hemmung auf die Zellproliferation hat. Hochregulation könnte daher als Mechanismus interpretiert werden, um gesteigerter Proliferation entgegen zu wirken. Untersuchungen an Mäusen, bei denen die Genexpression supprimiert wurde, stützen diese These, da die Tiere eine deutlich gesteigerte Intimaproliferation nach Verletzungen aufweisen. (CARMELIET et al., 1997)

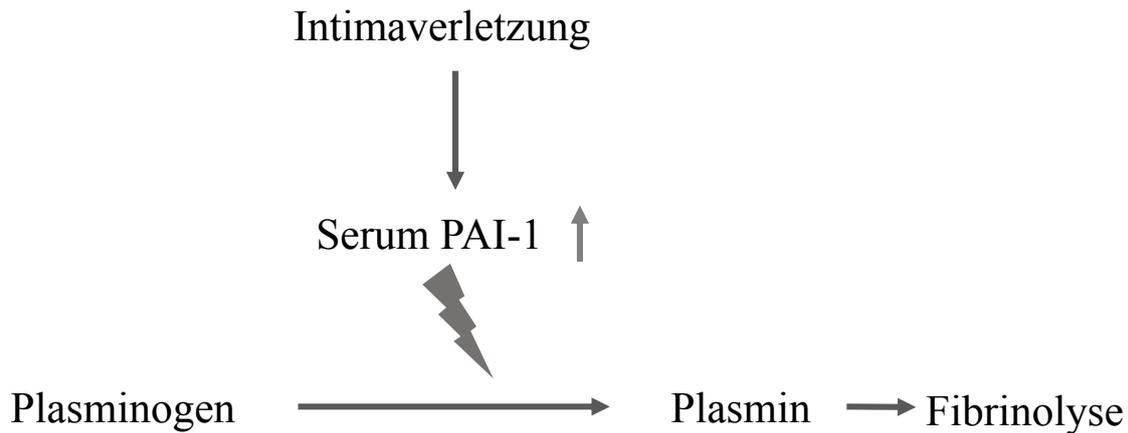


Abbildung 41: Intimaverletzungen und Fibrinolyse

Wie viele andere Erkrankungen auch, weisen Patienten mit einer PH einen hohen Plasmaspiegel an PAI-1 auf. (HUBER et al., 1994) Grundsätzlich kann dieser Befund als Kompensationsmechanismus interpretiert werden, bei dem versucht wird, einer vermehrten Proliferation entgegenzusteuern, oder aber im Rahmen des Pathomechanismus, der zur Entstehung der Erkrankung beiträgt. Patienten mit IPAH haben einen erhöhten transpulmonalen PAI-1-Gradienten, woraus sich die Vermutung ergibt, dass die erhöhten Werte aus einer intrapulmonalen Synthese resultieren. (KATTA et al., 2008; MARTIN et al., 2002)

Interessant ist auch, dass für einen dem PAI 4G/5G ähnlichen Polymorphismus, den HD2-Polymorphismus, eine häufigere Prävalenz der Mutation unter IPAH-Patienten gezeigt werden konnte (46.29% bei IPAH-Patienten, 16% der gesunden Kontrollen).

Der HD2-Polymorphismus führt ebenfalls zu einer gesteigerten Expression von PAI-1 und ist mit erhöhten Plasmaleveln verbunden. (KATTA et al., 2008) Dieser Befund könnte daraufhin deuten, dass PAI-1 eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt und dass genetische Varianten des PAI-1-Gens eine mögliche Prädisposition für die Entstehung einer PAH darstellen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen PAI-1 und der Pathogenese der CTEPH wurde von der Arbeitsgruppe um Lang et al. gezeigt, die die Endothelexpression von PAI-1 in Präparaten aus Thrombendarteriektomien untersuchte. Hier zeigte sich eine deutlich vermehrte Expression von PAI-1. Als Erklärungsansatz wurde damals aufgeführt, dass PAI-1 eine mögliche Rolle in der insuffizienten Lyse der Akutphase einer Lungenembolie und der im Verlauf einsetzenden Stabilisierung des Thrombus haben könnte. (LANG et al., 1994)

Zusammenfassend scheint der PAI-1 4G/5G-Polymorphismus ein prognostischer Faktor bei einigen Erkrankungen darzustellen und da PAI-1 ein mögliches Schlüsselenzym bei der Entstehung der PH darstellt, scheint ein Zusammenhang logisch.

Besonders bei der CTEPH, bei der eine verminderte Fibrinolyse und sekundäre Fibrosierung des Thrombus als initiale Auslöser betrachtet werden, könnte PAI-1 eine Schlüsselfunktion innehaben.

Da der PAI-1 4G/5G-Polymorphismus zu einer vermehrten Plasmakonzentration an PAI-1 führt, scheint auch die Hypothese, dass Mutationsträger ein höheres Risiko zur Entwicklung einer PH haben, schlüssig.

Es zeigte sich allerdings in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf einen Zusammenhang des Polymorphismus mit CTEPH oder PAH. Zwischen den PAH-Patienten und den CTEPH-Patienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Des Weiteren entsprach die Verteilung der Mutationen der PAH- und CTEPH-Patienten in etwa denen einer gesunden Vergleichsgruppe. Auch die Unterschiede zwischen den Zentren zeigten sich als nicht signifikant.

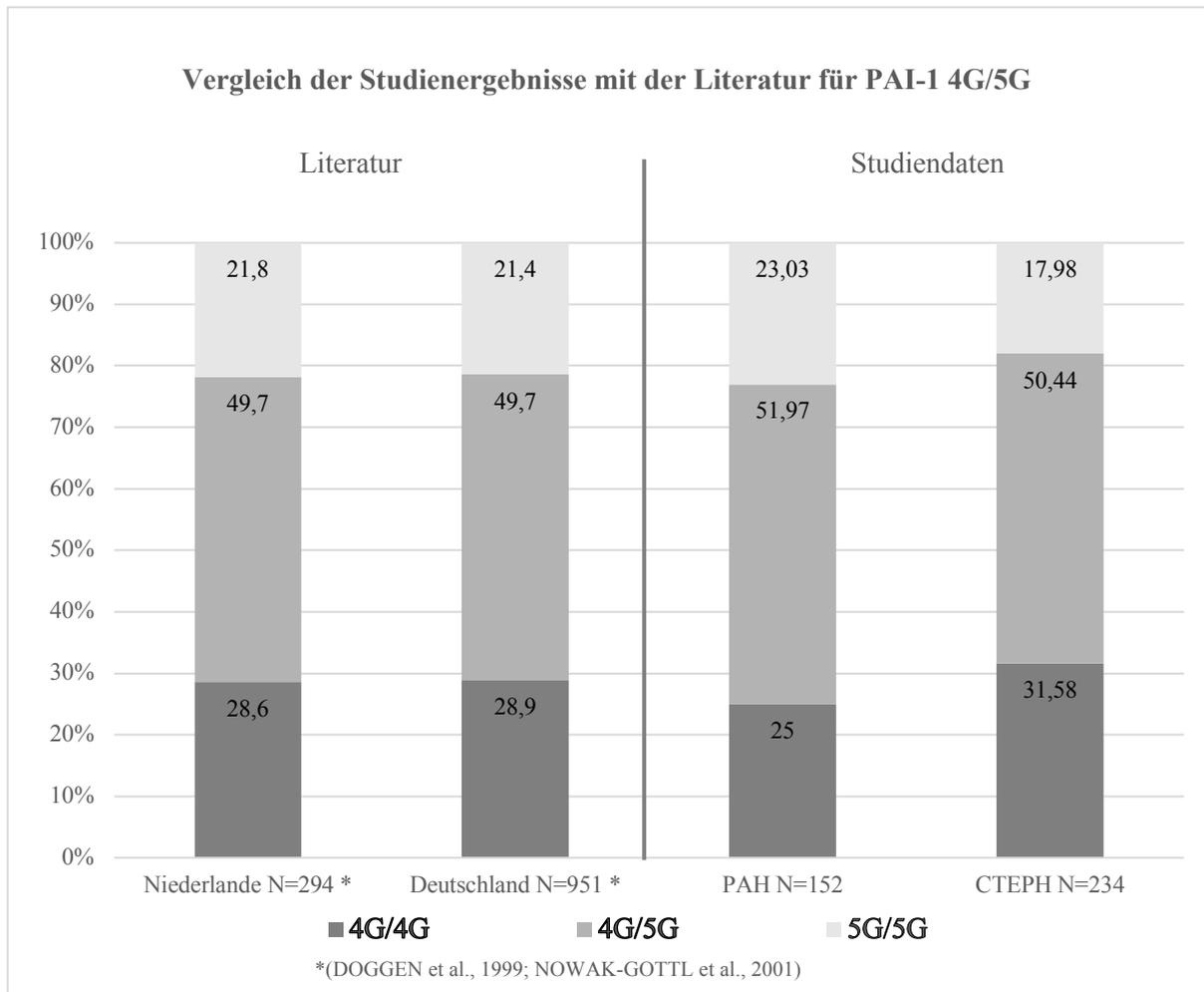


Abbildung 42: Vergleich der Häufigkeit der PAI-1 4G/5G-Mutation mit Referenzwerten aus der Literatur

Dieses Ergebnis entspricht dem der bereits erwähnten Studie von Suntharalingam et al., die die Häufigkeit des PAI-1-Polymorphismus unter CTEPH-Patienten untersuchte. Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. (SUNTHARALINGAM et al., 2008) Es konnte auf genetischer Ebene in der vorliegenden Arbeit keine Grundlage der erhöhten PAI-1-Aktivität unter PAH nachgewiesen werden, sodass es sich möglicherweise um eine funktionelle Veränderung handelt.

Der PAI-1 HD2-Polymorphismus könnte eine größere Auswirkung auf den PAI-1-Plasmaspiegel haben als der PAI-1 4G/5G Polymorphismus, was seine mögliche Bedeutung in der Genese der PAH erklärt.

Der HD2-Polymorphismus betrifft eine Gensequenz, die die Expression des Proteins reguliert. (KATTA et al., 2008) Der PAI-1 4G/5G Polymorphismus dagegen betrifft die Promotorregion des Gens.

Die Regulation des Gens ist komplex und verschiedenste Mechanismen wie Wachstumsfaktoren, Hormone und diverse Entzündungsmediatoren bewirken eine Hochregulation des Gens. Bei Vorliegen der HD2-Mutation könnte dies zu einer überschießenden Synthese von PAI-1 führen, die die Ausbildung einer PAH im Sinne eines Circulus vitiosus begünstigt. PAI-1 4G/5G scheint keinen Einfluss auf diesen Pathomechanismus zu zeigen.

5.3 Einfluss der Mutationen auf die Letalität

Unter den Patienten mit einer PAH zeigte sich eine höhere Sterblichkeit (44 von 152 \approx 29%) als unter den CTEPH-Patienten (16 von 234 \approx 6,8%), was zu erwarten war. Das Gießen PH-Register hat 2017 eine Studie über das Langzeitüberleben der im Zeitraum von 2008-2011 angebundenen PAH- und CTEPH-Patienten veröffentlicht. Hier ergab sich eine bessere Prognose der CTEPH-Patienten gegenüber Patienten mit einer PAH. Für CTEPH-Patienten, bei denen eine PEA durchgeführt wurde, betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 76,7% und bei Patienten bei denen keine PEA erfolgte, lag die Prognose bei 61,8%. Bei den PAH-Patienten betrug die 5-Jahres-Überlebensrate dagegen 56,9%. (GALL et al., 2017)

Eine Studie des Universitätsklinikums Pavia (Italien) konnte für Patienten nach PEA eine 5-Jahres-Überlebensrate von 84% zeigen. Hierbei ist das Langzeitüberleben bei PEA-Patienten besonders vom NYHA-Stadium zum Zeitpunkt des Eingriffes abhängig. (CORSICO et al., 2008)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob das Vorliegen der Mutationen einen Einfluss auf Letalität und Prognose hat. Die betrachteten Mutationen werden mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht und auch ein möglicher protektiver Effekt bei bestimmten Erkrankungen wird diskutiert. Daher wird im Folgenden der Einfluss der Mutationen auf die Gesamtletalität besprochen und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen.

MTHFR C677T und A1298C gelten als kardiovaskulärer Risikofaktor auch unter jungen Patienten (MONTENARTH, 2007) und einige Studien deuten auf einen Zusammenhang mit der Entstehung neoplastischer Erkrankungen hin, der durch die gesteigerte Methylierung der DNS durch die erhöhten Homocysteinspiegel bedingt scheint. (LAIRD, JAENISCH, 1994)

Eine Assoziation mit einigen Erkrankungen ist allerdings nicht zwingend mit einer erhöhten Letalität gleichzusetzen.

Eine Studie in Jordanien konnte nachweisen, dass in einer Gruppe mit Patienten mit einem Durchschnittsalter von 90 Jahren dieselbe Prävalenz der MTHFR C677T-Mutation als in einer Gruppe mit einem Durchschnittsalter von 30 vorliegt, was gegen eine gesteigerte Letalität spricht. (KHABOUR et al., 2009)

Ein ähnliches Studiendesign wurde in Leiden durchgeführt, allerdings mit gegenteiligem Ergebnis. Hier wurde die Allelfrequenz von Patienten über 85 mit der von jüngeren Patienten verglichen. Hierbei fanden sich deutlich weniger homozygote Mutationsträger mit hohem Alter als in der Gruppe der jüngeren Patienten (12,2% unter den Jüngeren, 4,4 % unter den Älteren) als Hinweis einer gesteigerten Letalität für Mutationsträger. (HEIJMANS et al., 2000)

Ob die beiden MTHFR-Mutationen Einfluss auf die Gesamtletalität haben, scheint nicht abschließend geklärt. Bisher konnte nur für die MTHFR C677T-Mutation ein Einfluss gezeigt werden.

Unsere Daten deuten darauf hin, dass die MTHFR C677T-Mutation keinen Einfluss auf die Letalität unter CTEPH- und PAH-Patienten hat. Wir konnten keinen Unterschied der MTHFR C677T-Mutation unter der Gruppe der überlebenden und verstorbenen PAH- und CTEPH-Patienten zeigen. Für die MTHFR A1298C-Mutation fand sich kein Unterschied zwischen verstorbenen und überlebenden PAH-Patienten. Allerdings fand sich für die homozygote MTHFR A1298C-Mutation ein signifikanter Unterschied zwischen überlebenden und verstorbenen CTEPH-Patienten (6,25% vs. 20%; $p=0,036$). Dieses Ergebnis ist jedoch am ehesten durch die geringe Probenzahl der verstorbenen CTEPH-Patienten (N=16) zu erklären. Die isolierte MTHFR A1298C-Mutation hat nur eine geringe pathophysiologische Relevanz und ein Einfluss auf die Letalität scheint daher unwahrscheinlich.

Auch der PAI-1 4G/5G-Polymorphismus wird aktuell mit diversen Krankheiten in Verbindung gebracht, sodass es auch hier naheliegend ist, dass er einen Einfluss auf die Lebenserwartung hat. Patienten mit einem 4G/4G-Genotyp haben ein leicht erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (LIANG et al., 2015) und wahrscheinlich ein erhöhtes Krebsrisiko. (WANG et al., 2013)

Hoekstra et al. untersuchte das Risiko für zerebrale Ischämien bei Patienten zwischen 65 und 84 Jahren. Diese Studie zeigte zwar ein steigendes Risiko mit erhöhter PAI-Aktivität im Blut, der 4G/4G-Genotyp zeigte sich hier jedoch als protektiver Faktor. In der Arbeit wird dieses kontroverse Ergebnis mit einem möglichem lokalen plaquestabilisierenden Effekt des PAI-1 interpretiert. Die Ergebnisse legen nahe, dass die im Blutplasma gemessene PAI-1-Aktivität

neben der Genetik von weiteren Faktoren abhängt, die zur Atherosklerose beitragen können oder das PAI-1 im Rahmen der zugrunde liegenden Erkrankung hoch reguliert wird. (HOEKSTRA et al., 2003)

Bei Patienten mit einer Sepsis korreliert der 4G/4G-Genotyp mit schwereren Verläufen und einer höheren Letalität. (HUQ et al., 2012)

Auch wenn der PAI-1 4G/5G-Polymorphismus insgesamt zur Pathogenese vieler Erkrankungen beizutragen scheint, ist nicht geklärt, ob Mutationsträger eine höhere Gesamtletalität haben. Wenn Merkmalsträger früher sterben, müsste der Anteil an Mutationsträgern im hohen Alter abnehmen. Ob dies der Fall ist, prüfte eine Studie der Universität Bonn, indem sie das Genom von 205 Personen mit einem Mindestalter von 80 Jahren untersuchte. Es zeigte sich eine Verteilung von 47% Heterozygoten sowie 30% des 4G/4G- und 23% des 5G/5G-Genotypes, dies entsprach der Verteilung in einer jüngeren Kohorte. (LOTTERMOSER et al., 2001)

In unserer Studie unterscheidet sich die Verteilung der Genotypen des PAI-1 4G/5G-Polymorphismus zwischen verstorbenen und überlebenden PAH- und CTEPH-Patienten nicht signifikant. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die PAI 4G/5G-Mutation keinen Einfluss auf den Verlauf von PAH und CTEPH hat. Dies spricht dafür, dass die erhöhten Plasmalevel, die sich bei PAH finden, funktional sind und nicht zur Entstehung der Erkrankungen beitragen, da der PAI-1 4G/5G-Polymorphismus sonst einen Einfluss auf die Entstehung oder den Verlauf haben müsste.

Auch der vermehrte Nachweis von PAI-1 in Thrombendarteriektomiepräparaten könnte eine Folge der Erkrankung sein. Die Hochregulation von PAI-1 bewirkt hier zwar eine Stabilisierung des Thrombus, was zur Fixierung der PH führt, allerdings könnte die vermehrte Expression Teil eines komplexen Pathomechanismus sein, der zu einer Verstärkung der Erkrankung im Sinne eines Circulus vitiosus führt. Auch wenn PAI-1 möglicherweise keinen Auslöser der Erkrankung darstellt, könnte seine Regulation einen interessanten Therapieansatz darstellen, mit dem die Ausbildung oder Progredienz einer PAH oder CTEPH beeinflusst werden kann. Besonders bei der CTEPH könnte die Regulation der gestörten Thrombolysen eine interessante Perspektive darstellen.

Die FVL-Mutation ist die häufigste erblich bedingte Ursache thrombembolischer Ereignisse. Schon das Vorliegen einer heterozygoten Mutation führt zu einem 2,7fach erhöhten Risiko zur Entwicklung einer Thrombose oder Lungenembolie, wohingegen das Risiko für myokardiale und cerebrale Ischämien nicht erhöht scheint. (RIDKER et al., 1995)

Die Prothrombinmutation G2010A gilt ebenfalls als gesicherter Risikofaktor für thrombembolische Ereignisse, besonders bei gleichzeitigem Vorliegen weiterer Mutationen. So zeigen Patienten mit gleichzeitigem Vorliegen der Prothrombin- und FVL-Mutation ein deutlich erhöhtes Risiko, an einer Thrombose zu erkranken (OR=20). (EMMERICH et al., 2001) Aber auch für die beiden Mutationen scheint trotz des deutlich erhöhten Risikos für Thrombembolien eine gesteigerte Letalität von Merkmalsträgern nicht gesichert. Eine Studie der Universität Palermo untersuchte den Einfluss der FVL-Mutation und der Prothrombinmutation G2010A auf die Lebenserwartung und das Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz im Alter. Hierbei wurden Alzheimerpatienten mit einer Gruppe von insgesamt 106 über 90-Jährigen und einer Gruppe gesunder Probanden zwischen 20 und 50 bezüglich des Vorliegens der Mutationen untersucht. Es zeigte sich eine gleiche Verteilung der Phänotypen. Hinweise für einen Zusammenhang mit einer Alzheimer-Demenz und einer gesteigerten Letalität bestehen hiernach nicht. (VACCARINO et al., 2011)

Eine ähnliche, in Polen durchgeführte Studie, untersuchte die Allelverteilung der FVL-Mutation zwischen Neugeborenen, gesunden jungen Probanden und hoch betagten Patienten (>95 Jahre) und kam zu einem anderen Ergebnis. Es zeigte sich eine deutlich niedrigere Allelfrequenz unter der Gruppe der alten Patienten, verglichen mit den anderen beiden Gruppen, als Hinweis auf eine gesteigerte Letalität. (ADLER et al., 2010)

Das alleinige Vorliegen einer Prothrombinmutation scheint nicht mit einer erhöhten Letalität zu korrelieren, für Mutationsträger der FVL-Mutation scheint ein Zusammenhang möglich.

In der vorliegenden Studie konnten wir für beide Mutationen keinen Unterschied zwischen Überlebenden und Toten aufzeigen. Hiernach ergab sich kein Hinweis, dass die FVL-Mutation oder die Prothrombinmutation einen Einfluss auf die Letalität von Patienten mit einer PAH oder einer CTEPH haben könnte.

Betrachtet man zusammenfassend die aktuelle Studienlage, scheint für die MTHFR A1298C-Mutation, die Prothrombinmutation und den PAI-1 4G/5G-Polymorphismus kein klarer Hinweis einer gesteigerten Letalität zu bestehen. Für die FVL- und die MTHFR C677T-Mutation liegen teilweise widersprüchliche Studien vor, eine höhere Sterblichkeit scheint hier aber möglich.

Für die untersuchten Mutationen ergaben sich bei den PAH-Patienten keine Unterschiede zwischen Überlebenden und Toten. Unter den CTEPH-Patienten ergab sich lediglich für die

MTHFR A1298C-Mutation ein signifikanter Unterschied ($p=0.036$). Der biochemische Einfluss der isolierten MTHFR A1298C-Mutation ist sehr gering, sodass hier ein Zusammenhang eher unwahrscheinlich scheint. Das Ergebnis ist möglicherweise durch die geringe Probenzahl der verstorbenen CTEPH-Patienten ($N=16$) zu erklären.

Unsere Studie konnte keinen Einfluss auf eine gesteigerte Letalität von Trägern der untersuchten Mutationen bei PAH- und CTEPH-Patienten aufzeigen.

Allerdings könnte das Ergebnis durch eine bestehende Antikoagulation teilweise beeinflusst worden sein. In der Studie ist die Einnahme von Antikoagulanzen nicht explizit erfasst worden. Da diese allerdings sowohl bei der CTEPH als auch bei der PAH eine Standardtherapie darstellen, muss davon ausgegangen werden, dass der größte Teil der Patienten unter oraler Antikoagulation stand. Besonders bei der Prothrombin und der FVL-Mutation, die zu einer Aktivierung von Thrombin führen, könnte ein Einfluss auf die Prognose durch die Einnahme oraler Antikoagulanzen vermindert worden sein. Die MTHFR-Mutationen und die PAI 4G/5G-Mutation bewirken nicht direkt eine vermehrte Hämostase, sodass die Antikoagulation hier möglicherweise einen geringeren Effekt haben könnte. Dennoch legen die Daten nahe, dass unter leitliniengerechter Therapie kein Einfluss der untersuchten Mutationen auf die Prognose besteht.

5.4 Einfluss auf den Verteilungstyp der Gefäßveränderungen bei Patienten mit CTEPH

Die PEA stellt einen kurativen Therapieansatz für Patienten mit einer CTEPH dar. Der Eingriff setzt allerdings voraus, dass die Gefäßläsionen an operativ zugänglichen Abschnitten der Lungenstrombahn liegen. Die PEA ist daher nur bei Patienten mit einem zentralen Verteilungsmuster möglich. Okklusionen distal der Subsegmentebene der pulmonalen Gefäße sind durch den Chirurgen nicht zu erreichen. In der Literatur ist beschrieben, dass 30%-50% der CTEPH-Patienten ein zu peripheres Verteilungsmuster vorweisen und daher eine PEA nicht möglich ist. (GALIÈ, KIM, 2006; PEPKE-ZABA et al., 2011; QUADERY et al., 2018)

Das Verhältnis von peripherer zu zentraler Verteilung in der vorliegenden Studie entsprach den Angaben, die sich in der Literatur finden. 34,62% der insgesamt 234 Patienten mit einer CTEPH wiesen ein peripheres Verteilungsmuster auf. Bei 153 Patienten wurde dagegen die Indikation zur OP gestellt.

Die meisten Patienten entwickeln eine CTEPH nach einer Lungenembolie. Man geht davon aus, dass das thrombotische Material durch eine gestörte Fibrinolyse persistiert und langsam

fibrosiert. Warum allerdings nur ein sehr kleiner Teil der Patienten mit Lungenembolie eine CTEPH ausbilden und umgekehrt nur etwa 75% der CTEPH-Patienten eine Lungenembolie als Erstereignis vorweisen, ist Gegenstand aktueller Forschung. (PEPKE-ZABA et al., 2011)

Histologische Untersuchungen des thrombotischen Materials, das bei einer PEA geborgen wird, zeigen neben alten Thromben und teilweise fibrosierten Anteilen auch frische thrombotische Anteile. Dies zeigt, dass es sich bei der CTEPH um eine chronische, progrediente Erkrankung handelt. (BOCHENEK et al., 2017)

Die zentrale Thrombosierung wird aktuell als Auslöser betrachtet, der eine Kaskade initiiert, die im weiteren Verlauf zunehmend distale Abschnitte des Lungengefäßbettes befällt. (MOSER et al., 1990; SCHÄFERS, SEEGER, 2001) Progrediente Mitbeteiligung der kleinen Gefäße führt zu einer klinischen Progredienz der Erkrankung. Noch ist nicht geklärt, warum einige Patienten zu einer zentralen Embolisation neigen, während andere eine eher periphere Verteilung der Gefäßläsionen entwickeln, und ob es sich möglicherweise um verschiedene Krankheitsentitäten handelt.

So ähneln die peripheren Läsionen der CTEPH in vielen Aspekten den Gefäßveränderungen bei PAH und beinhalten plexiforme Läsionen, Intimaproliferation, Hypertrophie der glatten Muskelzellen und Mikrothrombosen. (GALIÈ, KIM, 2006) Bei einem sehr geringen Prozentsatz der CTEPH-Patienten (1-2%) finden sich ausschließlich Veränderungen der peripheren Lungengefäße und keine zentrale Embolisation. (GALIÈ, KIM, 2006; MOSER, BLOOR, 1993) Unklar ist hierbei, ob der Pathomechanismus der Entstehung der übrigen CTEPH-Patienten entspricht und sich bei diesen Patienten die zentrale Embolisation bereits aufgelöst hat oder ob die isoliert periphere CTEPH eine andere Genese aufweist. Bei diesen Formen könnten Embolien möglicherweise nicht den zentralen Pathomechanismus der Erkrankung darstellen.

Ein distaleres Verteilungsmuster ist mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden. (BONDERMAN et al., 2007)

Möglicherweise sind die verschiedenen Formen teilweise Ausdruck einer unterschiedlichen genetischen Prädisposition.

Dass der genetische Hintergrund Einfluss auf die Erscheinungsform der CTEPH haben muss, zeigt sich am Beispiel der japanischen CTEPH-Patienten. In Japan betrifft die CTEPH vorwiegend Frauen. Die Erkrankung entwickelt sich außerdem bei der Mehrzahl der Patienten ohne vorangehende Lungenembolie, wohingegen unter Kaukasiern der Anteil dieser Patienten deutlich geringer ist (63% vs. 25%). (TANABE et al., 2013)

Offensichtlich unterscheiden sich diese Patienten in der Genese von europäischen CTEPH Patienten und eine genetische Prädisposition bleibt hier als Ursache anzunehmen.

Unter japanischen CTEPH-Patienten konnte beispielsweise eine Assoziation mit HLA B5201 gezeigt werden, ein Antigen, das mit Vaskulitiden assoziiert ist. Der Anteil unter CTEPH-Patienten entsprach mit 40% dem unter Patienten mit Takayasu Arteriitis. (TANABE et al., 2005)

Dies lässt die These zu, dass die Genese bestimmter Formen der CTEPH vaskulitischen Erkrankungen ähnelt.

Es gibt Hinweise, dass das Versagen der Lyse bei CTEPH-Patienten möglicherweise strukturellen Veränderungen des Fibrins verschuldet ist, die eine Resistenz gegen die physiologische Thrombolyse aufweisen. Besonders interessant ist hierbei die β -Kette des Fibrins, da sie die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen stimuliert und dadurch zu einem endothelialen Remodelling beitragen könnte. (SPORN et al., 1995) Die Lyse dieser Fibrin- β -Ketten ist bei CTEPH-Patienten deutlich verlangsamt, was möglicherweise an einer strukturellen Veränderung des Fibrins selbst oder aber an einem veränderten Thrombus liegt. Interessanterweise konnte Miniati et al. eine Resistenz des Fibrins gegenüber Fibrinolyse nicht nur für CTEPH-Patienten aufzeigen, der Effekt tritt auch bei PAH-Patienten auf. (MINIATI et al., 2010)

Warum CTEPH- und PAH-Patienten besonders stabile Fibrinketten vorweisen, ist nicht geklärt, aber möglicherweise besteht eine genetische Komponente. So wurde der Fibrinogen $A\alpha$ Thr312Ala Polymorphismus signifikant häufiger unter CTEPH-Patienten nachgewiesen. Die Mutation verursacht einen stabileren Fibrinthrombus, der eine gewisse Resistenz gegenüber einer Lyse zeigt. (SUNTHARALINGAM et al., 2008) Es muss aber angenommen werden, dass noch weitere Mutationen des Fibrinogens mit einer CTEPH assoziiert sein könnten.

TAFI scheint ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der gestörten Lyse des Fibrinthrombus einzunehmen. Nach Aktivierung durch den Thrombin/Thrombomodulinkomplex spaltet TAFIa die C-terminalen Lysinreste, die bei der Vernetzung des Fibrinthrombus gebildet werden. Diese Lysinreste dienen als Bindungsstelle für t-PA und Plasminogen an den Fibrinthrombus. Wird deren Wirkung verhindert, kommt es zu einer verzögerten Lyse. (YAOITA et al., 2016)

Das TAFI-System stellt einen regulierenden Rückkopplungsmechanismus dar, der eine überschießenden Fibrinolyse verhindern soll. Kommt es zu einer gesteigerten Aktivität von TAFI, führt dies zu einer gestörten Fibrinolyse.

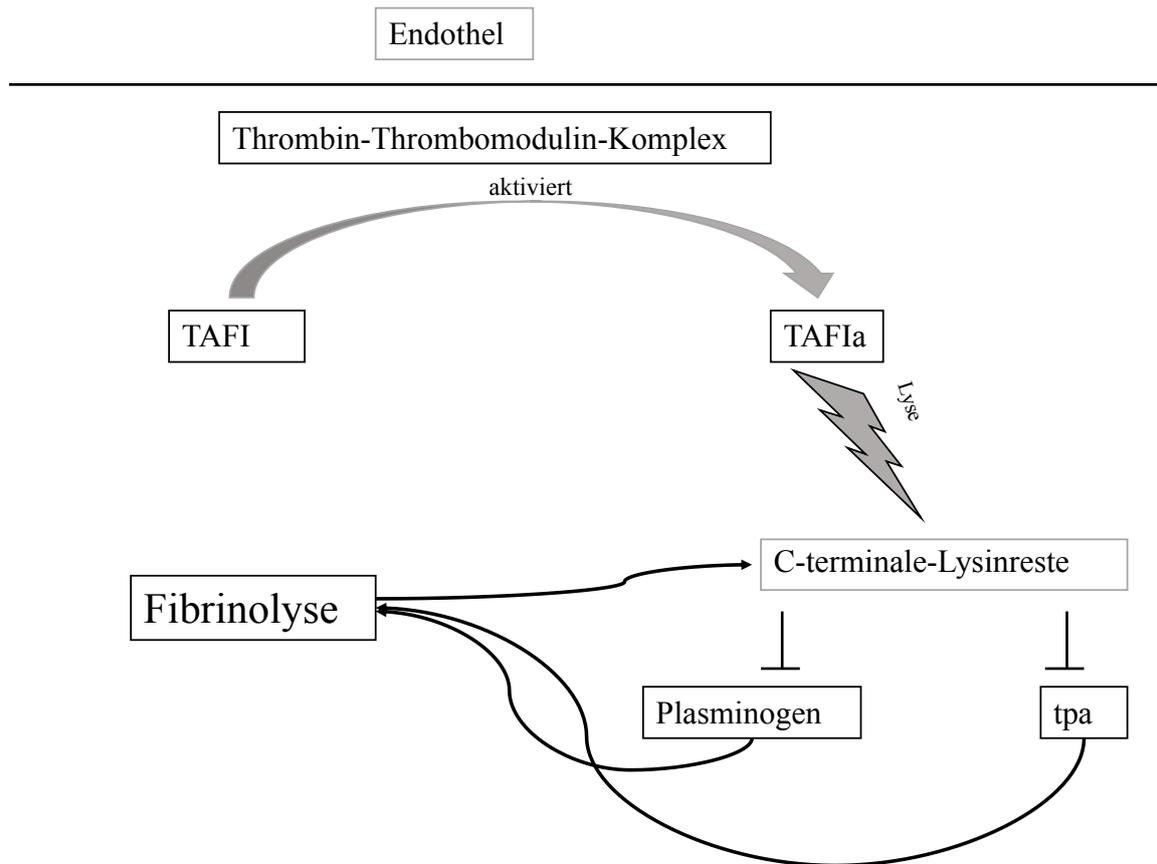


Abbildung 43: Einfluss des TAFI-Systems auf die Fibrinolyse

CTEPH-Patienten zeigen eine deutlich höhere TAFI-Aktivität gegenüber PAH-Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe. Die Arbeitsgruppe um YAOITA et al. konnte nachweisen, dass sich bei CTEPH-Patienten signifikant höhere TAFI-Plasmalevel finden. Die Arbeitsgruppe zeigte außerdem, dass CTEPH-Patienten eine gestörte Fibrinolyse vorweisen, indem sie die Lysezeit eines Thrombus nach Zusatz von Monteplase in Patientenblut bestimmten. Nach 4h zeigten die CTEPH-Patienten eine Lyse von 58,1% des Thrombus, wohingegen die Kontrollgruppe eine Lyse von 73,5% des thrombotischen Materials vorwies.

Es konnte außerdem eine klare Korrelation zwischen den erhöhten TAFI-Plasmaspiegel und der verlängerten Lyse unter den CTEPH-Patienten der Studie gezeigt werden. (YAOITA et al., 2016)

Die Arbeit untersuchte auch den Verlauf der TAFI-Plasmalevel nach BPA und obwohl durch den Eingriff eine deutliche Verbesserung der Hämodynamik erzielt wurde, zeigten sich die TAFI-Plasmalevel weiterhin erhöht.

Hieraus folgt, dass es sich bei den erhöhten TAFI-Plasmaspiegeln möglicherweise nicht um eine funktionale Erhöhung, bedingt durch die hohen pulmonalen Drücke handelt, sondern eine genetische Prädisposition unter CTEPH-Patienten vorliegt.

Sollte die genetische Veranlagung Einfluss auf die Verteilung der Gefäßläsionen haben, sind die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen vielversprechende Kandidaten, da sie entweder die Neubildung von Thromben begünstigen oder die Lyse verhindern und so das Verteilungsmuster beeinflussen könnten. In der vorliegenden Studie zeigte sich allerdings für keine der untersuchten Mutationen ein Unterschied zwischen peripherer und zentraler Verteilung der Gefäßläsionen. Alle fünf Mutationen scheinen damit die Erscheinungsform der CTEPH nicht zu beeinflussen. Doch auch wenn sich kein direkter Einfluss auf die Verteilung ergibt, so könnte dennoch ein Unterschied im Therapieansprechen oder der Prognose vorliegen. Die Auswertung der Verlaufsuntersuchung ergab jedoch hierauf ebenfalls keinen Hinweis.

Während die vorliegende Arbeit allerdings nur den Einfluss der Mutationen auf die Letalität betrachtet, untersuchte eine Studie der Universität Prag den Einfluss von Thrombophilie auf die Prognose bei Patienten nach PEA. Die Patienten wurden hierbei in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfasste Patienten mit einer Thrombophilie, hierunter auch die FVL- und die Prothrombinmutation. Demgegenüber wurde jeweils eine Gruppe mit Patienten mit einer isolierten Mutation des MTHFR-Gens sowie eine Vergleichsgruppe ohne Thrombophilie betrachtet. In der Studie zeigte sich, dass das Durchschnittsalter der Patienten mit nachgewiesener Thrombophilie um 7-10 Jahre unter dem der beiden Vergleichsgruppen lag. Außerdem zeigte diese Subgruppe eine höhere postoperative Letalität und Morbidität als die beiden anderen Gruppen. Besonders das Risiko für die Entwicklung eines Reperfusionsödems, eines Perikarderguss sowie postoperative Niereninsuffizienz war unter der Gruppe mit Thrombophilie bis zu 2-3fach erhöht. Das Vorliegen einer isolierten Mutation des MTHFR-Gens schien keinen Einfluss auf die Prognose nach PEA zu haben. Dennoch profitierten in dieser Studie Patienten mit einer Thrombophilie gleichermaßen von der Operation, wenn man die Hämodynamik und die Verbesserung der Klinik betrachtet. (LINDNER et al., 2009) Zusammengefasst bedeutet das, dass Patienten mit Thrombophilie früher eine CTEPH entwickeln und von einer PEA zwar profitieren, aber perioperativ deutlich mehr Komplikationen vorweisen. Die Arbeit lässt offen, ob die erhöhte Komplikationsrate unter der Thrombophilie-Gruppe möglicherweise ein allgemein erhöhtes Risiko von Patienten mit Thrombophilie bei großen operativen Eingriffen widerspiegelt oder ob der Effekt speziell bei CTEPH nach PEA nachzuweisen ist. Wäre letzteres der Fall, könnte dies darauf hindeuten, dass

Patienten mit Vorliegen einer Thrombophilie eine besondere Form der CTEPH vorweisen, die im Rahmen einer PEA zu mehr Komplikationen führt.

Für die heterozygote FVL-Mutation scheint beim Durchführen einer konsequenten Thromboseprophylaxe kein Zusammenhang mit einer erhöhten allgemeinen perioperativen Komplikationsrate zu bestehen. (DONAHUE, 2004)

Allerdings umfasst die Gruppe der Patienten mit Thrombophilie neben FVL und Prothrombin auch Patienten mit Antiphospholipidsyndrom oder Protein-S und Protein-C-Mangel. Für Patienten mit Antiphospholipidsyndrom konnte eine höhere perioperative Komplikationsrate nachgewiesen werden, sodass der Effekt zumindest teilweise durch ein generell erhöhtes perioperatives Komplikationsrisiko unter der groß gehaltenen Gruppe der Patienten mit Thrombophilie erklärt werden kann. (ATISHA-FREGOSO et al., 2017)

Dass aber auch das Risiko eines pulmonalen Reperfusionsoödems erhöht ist, könnte darauf hindeuten, dass sich die Gefäßläsionen bei Patienten mit Thrombophilie unterscheiden oder die Thrombophilie direkten Einfluss auf die Entstehung eines Reperfusionsoödems zeigt.

Die Ätiologie des pulmonalen Reperfusionsoödems ist noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise führt eine Ischämie bedingte Endothelschädigung bei Reperfusion zu einer vermehrten Permeabilität der Gefäßwand. (SANADA et al., 2019) Vermutet wird hierbei eine Überexpression pro-apoptotischer Rezeptoren der pulmonalen Endothelzellen, bedingt durch die chronische Hypoxie. Kommt es zur Wiedereröffnung des Gefäßlumens, bewirkt die gesteigerte Durchblutung einen Zelluntergang und eine Endotheldysfunktion, die zur Extravasation von Flüssigkeit führt. Ein postoperativ residual erhöhter mPAP begünstigt diesen Mechanismus. (SANADA et al., 2019) Einige Gerinnungsfaktoren beeinflussen die Zellproliferation bzw. die Apoptose. So binden Prothrombin und Antiphospholipidantikörper an apoptotische Zellen und könnten eine vermehrte pulmonale Endothelschädigung nach PEA begünstigen. (D'AGNILLO et al., 2003)

Um den Pathomechanismus genauer zu eruieren, müsste man allerdings eine dezidiere Einteilung der Thrombophiliegruppe vornehmen, um herauszufinden, ob alle oder nur bestimmte Faktoren zu mehr Komplikationen neigen.

Dennoch zeigt die Arbeit, dass eine Diagnostik auf Thrombophilie vor PEA zum Abschätzen des Risikos wichtig ist.

Abschließend lässt sich sagen, dass die CTEPH möglicherweise eine heterogenere Krankheit darstellt, als es lange Jahre postuliert wurde. Die Krankheit unterscheidet sich in ihrem

Erscheinungsmuster und der Genese. Es könnte eine Reihe unterschiedlicher Faktoren geben, die diese Aspekte beeinflussen und eine nähere Unterteilung der Erkrankung erlauben. Das Wissen der Pathogenese der unterschiedlichen Formen könnte neue Perspektiven in der Therapie erlauben und das Verständnis der Erkrankung verbessern. Da die Gruppe der bisher bekannten Risikofaktoren einer CTEPH sehr heterogen ist und neben klassischen thrombembolischen Risikofaktoren wie dem Antiphospholipidsyndrom auch eine gestörte Fibrinolyse beinhalten, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um einen sehr komplexen Pathomechanismus handelt. Daraus leitet sich ab, dass es voraussichtlich mehrere genetische Prädispositionen gibt, die die Erscheinungsform der CTEPH beeinflussen, möglicherweise sogar deren Kombination. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die untersuchten Mutationen keinen Einfluss auf die Erscheinungsform haben, es gibt aber klare Hinweise in der Literatur, dass sich die weitere Suche nach anderen Polymorphismen lohnen könnte.

5.5 Schlusswort

Die vorliegende Studie konnte nachweisen, dass Prothrombin G2010A einen Risikofaktor für die Ausbildung einer CTEPH darstellt. Die FVL-Mutation zeigte sich ebenfalls mit einer leicht erhöhten Prävalenz unter CTEPH-Patienten. Die anderen untersuchten Mutationen scheinen keinen Einfluss auf die Entstehung einer PAH oder CTEPH zu haben. Ebenso zeigte sich kein Einfluss auf die Letalität oder das Verteilungsmuster unter CTEPH-Patienten. Interessanterweise fand sich unter den PAH-Patienten aus Amsterdam ein niedriger Anteil an homozygoten MTHFR C677T- und A1298C-Mutationen, was möglicherweise auf einen geringen Anteil an Mutationsträgern unter IPAH- bzw HPAH-Patienten hinweist. Hier sind aber weitere Studien nötig, um das Ergebnis zu verifizieren.

Die Pathogenese der PAH und der CTEPH ist komplex und ebenso komplex ist die genetische Prädisposition der Erkrankung. Letztlich muss davon ausgegangen werden, dass nur ein Bruchteil der Gene, die die Erkrankungen beeinflussen, gefunden sind. Besonders Polymorphismen, die das Fibrinogen-Gen oder das TAFI-System betreffen, könnten vielversprechende Ansätze zukünftiger Forschung darstellen.

6 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER EINTEILUNG NACH EVIAN.....	18
TABELLE 2: EINTEILUNG IN FUNKTIONELLE KLASSEN GEMÄß DER WHO.....	18
TABELLE 3: EINTEILUNG DER PULMONALEN HYPERTONIE NACH NIZZA 2018.....	20
TABELLE 4: ERWORBENE RISIKOFAKTOREN EINER TIEFEN BEINVENENTHROMBOSE SOWIE DEREN ODDS RATIO	31
TABELLE 5: EINTEILUNG DER GRUPPEN ANGELEHNT AN DIE NIZZA-KLASSIFIKATION VON 2013	42
TABELLE 6: PRIMERSEQUENZEN MTHFR C677T	44
TABELLE 7: PCR-MASTERMIX MTHFR C677T	44
TABELLE 8: PCR-PROTOKOLL MTHFR C677T.....	45
TABELLE 9: PRIMERSEQUENZEN MTHFR A1298C.....	45
TABELLE 10: PCR-MASTERMIX MTHFR A1298C.....	45
TABELLE 11: PCR-PROTOKOLL MTHFR A1298C	46
TABELLE 12: PRIMERSEQUENZEN PAI-1 4G/5G	46
TABELLE 13: PCR-MASTERMIX PAI-1 4G/5G.....	46
TABELLE 14: PCR-PROTOKOLL PAI-1 4G/5G	47
TABELLE 15: PRIMERSEQUENZEN FVL.....	47
TABELLE 16: PCR-MASTERMIX FVL	47
TABELLE 17: PCR-PROTOKOLL FVL.....	48
TABELLE 18: PRIMERSEQUENZEN PROTHROMBIN G2010A.....	48
TABELLE 19: PCR-MASTERMIX PROTHROMBIN G2010A.....	48
TABELLE 20: PCR-PROTOKOLL PROTHROMBIN G2010A	49
TABELLE 21: PROTOKOLL PYROSEQUENZIERUNG	52
TABELLE 22: PRIMERSEQUENZ, PIPETTIERSEQUENZ UND AUSWERTUNG FÜR PYROSEQUENZIERUNG FÜR PAI 4G/5G.....	53
TABELLE 23: PRIMERSEQUENZ, PIPETTIERSEQUENZ UND AUSWERTUNG FÜR PYROSEQUENZIERUNG FÜR FVL	53
TABELLE 24: PRIMERSEQUENZ, PIPETTIERSEQUENZ UND AUSWERTUNG FÜR PYROSEQUENZIERUNG FÜR PROTHROMBIN.....	54
TABELLE 25: PRIMERSEQUENZ, PIPETTIERSEQUENZ UND AUSWERTUNG FÜR PYROSEQUENZIERUNG FÜR MTHFR A1298C.....	54
TABELLE 26: PRIMERSEQUENZ, PIPETTIERSEQUENZ UND AUSWERTUNG FÜR PYROSEQUENZIERUNG FÜR MTHFR C677T	54
TABELLE 27: MASTERMIX FÜR FVL, PAI 4G/5G UND PROTHROMBIN.....	57
TABELLE 28: PCR-PROTOKOLL DER SCHMELZKURVENANALYSE FÜR PAI 4G/5G, PROTHROMBIN UND FVL.....	58
TABELLE 29: SCHMELZPUNKTE DER PROTHROMBINMUTATION.....	58
TABELLE 30: SCHMELZPUNKTE DER FVL-MUTATION.....	59
TABELLE 31: SCHMELZPUNKTE DER PAI 4G/5G-MUTATION	59
TABELLE 32: VERWENDETE GERÄTE	59
TABELLE 33: MATERIAL FÜR DIE DNS-EXTRAKTION.....	59
TABELLE 34: MATERIAL FÜR DIE PCR	60
TABELLE 35: MATERIAL FÜR DIE SEQUENZIERUNG	60
TABELLE 36: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERTEILUNG UNTER DEN ZENTREN	68
TABELLE 37: ÜBERSICHT DER DESKRIPTIVEN STATISTIK.....	70
TABELLE 38: VERTEILUNG DER SUBGRUPPEN DER PATIENTEN MIT EINER PAH.....	71
TABELLE 39: ÜBERSICHT ÜBER DIE HÄUFIGKEITEN DER BEIDEN MTHFR-MUTATIONEN ZWISCHEN PAH UND CTEPH.....	75
TABELLE 40: ERGEBNISSE DER SIGNIFIKANZTESTUNG	75
TABELLE 41: ÜBERSICHT ÜBER DIE RELATIVE MUTATIONSHÄUFIGKEIT NACH ZENTRUM	78
TABELLE 42: HÄUFIGKEITEN VON FVL, PROTHROMBIN G2010A UND PAI 4G/5G IM VERGLEICH ZWISCHEN PAH UND CTEPH.....	81
TABELLE 43: ERGEBNISSE DER SIGNIFIKANZTESTUNG	81
TABELLE 44: ÜBERSICHT ÜBER DIE RELATIVE MUTATIONSHÄUFIGKEIT NACH ZENTRUM	84
TABELLE 45: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN PAH-PATIENTEN FÜR DIE MTHFR-MUTATIONEN ZWISCHEN DEN DREI GRUPPEN.....	85
TABELLE 46: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN PAH-PATIENTEN FÜR DIE MTHFR-MUTATIONEN ZWISCHEN HOMBURG UND AMSTERDAM	86

TABELLE 47: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN PAH-PATIENTEN FÜR FVL UND PROTHROMBIN ZWISCHEN DEN DREI GRUPPEN.....	87
TABELLE 48: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN PAH-PATIENTEN FÜR FVL UND PROTHROMBIN ZWISCHEN HOMBURG UND AMSTERDAM	88
TABELLE 49: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN PAH-PATIENTEN FÜR PAI 4G/5G ZWISCHEN DEN DREI GRUPPEN	89
TABELLE 50: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN PAH-PATIENTEN FÜR PAI 4G/5G ZWISCHEN HOMBURG UND AMSTERDAM	90
TABELLE 51: UNTERSCHIEDE DER PAH-PATIENTEN AUS AMSTERDAM UND DER HOMBURGER PAH-AMBULANZ FÜR FVL, PROTHROMBIN G2010A UND PAI 4G/5G	91
TABELLE 52: UNTERSCHIEDE DER PAH-PATIENTEN AUS AMSTERDAM UND DER PAH-AMBULANZ FÜR MTHFR C677T, MTHFR A1298C UND COMPOUND-MTHFR	91
TABELLE 53: UNTERSCHIEDE DER RELATIVEN HÄUFIGKEITEN ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN CTEPH-PATIENTEN FÜR MTHFR C677T, A1298C UND DIE COMPOUND-HETEROZYGOTIE.....	95
TABELLE 54: UNTERSCHIEDE DER RELATIVEN HÄUFIGKEITEN DER CTEPH-PATIENTEN FÜR PROTHROMBIN G2010A, FVL UND PAI 4G/5G UNTER ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN	97
TABELLE 55: UNTERSCHIEDE DER RELATIVEN HÄUFIGKEIT DER MTHFR C677T- UND A1298C-MUTATION UND DER COMPOUND-HETEROZYGOTIE ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN PAH-PATIENTEN	100
TABELLE 56: UNTERSCHIEDE DER RELATIVEN HÄUFIGKEITEN DER MUTATIONEN PROTHROMBIN G2010A, FVL UND PAI 4G/5G ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN PAH-PATIENTEN.....	102
TABELLE 57: UNTERSCHIEDE DER RELATIVEN HÄUFIGKEITEN FÜR MTHFR C677T, A1298C UND COMPOUND-MTHFR ZWISCHEN ZENTRALER UND PERIPHERER GEFÄßVERTEILUNG	105
TABELLE 58: UNTERSCHIEDE DER RELATIVEN HÄUFIGKEITEN FÜR FVL, PROTHROMBIN G2010A UND PAI 4G/5G ZWISCHEN ZENTRALER UND PERIPHERER VERTEILUNG DER GEFÄßLÄSIONEN	108
TABELLE 59: PRÄVALENZ VON MTHFR C677T UND MTHFR A1298C IN DEUTSCHLAND UND DEN NIEDERLANDEN	110
TABELLE 60: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN HPAH UND IPAH BEZÜGLICH MTHFR C677T UNTER DEN PATIENTEN AUS AMSTERDAM.....	112
TABELLE 61: PRÄVALENZ DER FVL-MUTATION IN DEUTSCHLAND UND DEN NIEDERLANDEN.....	115
TABELLE 62: PRÄVALENZ VON PROTHROMBIN G2010A IN DEUTSCHLAND UND DEN NIEDERLANDEN.....	116
TABELLE 63: PRÄVALENZ VON PAI 4G/5G IN DEUTSCHLAND UND DEN NIEDERLANDEN.....	116

7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: EINFLUSS DES FV AUF DIE THROMBINBILDUNG	33
ABBILDUNG 2: EINFLÜSSE DES THROMBIN AUF DIE GERINNUNG	35
ABBILDUNG 3: FUNKTION DER MTHFR.....	36
ABBILDUNG 4: ROLLE DES PAI-1.....	39
ABBILDUNG 5: DNS-EXTRAKTION.....	43
ABBILDUNG 6: PYROSEQUENZIERUNG	50
ABBILDUNG 7: VORBEREITUNG DER SEQUENZIERUNG MITTELS VAKUUMGERÄT	51
ABBILDUNG 8: FRET DURCH HYBRIDISIERUNG DER PAARIGEN SONDEN	56
ABBILDUNG 9: SCHMELZKURVENVERLAUF AM BEISPIEL DER PROTHROMBINMUTATION	57
ABBILDUNG 10: EINTEILUNG DER PATIENTEN	67
ABBILDUNG 11: ZUSAMMENSETZUNG DER STUDIENPOPULATION	68
ABBILDUNG 12: ZUSAMMENSETZUNG DER PAH-PATIENTEN AUS AMSTERDAM UND HOMBURG	72
ABBILDUNG 13: VERTEILUNG DER MTHFR C677T-MUTATION UNTER DEN PAH-UND CTEPH-PATIENTEN	73
ABBILDUNG 14: VERTEILUNG DER MTHFR A1298C-MUTATION UNTER DEN PAH-UND CTEPH-PATIENTEN	73
ABBILDUNG 15: VERTEILUNG DER COMPOUND-HETEROZYGOTIE ZWISCHEN PAH UND CTEPH.....	74
ABBILDUNG 16: VERTEILUNG DER MTHFR C677T- UND MTHFR A1298C-MUTATION SOWIE DER COMPOUND- HETEROZYGOTIE UNTER DEN ZENTREN	77
ABBILDUNG 17: VERTEILUNG DER FVL-MUTATION UNTER DEN PAH- UND CTEPH-PATIENTEN.....	79
ABBILDUNG 18: VERTEILUNG DER PROTHROMBINMUTATION UNTER DEN PAH- UND CTEPH-PATIENTEN	80
ABBILDUNG 19: VERTEILUNG DER PAI 4G/5G-MUTATION UNTER DEN PAH- UND CTEPH-PATIENTEN	81
ABBILDUNG 20: VERTEILUNG VON FVL, PROTHROMBIN UND PAI 4G/5G ZWISCHEN DEN ZENTREN.....	83
ABBILDUNG 21: LETALITÄT DER CTEPH-PATIENTEN.....	92
ABBILDUNG 22: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN CTEPH-PATIENTEN FÜR MTHFR C677T, A1298C UND DIE COMPOUND-HETEROZYGOTIE	94
ABBILDUNG 23: VERTEILUNG DER FVL-UND PROTHROMBINMUTATION G2010A ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN CTEPH-PATIENTEN	96
ABBILDUNG 24: VERTEILUNG DER PAI 4G/5G-MUTATION ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN CTEPH- PATIENTEN	97
ABBILDUNG 25: LETALITÄT DER PAH-PATIENTEN	98
ABBILDUNG 26: VERTEILUNG DER MTHFR-MUTATIONEN ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN PAH- PATIENTEN.....	99
ABBILDUNG 27: VERTEILUNG DER FVL- UND PROTHROMBINMUTATION ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN PAH-PATIENTEN.....	101
ABBILDUNG 28: VERTEILUNG DER PAI 4G/5G-MUTATION ZWISCHEN ÜBERLEBENDEN UND VERSTORBENEN PAH- PATIENTEN.....	102
ABBILDUNG 29: HÄUFIGKEIT DER MTHFR C677T-MUTATION BEI CTEPH-PATIENTEN MIT ZENTRALEM UND PERIPHEREM VERTEILUNGSMUSTER DER GEFÄßVERÄNDERUNGEN.....	103
ABBILDUNG 30: VERTEILUNG DER MTHFR A1298C-MUTATION BEI CTEPH-PATIENTEN MIT ZENTRALEM UND PERIPHEREM VERTEILUNGSMUSTER DER GEFÄßVERÄNDERUNGEN.....	104
ABBILDUNG 31: VERTEILUNG DER COMPOUND-HETEROZYGOTIE BEI CTEPH-PATIENTEN MIT ZENTRALEM UND PERIPHEREM VERTEILUNGSMUSTER DER GEFÄßVERÄNDERUNGEN.....	105
ABBILDUNG 32: HÄUFIGKEIT DER FVL-MUTATION BEI CTEPH-PATIENTEN MIT ZENTRALEM UND PERIPHEREM VERTEILUNGSMUSTER DER GEFÄßVERÄNDERUNGEN.....	106
ABBILDUNG 33: HÄUFIGKEIT DER PROTHROMBINMUTATION BEI CTEPH-PATIENTEN MIT ZENTRALEM UND PERIPHEREM VERTEILUNGSMUSTER DER GEFÄßVERÄNDERUNGEN.....	107
ABBILDUNG 34: VERTEILUNG DER PAI 4G/5G-MUTATION BEI CTEPH-PATIENTEN MIT ZENTRALEM UND PERIPHEREM VERTEILUNGSMUSTER DER GEFÄßVERÄNDERUNGEN.....	108
ABBILDUNG 35: ZUSAMMENSETZUNG DER PAH-PATIENTEN DIESER STUDIE AUS HOMBURG UND AMSTERDAM	112
ABBILDUNG 36: VERGLEICH DER VERTEILUNG VON MTHFR A1298C UND MTHFR C677T ZWISCHEN GESUNDEN REFERENZGRUPPEN IN AMSTERDAM UND DEUTSCHLAND SOWIE DEN CTEPH- UND PAH-PATIENTEN UNSERER STUDIE	120
ABBILDUNG 37: VERTEILUNG DER COMPOUND-HETEROZYGOTIE ZWISCHEN PAH UND CTEPH.....	121

ABBILDUNG 38: VERGLEICH DER VERTEILUNG DER FVL-MUTATION ZWISCHEN GESUNDEN REFERENZGRUPPEN IN DEN NIEDERLANDEN UND DEUTSCHLAND SOWIE DEN CTEPH- UND PAH-PATIENTEN DIESER STUDIE	123
ABBILDUNG 39: EINFLUSS DER RESISTENZ GEGEN APC AUF DIE STABILISIERUNG DES THROMBUS.....	127
ABBILDUNG 40: VERGLEICH DER HÄUFIGKEIT DER PROTHROMBINMUTATION MIT REFERENZWERTEN AUS DER LITERATUR.....	130
ABBILDUNG 41: INTIMAVERLETZUNGEN UND FIBRINOLYSE	134
ABBILDUNG 42: VERGLEICH DER HÄUFIGKEIT DER PAI-1 4G/5G-MUTATION MIT REFERENZWERTEN AUS DER LITERATUR.....	136
ABBILDUNG 43: EINFLUSS DES TAFI-SYSTEMS AUF DIE FIBRINOLYSE	144

8 Abkürzungsverzeichnis

6-MWD		Elektrokardiogramm.....	21
6-Minuten-Gehstrecke	29	ERA	
a		Endothelin-Rezeptor-Antagonisten	25
Arteriell.....	16	FEV1	
APC		Einsekundenkapazität.....	64
Aktiviertes Protein C.....	32	FRET	
APS		Fluoreszenzresonanz-Energietransfer	56
Adenosin-5'-Phosphosulfat	49	FV	
ARDS		Gerinnungsfaktors V	32
Acute Respiratory Distress Syndrome	127	FVa	
ATP		Aktivierter Faktor V	33
Adenosin-5'-Triphosphat.....	50	FX	
AWMF		Faktor X.....	33
Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen		GGT	
Medizinischen Fachgesellschaften.....	117	Gamma-Glutamyl-Transferase	41
BMPR2		HIV	
Bone Morphogenetic Proteine Receptor type 2		Humanes Immunodefizienzvirus	22
.....	23	HPAH	
BPA		Hereditäre pulmonal arterielle Hypertonie	22
Ballonangioplastie.....	29	IPAH	
bzw		Idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie	22
Beziehungsweise	36	k	
CCD		Kapillär	16
Charge Coupled Device.....	50	LDL	
cGMP		Low Density Lipoprotein	37
Guanosinmonophosphat	25	LVEDP	
CHEST-1		Linksventrikulärer enddiastolischer Druck.....	17
Chronic Thromboembolic Pulmonary		LV-EF	
Hypertension Soluble Guanylate Cyclase-		Linksventrikuläre Ejektionsfraktion	70
Stimulator Trial 1	29	MERIT-1	
CT		Macitentan for the treatment of inoperable	
Computertomographie.....	22	chronic thromboembolic pulmonary	
CTEPH		hypertension.....	29
Chronisch thrombembolische pulmonale		Mittelwert	
Hypertonie	18	M.....	66
CW		mmHg	
Continuous wave.....	63	Millimeter Quecksilbersäule	16
d		mPAP	
diastolisch	70	Pulmonal arterieller Mitteldruck.....	16
DNS		MTHF	
Desoxyribonukleinsäure	43	5-Methyl-Tetrahydrofolat	36
dPAP		MTHFR	
Diastolischer pulmonal arterieller Druck	61	Methylentetrahydrofolatreduktase.....	36
DPG		N	
Diastolischer pulmonal arterieller Druckgradient		Stichprobenumfang	70
.....	61	NO	
E		Stickstoffmonoxid.....	24
Mitralfüllungsgeschwindigkeit.....	64	NT-proBNP	
E'		N terminales pro brain natriuretic peptide	41
Geschwindigkeit des Mitralklappenannulus im		NYHA	
Gewebedoppler.....	64	New York Heart Association.....	18
EF		OR	
Ejektionsfraktion	64	Chancenverhältnis.....	23
EKG		PAH	

Abkürzungsverzeichnis

Pulmonal arterielle Hypertonie..... 18	Systolischer rechtsventrikulärer Druck 63
PAI	s
Plasminogen activating inhibitor..... 38	systolisch..... 70
PAOP	SD
Pulmonal arterieller Verschlussdruck..... 16	Standardabweichung..... 66
PBS	sPAP
Phosphatgepufferte Salzlösung 43	systolischer pulmonal arterieller Druck 63
PCR	TAFI
Polymerase Chain Reaction 44	Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor 35
PCWP	TAPSE
Pulmonal kapillärer Wedgedruck..... 16	Trikuspidal annular plane systolic excursion... 63
PEA	tPA
Pulmonale Thrombendarterektomie..... 27	Gewebsplasminogenaktivator..... 38
PH	TPG
Pulmonale Hypertonie..... 16	Transpulmonaler Gradient..... 61
PLA	UKS
Druck im linken Vorhof..... 16	Universitätsklinikum des Saarlandes 41
PPI	uPA
Pyrophosphat..... 50	Urokinaseplasminogenaktivator 38
PVOD	v
Pulmonale veno-okklusive Erkrankung..... 20	Venös..... 16
PVR	VC
Pulmonal arterieller Gefäßwiderstand 17	Vitalkapazität 64
RHK	versus
Rechtsherzkatheter 25	vs 95
rpm	WHO-FC
Umdrehungen pro Minute..... 52	Funktionelle Klassen der WHO 18
RR	ΔP
Riva Roci, Blutdruck..... 70	Druckdifferenz..... 16
RVSP	

9 Literaturverzeichnis

1. Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B (1996) Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 335:609-616
2. Adamzik M, Frey UH, Riemann K, Sixt S, Lehmann N, Siffert W, Peters J (2008) Factor V Leiden mutation is associated with improved 30-day survival in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 36:1776-1779
3. Adler G, Parczewski M, Czerska E, Loniewska B, Kaczmarczyk M, Gumprecht J, Grzeszczak W, Szybinska A, Mossakowska M, Ciechanowicz A (2010) An age-related decrease in factor V Leiden frequency among Polish subjects. *J Appl Genet* 51:337-341
4. Arroliga AC, Sandur S, Jacobsen DW, Tewari S, Mustafa M, Mascha EJ, Robinson K (2003) Association between hyperhomocysteinemia and primary pulmonary hypertension. *Respiratory Medicine* 97:825-829
5. Atisha-Fregoso Y, Espejo-Poox E, Carrillo-Maravilla E, Pulido-Ramirez AL, Lugo Baruqui D, Hernandez-Molina G, Cabral AR (2017) Perioperative management of patients with antiphospholipid syndrome: a single-center experience. *Rheumatol Int* 37:1159-1164
6. ATS (2002) ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 166:111-117
7. Bajzar L, Kalafatis M, Simioni P, Tracy PB (1996) An Antifibrinolytic Mechanism Describing the Prothrombotic Effect Associated with Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 271:22949-22952
8. Bar-Shavit R, Benezra M, Eldor A, Hy-Am E, Fenton JW, 2nd, Wilner GD, Vlodavsky I (1990) Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul* 1:453-463
9. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64-67
10. Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, Rosendaal FR (2007) No association between the common MTHFR 677C->T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. *Arch Intern Med* 167:497-501
11. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW (2002) Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci* 17:56-61
12. Björgell O, Nilsson PE, Nilsson JA, Svensson PJ (2000) Location and extent of deep vein thrombosis in patients with and without FV:R 506Q mutation. *Thromb Haemost* 83:648-651
13. Bochenek ML, Rosinus NS, Lankeit M, Hobohm L, Bremmer F, Schutz E, Klok FA, Horke S, Wiedenroth CB, Munzel T, Lang IM, Mayer E, Konstantinides S, Schafer K (2017) From thrombosis to fibrosis in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 117:769-783
14. Bonderman D, Turecek PL, Jakowitsch J, Weltermann A, Adlbrecht C, Schneider B, Kneussl M, Rubin LJ, Kyrle PA, Klepetko W, Maurer G, Lang IM (2003) High prevalence of elevated clotting factor VIII in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 90:372-376
15. Bonderman D, Skoro-Sajer N, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Dunkler D, Taghavi S, Klepetko W, Kneussl M, Lang IM (2007) Predictors of outcome in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 115:2153-2158
16. Bosler D, Mattson J, Crisan D (2006) Phenotypic Heterogeneity in Patients with Homozygous Prothrombin 20210AA Genotype. A paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 8:420-425
17. Bounameaux H (2000) Factor V Leiden paradox: risk of deepvein thrombosis but not of pulmonary embolism. *The Lancet* 356:182-183
18. Brass LB (2003) Thrombin and Platelet Activation. *CHEST* 124:18S-25S

19. Bunclark K, Newnham M, Chiu YD, Ruggiero A, Villar SS, Cannon JE, Coghlan G, Corris PA, Howard L, Jenkins D, Johnson M, Kiely DG, Ng C, Screatton N, Sheares K, Taboada D, Tsui S, Wort SJ, Pepke-Zaba J, Toshner M (2020) A multicenter study of anticoagulation in operable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Thromb Haemost* 18:114-122
20. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D, Gerard RD (1997) Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* 96:3180-3191
21. Castoldi E, Brugge JM, Nicolaes GA, Girelli D, Tans G, Rosing J (2004) Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations. *Blood* 103:4173-4179
22. Caunt M, Huang YQ, Brooks PC, Karpatkin S (2003) Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Thromb Haemost* 1:2097-2102
23. Cesarman-Maus G, Hajjar KA (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 129:307-321
24. Coen D, Zadro R, Honović L, Banfić L, Stavljenić Rukavina A (2001) Prevalence and association of the factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy subjects and patients with venous thromboembolism. *Croat Med J* 42:488-492
25. Coghlan JG, Galiè N, Barberà JA, Frost AE, Ghofrani HA, Hoeper MM, Kuwana M, McLaughlin VV, Peacock AJ, Simonneau G, Vachiéry JL, Blair C, Gillies H, Miller KL, Harris JHN, Langley J, Rubin LJ (2017) Initial combination therapy with ambrisentan and tadalafil in connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension (CTD-PAH): subgroup analysis from the AMBITION trial. *Ann Rheum Dis* 76:1219-1227
26. Corsico AG, D'Armini AM, Cerveri I, Klersy C, Ansaldo E, Niniano R, Gatto E, Monterosso C, Morsolini M, Nicolardi S, Tramontin C, Pozzi E, Vigano M (2008) Long-term outcome after pulmonary endarterectomy. *Am J Respir Crit Care Med* 178:419-424
27. D'Agnillo P, Levine JS, Subang R, Rauch J (2003) Prothrombin binds to the surface of apoptotic, but not viable, cells and serves as a target of lupus anticoagulant autoantibodies. *J Immunol* 170:3408-3422
28. 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* 115:343-349
29. Dahlback B (1995) Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 85:607-614
30. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson P (1993) Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1004-1008
31. de Bree A, Verschuren WM, Bjorke-Monsen AL, van der Put NM, Heil SG, Trijbels FJ, Blom HJ (2003a) Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Clin Nutr* 77:687-693
32. de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Nadeau M, Trijbels FJ, Kromhout D (2003b) Coronary heart disease mortality, plasma homocysteine, and B-vitamins: a prospective study. *Atherosclerosis* 166:369-377
33. De Maat MP, Jansen MW, Hille ET, Vos HL, Bloemenkamp KW, Buitendijk S, Helmerhorst FM, Wladimiroff JW, Bertina RM, De Groot CJ (2004) Preeclampsia and its interaction with common variants in thrombophilia genes. *J Thromb Haemost* 2:1588-1593
34. de Moerloose P, Reber G, Perrier A, Perneger T, Bounameaux H (2000) Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol* 110:125-129
35. de Ridder GG, Lundblad RL, Pizzo SV (2016) Actions of thrombin in the interstitium. *J Thromb Haemost* 14:40-47
36. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G (1999) The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med* 341:801-806

37. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR (1996) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 334:759-762
38. den Heijer M, Willems HP, Blom HJ, Gerrits WB, Cattaneo M, Eichinger S, Rosendaal FR, Bos GM (2007) Homocysteine lowering by B vitamins and the secondary prevention of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Blood* 109:139-144
39. Dentali F, Ageno W, Bozzato S, Malato A, Gianni M, Squizzato A, Prisco D (2012) Role of factor V Leiden or G20210A prothrombin mutation in patients with symptomatic pulmonary embolism and deep vein thrombosis: a meta-analysis of the literature. *J Thromb Haemost* 10:732-737
40. Dimopoulos K, Kempny A, Alonso-Gonzalez R, Wort SJ (2015) Percutaneous transluminal pulmonary angioplasty for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: Challenges and future directions. *Int J Cardiol* 187:401-403
41. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR (1998) Interaction of Coagulation Defects and Cardiovascular Risk Factors. *Circulation* 97:1037-1041
42. Doggen CJM, Bertina RM, Cats V. M, Reitsma PH, Rosendaal FR (1999) The 4G/5G Polymorphism in the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Is not Associated with Myocardial Infarction. *Thromb Haemost* 82:115-120
43. Donahue BS (2004) Factor V Leiden and perioperative risk. *Anesth Analg* 98:1623-1634, table of contents
44. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL (2001) Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost* 86:809-816
45. Ende-Verhaar YM, Cannegieter SC, Vonk Noordegraaf A, Delcroix M, Pruszczyk P, Mairuhu AT, Huisman MV, Klok FA (2017) Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism: a contemporary view of the published literature. *Eur Respir J* 49
46. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A (1995) Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1851-1855
47. Esmon CT, Jackson CM (1974) The Conversion of Prothrombin and Thrombin. *The Journal of Biological Chemistry* 249:7782-7790
48. Esmon NL, Esmon CT (1988) Protein C and the Endothelium. *Seminars in thrombosis and Hemostasis* 14
49. Feinstein JA, Goldhaber SZ, Lock JE, Ferndandes SM, Landzberg MJ (2001) Balloon pulmonary angioplasty for treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 103:10-13
50. Fijalkowska A, Kurzyna M, Torbicki A, Szewczyk G, Florczyk M, Pruszczyk P, Szturmowicz M (2006) Serum N-terminal brain natriuretic peptide as a prognostic parameter in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 129:1313-1321
51. Fischer M, Baessler A, Holmer SR, Muscholl M, Brockel U, Luchner A, Hense HW, Doring A, Riegger G, Schunkert H (2003) Epidemiologie der linksventrikulären systolischen Dysfunktion in der Allgemeinbevölkerung Deutschlands. *Z Kardiol* 92:294-302
52. Fishman P (1998) Etiologie and Pathogenesis of primary pulmonary Hypertension. *CHEST* 114:242
53. Fishman P (1999) Aminorex to Fen/Phen An Epidemic Foretold. *Circulation* 99
54. Flaujac C, Conard J, Horellou MH, Le Flem L, Samama M (2007) Atypical mutations of the prothrombin gene at positions 20209 and 20218, and a novel mutation at position 20219. Report on 10 patients *Journal of Thrombosis and Haemostasis*
55. Follath F, Burkhardt F, Schweizer W (1971) Drug-induced Pulmonary Hypertension? *British Medical Journal*, 1:265-266
56. Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hemnes AR, Borlaug BA, Chamera E, Corretti MC, Champion HC, Abraham TP, Girgis RE, Hassoun PM (2006) Tricuspid annular

- displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1034-1041
57. Frances F, Corella D, Sorli JV, Guillen M, Gonzalez JI, Portoles O (2005) Validating a rapid method for detecting common polymorphisms in the APOA5 gene by melting curve analysis using LightTyper. *Clin Chem* 51:1279-1282
58. Freed DH, Thomson BM, Berman M, Tsui SS, Dunning J, Sheares KK, Pepke-Zaba J, Jenkins DP (2011) Survival after pulmonary thromboendarterectomy: effect of residual pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 141:383-387
59. Friedman AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IH (2001) The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol* 12:2181-2189
60. Fukumitsu M, Suzuki K (2019) Mesenchymal stem/stromal cell therapy for pulmonary arterial hypertension: Comprehensive review of preclinical studies. *J Cardiol* 74:304-312
61. Gaine SP, Rubin LJ (1998) Primary pulmonary hypertension. *the lancet* 352:719-725
62. 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, Guidelines ESCcFP (2009) 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* 30:2493-2537
63. Galie N, Humbert M, J.L. V, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Begaud M, Ghofrani A, Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancelotti P, Matucci M, McDonagh T, Perard L, Trindade P, Zompatori M, Hoeper M (2015) Diagnostik und Therapie der pulmonalen Hypertonie. *ESC Pocket Guidelines*
64. Galiè 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* 353:2148-2157
65. Galiè N, Kim NH (2006) Pulmonary microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 3:571-576
66. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Sanchez M, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard L, Trindade P, Zompatori M, Hoeper M (2015) 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal* 46:903-975
67. Gall H, Felix JF, Schneck FK, Milger K, Sommer N, Voswinckel R, Franco OH, Hofman A, Schermuly RT, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA (2017) The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: Survival in pulmonary hypertension subgroups. *J Heart Lung Transplant* 36:957-967
68. Gelpi E, Paz MPdl, Terracini B, Abaitua I, Cámara AnGmdl, Edwin M. Kilbourne CL, Bénoit Nemery RMP, Soldevilla L, Tarkowski S (2002) The Spanish Toxic Oil Syndrome 20 Years after Its Onset- A Multidisciplinary Review of Scientific Knowledge. *Environmental Health Perspectives* 110:457-464
69. Gerlach H, Hach-Wunderle V, Konstantinides S, Noppeney T, Riess H, Schellong S, Wildberger J (2015) Diagnostik und Therapie der Venenthrombose und der Lungenembolie. *AWMF Leitlinien-Register* 065/002
70. Ghofrani H-A, Simonneau G, D'Armini AM, Fedullo P, Howard LS, Jaïs X, Jenkins DP, Jing Z-C, Madani MM, Martin N, Mayer E, Papadakis K, Richard D, Kim NH, Lang I, Kähler C, Delcroix M, Bshouty Z, Varela PS, Jing Z-C, Yang Y, Liu J, Zhang G, Zhang N, Mi Y, Zhu X, Jansa P, Jaïs X, Prévot G, Bouvaist H, Sanchez O, Grimminger F, Held M, Wilkens H, Rosenkranz S, Grünig E, Karlócai K, Temesvári A, Edes I, Aidietienė S, Miliauskas S, Zamudio TRP, Sanchez CJ, Noordegraaf AV, Lewczuk J, Podolec P, Kasprzak J, Mularek-Kubzdela T, Grzywna R, Dheda K, Moiseeva O, Chernyavskiy A, Shipulin V, Barbarash O, Martynyuk T, Kim H-K, Park J-B, Lee JS, Speich R, Ulrich S, Aubert J-D, Phrommintikul A, Jaimchariyatam N, Sompradeekul S, Onen ZP, Okumus G, Solovey L, Gavrysyuk V, Howard L, Pepke-Zaba J, Condliffe R, McConnell J, Kerr K, Nguyen LH, Pham NV (2017) Macitentan for the treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension

- (MERIT-1): results from the multicentre, phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The Lancet Respiratory Medicine* 5:785-794
71. 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, Group C-S (2013) Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 369:319-329
 72. Ghosh AK, Vaughan DE (2012) PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 227:493-507
 73. 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* 33:785-792
 74. Grunig E, Ley S (2008) Echocardiography and magnetic resonance imaging in patients suffering from pulmonary arterial hypertension. *Dtsch Med Wochenschr* 133 Suppl 6:S173-175
 75. Grünig E (2009) Antikoagulation bei pulmonaler arterieller Hypertonie. *Der Pneumologe* 6:390-398
 76. Harpel PC, Zhang X, Borth W (1996) Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr* 126:1285s-1289s
 77. Heijmans BT, Westendorp RG, Slagboom PE (2000) Common gene variants, mortality and extreme longevity in humans. *Exp Gerontol* 35:865-877
 78. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd (2000) Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med* 160:809-815
 79. Heit JA (2015) Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol* 12:464-474
 80. Held M, Grünig M, Holl R, Walter F, Schäfers HJ, Graeter T, Wilkens H, Jany B (2014) Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie: Latenz bis zur Diagnosesicherung und klinischer Zustand bei Diagnosestellung. *Dtsch Med Wochenschr* 139:1647-1652
 81. Held M, Rosenkranz S (2015) Pulmonale Hypertonie bei Lungen- und Linksherzerkrankungen. *Der Pneumologe* 12:410-416
 82. Heldebrandt CM, Butkowski RJ, Bajaj SP, Mann KG (1973) The Activation of Prothrombin. *The Journal of Biological Chemistry* 248:7149-7163
 83. Hertfelder HJ, Gnida C, Pötsch B, Hanfland P (2004) MTHFR-Polymorphismus C677T; Sinn und Unsinn der Diagnostik. *Dtsch Arztebl* 46:3101-3105
 84. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluit C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG (2003) 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke* 34:2822-2828
 85. Hoeper MM, Maier R, Tongers J, Niedermeyer J, Hohlfeld JM, Hamm M, Fabel H (1999) Determination of cardiac output by the Fick method, thermodilution, and acetylene rebreathing in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 160:535-541
 86. Hoeper MM, Kramm T, Wilkens H, Schulze C, Schafers HJ, Welte T, Mayer E (2005) Bosentan therapy for inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest* 128:2363-2367
 87. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB (2013a) Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 62:D42-50
 88. Hoeper MM, Huscher D, Ghofrani A, Delcroix M, Distler O, Schweiger C, Grunig E, Staehler G, Rosenkranz S, Halank M, Held M, Grohé C, Lange T, Behr J, Klose H, Wilkens H, Filusch A, Germann M, Ewert R, Seyfarth HJ, Olsson K, Opitz C, Gaine S, Vizza D, Vonk-Noordegraaf A, Kaemmerer H, Simon J, Gibbs R, Pittrow D (2013b) Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: Results from the COMPERA registry. *International Journal of Cardiology* 168:871-880
 89. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing Z-C, Gibbs JSR (2016) A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine* 4:306-322
 90. Holland AE, Spruit MA, Troosters T, Puhan MA, Pepin V, Saey D, McCormack MC, Carlin BW, Sciurba FC, Pitta F, Wanger J, MacIntyre N, Kaminsky DA, Culver BH, Revill SM, Hernandez NA, Andrianopoulos V, Camillo CA, Mitchell KE, Lee AL, Hill CJ, Singh SJ

- (2014) An official European Respiratory Society/American Thoracic Society technical standard: field walking tests in chronic respiratory disease. *Eur Respir J* 44:1428-1446
91. Hooper WC, De Staercke C (2002) The relationship between FV Leiden and pulmonary embolism. *Respir Res* 3:8
92. Huber K, Beckmann R, Frank H, Kneussl M, Mlczoch J, Binder BR (1994) Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 150:929-933
93. 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, Simonneau G (2006) Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 173:1023-1030
94. Huq MA, Takeyama N, Harada M, Miki Y, Takeuchi A, Inoue S, Nakagawa T, Kanou H, Hirakawa A, Noguchi H (2012) 4G/5G Polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with multiple organ dysfunction in critically ill patients. *Acta Haematol* 127:72-80
95. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Ivanov Y, Stoyanova A, Ivanov I, Pavlov P, Glogovska P, Nojarov V (2008) Impact of thrombophilic genetic factors on pulmonary embolism: early onset and recurrent incidences. *Lung* 186:27-36
96. Iwaki T, Urano T, Umemura K (2012) PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *Br J Haematol* 157:291-298
97. Kataoka M, Inami T, Hayashida K, Shimura N, Ishiguro H, Abe T, Tamura Y, Ando M, Fukuda K, Yoshino H, Satoh T (2012) Percutaneous transluminal pulmonary angioplasty for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ Cardiovasc Interv* 5:756-762
98. Katta S, Vadapalli S, Sastry BK, Nallari P (2008) t-plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Indian J Hum Genet* 14:37-40
99. Kawakami T, Kanazawa H, Satoh T, Ieda M, Ieda Y, Kimura K, Mochizuki H, Shimada T, Yokoyama C, Ogawa S, Tanabe T, Fukuda K (2007) AAV-PGIS gene transfer improves hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 363:656-661
100. Khabour OF, Abdelhalim ES, Abu-Wardeh A (2009) Association between SOD2 T-9C and MTHFR C677T polymorphisms and longevity: a study in Jordanian population. *BMC Geriatr* 9:57
101. 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:D92-99
102. Klepetko W, Mayer E, Sandoval J, Trulock EP, Vachery JL, Darteville P, Pepke-Zaba J, Jamieson SW, Lang I, Corris P (2004) Interventional and surgical modalities of treatment for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:73S-80S
103. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG (2002) MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Jama* 288:2023-2031
104. Kopec G (2019) Electrocardiography in pulmonary hypertension. *Pol Arch Intern Med* 129:440-441
105. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM (1993) Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 342:1503-1506
106. Kovac M, Mitic G, Mikovic Z, Antonijevic N, Djordjevic V, Mikovic D, Mandic V, Rakicevics L, Radojkovic D (2010) Type and Location of Venous Thromboembolism in Carriers of Factor V Leiden or Prothrombin G20210A Mutation Versus Patients With No Mutation. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 16
107. Kuipers S, Schreijer AJ, Cannegieter SC, Buller HR, Rosendaal FR, Middeldorp S (2007) Travel and venous thrombosis: a systematic review. *J Intern Med* 262:615-634
108. Kuismanen K, Savontaus ML, Kozlov A, Vuorio AF, Sajantila A (1999) Coagulation factor V Leiden mutation in sudden fatal pulmonary embolism and in a general northern European population sample. *Forensic Sci Int* 106:71-75

109. Kurzweily D, Knop S, Guenther M, Loeffler J, Korfel A, Thiel E, Hebart H, Simon M, Weller M, Linnebank M, Herrlinger U (2010) Genetic variants of folate and methionine metabolism and PCNSL incidence in a German patient population. *J Neurooncol* 100:187-192
110. Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ, Pals G, ten Kate LP, de Vries JI, Kostense PJ, Aarnoudse JG, Dekker GA (2001) Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184:394-402
111. Laird PW, Jaenisch R (1994) DNA methylation and cancer. *Human Molecular Genetics* 3:1487-1495
112. Lane DA, Philippou H, Huntington JA (2005) Directing thrombin. *Blood* 106:2605-2612
113. Lang IM, Marsh JJ, Olman MA, Moser KM, Loskutoff DJ, Schleef RR (1994) Expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in chronic pulmonary thromboemboli. *Circulation* 89:2715-2721
114. Lang IM, Campean IA, Sadushi-Kolici R, Badr-Eslam R, Gerges C, Skoro-Sajer N (2021) Chronic Thromboembolic Disease and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Clin Chest Med* 42:81-90
115. Langleben D, Barst RJ, Badesch D, Groves BM, Tapson VF, Murali S, Bourge RC, Ettinger N, Shalit E, Clayton LM, Jobsis MM, Blackburn SD, Crow JW, Stewart DJ, Long W (1999) Continuous infusion of epoprostenol improves the net balance between pulmonary endothelin-1 clearance and release in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 99:3266-3271
116. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD (1996) Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 98:24-29
117. Lentz SR (1998) Mechanisms of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *Current Opinion in Hematology*
118. Leschke M, Wadlich A, Waldenmaier S, Faehling M (2009) Diagnostik der pulmonalen Hypertonie. *Internist (Berl)* 50:1086, 1088-1090, 1092-1100
119. Liang Z, Jiang W, Ouyang M, Yang K (2015) PAI-1 4G/5G polymorphism and coronary artery disease risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8:2097-2107
120. Lijfering WM, Rosendaal FR, Cannegieter SC (2010) Risk factors for venous thrombosis - current understanding from an epidemiological point of view. *Br J Haematol* 149:824-833
121. Lindner J, Jansa P, Salaj P, Kunstýr J, Grus T, Maruna P, Bláha J, Rubes D, Ambroz D, Mlejnsý F, Linhart A (2009) Thrombophilia and pulmonary endarterectomy. *Prague Med Rep* 110:51-59
122. Lottermoser K, Düsing R, Ervens P, Koch B, Brüning T, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y (2001) The plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism is not associated with longevity: a study in octogenarians. *J Mol Med (Berl)* 79:289-293
123. Lücke E, Schmeißer A, Schreiber J (2019) Pulmonary Hypertension: Diagnostics, Classification and Therapy. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 54:320-333
124. Lucotte G, Mercier G (2001) Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells Mol Dis* 27:362-367
125. Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R (1996) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 94:2410-2416
126. Macaulay TE, Covell MB, Pogue KT (2016) An Update on the Management of Pulmonary Arterial Hypertension and the Pharmacist's Role. *J Pharm Pract* 29:67-76
127. Machado RD, Southgate L, Eichstaedt CA, Aldred MA, Austin ED, Best DH, Chung WK, Benjamin N, Elliott CG, Eyries M, Fischer C, Gräf S, Hinderhofer K, Humbert M, Keiles SB, Loyd JE, Morrell NW, Newman JH, Soubrier F, Trembath RC, Viales RR, Grünig E (2015) Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Hum Mutat* 36:1113-1127
128. Madani MM, Auger WR, Pretorius V, Sakakibara N, Kerr KM, Kim NH, Fedullo PF, Jamieson SW (2012) Pulmonary endarterectomy: recent changes in a single institution's experience of more than 2,700 patients. *Ann Thorac Surg* 94:97-103; discussion 103

129. Manten B, Westendorp RG, Koster T, Reitsma PH, Rosendaal FR (1996) Risk factor profiles in patients with different clinical manifestations of venous thromboembolism: a focus on the factor V Leiden mutation. *Thromb Haemost* 76:510-513
130. Martin I, Humbert M, Marfaing-Koka A, Capron F, Wolf M, Meyer D, Simonneau G, Angles-Cano E (2002) Plasminogen activation by blood monocytes and alveolar macrophages in primary pulmonary hypertension. *Blood Coagul Fibrinolysis* 13:417-422
131. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM (1998) High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 338:1793-1797
132. Martinez C, Wallenhorst C, Teal S, Cohen AT, Peacock AJ (2018) Incidence and risk factors of chronic thromboembolic pulmonary hypertension following venous thromboembolism, a population-based cohort study in England. *Pulm Circ* 8:2045894018791358
133. Mayer E, Jenkins D, Lindner J, D'Armini A, Kloek J, Meyns B, Ilkjaer LB, Klepetko W, Delcroix M, Lang I, Pepke-Zaba J, Simonneau G, Dartevielle P (2011) Surgical management and outcome of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: results from an international prospective registry. *J Thorac Cardiovasc Surg* 141:702-710
134. McCully KS (1996) Homocysteine and vascular disease. *Nature Medicine* 2:386-389
135. McLaughlin VV, Jansa P, Nielsen-Kudsk JE, Halank M, Simonneau G, Grunig E, Ulrich S, Rosenkranz S, Gomez Sanchez MA, Pulido T, Pepke-Zaba J, Barbera JA, Hoeper MM, Vachiery JL, Lang I, Carvalho F, Meier C, Mueller K, Nikkho S, D'Armini AM (2017) Riociguat in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: results from an early access study. *BMC Pulm Med* 17:216
136. Meeks SL, Abshire TC (2008) Abnormalities of prothrombin: a review of the pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Haemophilia* 14:1159-1163
137. Miner SE, Evrovski J, Cole DE (1997) Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 30:189-201
138. Miniati M, Fiorillo C, Becatti M, Monti S, Bottai M, Marini C, Grifoni E, Formichi B, Bauleo C, Arcangeli C, Poli D, Nassi PA, Abbate R, Prisco D (2010) Fibrin resistance to lysis in patients with pulmonary hypertension other than thromboembolic. *Am J Respir Crit Care Med* 181:992-996
139. Montenarh M (2007) Einfluss genetischer Polymorphismen des Homocysteinestoffwechsels auf cerebrovaskuläre Erkrankungen.
140. Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, Elliott CG, Nichols WC, Soubrier F, Trembath RC, Loyd JE (2019) Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 53
141. Morris TA, Marsh JJ, Chiles PG, Magana MM, Liang NC, Soler X, Desantis DJ, Ngo D, Woods VL, Jr. (2009) High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood* 114:1929-1936
142. Moser KM, Auger WR, Fedullo PF (1990) Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 81:1735-1743
143. Moser KM, Bloor CM (1993) Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest* 103:685-692
144. Motte S, McEntee K, Naeije R (2006) Endothelin receptor antagonists. *Pharmacol Ther* 110:386-414
145. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad PR, Cannegieter SC, Blom HJ, Rosendaal FR, Hammerstrøm J (2008) Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population--results from the HUNT 2 study. *Br J Haematol* 141:529-535
146. Nefic H, Mackic-Djurovic M, Eminovic I (2018) The Frequency of the 677C>T and 1298A>C Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in the Population. *Med Arch* 72:164-169
147. Nesheim M (2003) Thrombin and Fibrinolysis. *Chest* 124:33S-39S
148. Nowak-Gottl U, Strater R, Kosch A, von Eckardstein A, Schobess R, Luigs P, Nabel P, Vielhaber H, Kurnik K, Junker R (2001) The plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 promoter 4G/4G genotype is not associated with ischemic stroke in a population of German children. *Childhood Stroke Study Group. Eur J Haematol* 66:57-62

149. Ocal IT, Sadeghi A, Press RD (1997) Risk of Venous Thrombosis in Carriers of a Common Mutation in the Homocysteine Regulatory Enzyme Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Mol Diagn* 2:61-68
150. Oguzulgen IK, Ekim NN, Akar N, Demirel K, Kitapci M (2002) The role of thrombophilic risk factors in the severity of pulmonary thromboembolism. *Eur Respir J* 19:709-711
151. Olschewski H, Olschewski A (2011) Pulmonale Hypertonie, Uni-Med).
152. Olsson KM, Wiedenroth CB, Kamp JC, Breithecker A, Fuge J, Krombach GA, Haas M, Hamm C, Kramm T, Guth S, Ghofrani HA, Hinrichs JB, Cebotari S, Meyer K, Hoepfer MM, Mayer E, Liebetrau C, Meyer BC (2017) Balloon pulmonary angioplasty for inoperable patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: the initial German experience. *Eur Respir J* 49
153. Papamatheakis DG, Mocumbi AOH, Kim NH, Mandel J (2014) Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation* 4:596-611
154. Pengo V, M.D. A, M.D WAL, M.D MHP, Marchiori M.D A, Bruce L. Davidson M.D MPH, Francesca Tiozzo MD, Paolo Albanese MD, Alessandra Biasiolo DS, Cinzia Pegoraro MD, Sabino Iliceto MD, Paolo Prandoni MD, Group ftTPHS (2004) Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism. *the new england journal of medicine* 350:2257-2263
155. Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, Mayer E, Jansa P, Ambroz D, Treacy C, D'Armini AM, Morsolini M, Snijder R, Bresser P, Torbicki A, Kristensen B, Lewczuk J, Simkova I, Barbera JA, de Perrot M, Hoepfer MM, Gaine S, Speich R, Gomez-Sanchez MA, Kovacs G, Hamid AM, Jais X, Simonneau G (2011) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry. *Circulation* 124:1973-1981
156. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. (1989) Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 80:1198-1206
157. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM (1996) A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88:3698-3703
158. Quadery SR, Swift AJ, Billings CG, Thompson AAR, Elliot CA, Hurdman J, Charalampopoulos A, Sabroe I, Armstrong IJ, Hamilton N, Sephton P, Garrad S, Pepke-Zaba J, Jenkins DP, Sreaton N, Rothman AM, Lawrie A, Cleveland T, Thomas S, Rajaram S, Hill C, Davies C, Johns CS, Wild JM, Condliffe R, Kiely DG (2018) The impact of patient choice on survival in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 52
159. Rees DC, Cox M, Clegg JB (1995) World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 346:1133-1134
160. Reuner KH, Ruf A, Grau A, Rickmann H, Stolz E, Juttler E, Druschky KF, Patscheke H (1998) Prothrombin gene G20210-->A transition is a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Stroke* 29:1765-1769
161. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK (1987) Primary pulmonary hypertension A prospective national study. *Annals of Internal Medicine* 107
162. Rich S, Kaufmann E, Levy P (1992) The effect of high doses of Calciumkanalblocker on Survival in primary pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 9:76-81
163. Rich S (1998a) Clinical insights into the pathogenesis of primary pulmonary hypertension. *Chest* 114:237S-241S
164. Rich S (1998b) World Symposium- Primary Pulmonary Hypertension 1998. executive summary
165. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP (1995) Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 332:912-917
166. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP (1997) Arterial and Venous Thrombosis Is Not Associated With the 4G/5G Polymorphism in the Promoter of the Plasminogen Activator Inhibitor Gene in a Large Cohort of US Men. *Circulation* 95:59-62

167. Riedel M, Stanek V, Widimsky J, Prerovsky I (1982) Longterm follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data. *Chest* 81:151-158
168. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363, 365
169. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH (1995) High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden. *Blood* 85:1504-1508
170. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH (1998) Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 79:706-708
171. Rosenkranz S, Preston IR (2015) Right heart catheterisation: best practice and pitfalls in pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* 24:642-652
172. Rosenkranz S, Diller GP, Dumitrescu D, Ewert R, Ghofrani HA, Grunig E, Halank M, Held M, Kaemmerer H, Klose H, Kovacs G, Konstantinides S, Lang IM, Lange TJ, Leuchte H, Mayer E, Olschewski A, Olschewski H, Olsson KM, Opitz C, Schermuly RT, Seeger W, Wilkens H, Hoeper MM (2019) Hemodynamic Definition of Pulmonary Hypertension: Commentary on the Proposed Change by the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *Dtsch Med Wochenschr* 144:1367-1372
173. Rozen R (2000) Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin Thromb Hemost* 26:255-261
174. Ruan CH, Dixon RA, Willerson JT, Ruan KH (2010) Prostacyclin therapy for pulmonary arterial hypertension. *Tex Heart Inst J* 37:391-399
175. Sanada TJ, Tanabe N, Ishibashi-Ueda H, Ishida K, Naito A, Sakao S, Suda R, Kasai H, Nishimura R, Sugiura T, Shigeta A, Taniguchi Y, Masuda M, Tatsumi K (2019) Involvement of pulmonary arteriopathy in the development and severity of reperfusion pulmonary edema after pulmonary endarterectomy. *Pulm Circ* 9:2045894019846439
176. Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, Tormene D, Simioni P, Spiezia L, Patrassi G, Girolami A (2003) The PAI-I gene 4G/5G Polymorphism and Deep Vein Thrombosis in Patients with Inherited Thrombophilia. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 9:299-307
177. Schäfers H-J, Seeger W (2001) *Pulmonale Hypertonie*, Blackwell Wissenschaft).
178. Schneider J, Rees D, Liu Y, Clegg J (1998) Worldwide Distribution of a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation. *The American Journal of Human Genetics* 62:1258-1260
179. Schröder W, Koessling M, Wulff K, Wehner M, Herman F (1996) World distribution of factor V Leiden mutation. *The Lancet* 347
180. Serrano M (2007) The 4G/4G PAI-I genotype is associated with elevated plasma PAI-I levels regardless of variables of the metabolic syndrome and smoking status. A population-based study in Spanish population. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9:134-135
181. Seyfarth HJ, Halank M, Wilkens H, Schafers HJ, Ewert R, Riedel M, Schuster E, Pankau H, Hammerschmidt S, Wirtz H (2010) Standard PAH therapy improves long term survival in CTEPH patients. *Clin Res Cardiol* 99:553-556
182. Shaya SA, Westrick RJ, Gross PL (2019) Thrombus stability explains the factor V Leiden paradox: a mouse model. *blood advances* 3
183. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd (1998) Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med* 158:585-593
184. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R (2019) Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53
185. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G (2005) Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 111:3105-3111
186. Sitbon O, Channick R, Chin KM, Frey A, Gaine S, Galie N, Ghofrani HA, Hoeper MM, Lang IM, Preiss R, Rubin LJ, Di Scala L, Tapon V, Adzerikho I, Liu J, Moiseeva O, Zeng X, Simonneau G, McLaughlin VV, Investigators G (2015) Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 373:2522-2533

187. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G (1999) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12810-12815
188. Skoro-Sajer N, Lang I (2018) Clinical Shortcuts- Pulmonale Hypertonie – Update 2018. *Journal für Kardiologie Austrian* 25:142-144
189. Smith P, Heath D, Yacoub M, Madden B, Caslin A, Gosney J (1990) The ultrastructure of plexogenic pulmonary arteriopathy. *J Pathol* 160:111-121
190. Sporn LA, Bunce LA, Francis CW (1995) Cell proliferation on fibrin: modulation by fibrinopeptide cleavage. *Blood* 86:1802-1810
191. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ, Jr. (1997) Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet* 60:229-230
192. Sultan S, Tseng S, Stanziola AA, Hodges T, Saggar R, Saggar R (2018) Pulmonary Hypertension: The Role of Lung Transplantation. *Heart Fail Clin* 14:327-331
193. Suntharalingam J, Goldsmith K, van Marion V, Long L, Treacy CM, Dudbridge F, Toshner MR, Pepke-Zaba J, Eikenboom JC, Morrell NW (2008) Fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism is associated with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 31:736-741
194. Svensson PJ, Dahlback B (1994) Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 330:517-522
195. Tanabe N, Kimura A, Amano S, Okada O, Kasahara Y, Tatsumi K, Takahashi M, Shibata H, Yasunami M, Kuriyama T (2005) Association of clinical features with HLA in chronic pulmonary thromboembolism. *Eur Respir J* 25:131-138
196. Tanabe N, Sugiura T, Tatsumi K (2013) Recent progress in the diagnosis and management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Respir Investig* 51:134-146
197. Thirumaran RK, Gast A, Flohr T, Burwinkel B, Bartram C, Hemminki K, Kumar R (2005) MTHFR genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 106:2590-2591; author reply 2591-2592
198. Tipoe TL, Wu WKK, Chung L, Gong M, Dong M, Liu T, Roeber L, Ho J, Wong MCS, Chan MTV, Tse G, Wu JCY, Wong SH (2018) Plasminogen Activator Inhibitor 1 for Predicting Sepsis Severity and Mortality Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol* 9:1218
199. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME (1994) Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6369-6373
200. Tsantes A, Nikolopoulos GK, Bagos P, Rapti E, Mantzios G, Kapsimali V, Travlou A (2007) Association between the plasminogen activator inhibitor-I 4G/5G polymorphism and venous thrombosis - A meta-analysis. *Thrombosis and Haemostasis* 97:907-913
201. Tunariu N, Gibbs SJ, Win Z, Gin-Sing W, Graham A, Gishen P, Al-Nahhas A (2007) Ventilation-perfusion scintigraphy is more sensitive than multidetector CTPA in detecting chronic thromboembolic pulmonary disease as a treatable cause of pulmonary hypertension. *J Nucl Med* 48:680-684
202. Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF, Jr., Loscalzo J (1997) Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 272:17012-17017
203. Vaccarino L, Forte GI, Palmeri M, Misiano G, Porcellini E, Chiappelli M, Scola L, Caruso C, Licastro F, Lio D (2011) Role of prothrombotic polymorphisms in successful or unsuccessful aging. *Biogerontology* 12:445-450
204. Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL (2016) Factor V Leiden. *Am J Hematol* 91:46-49
205. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62:1044-1051
206. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068

207. Vuylsteke A, Sharples L, Charman G, Kneeshaw J, Tsui S, Dunning J, Wheaton E, Klein A, Arrowsmith J, Hall R, Jenkins D (2011) Circulatory arrest versus cerebral perfusion during pulmonary endarterectomy surgery (PEACOG): a randomised controlled trial. *Lancet* 378:1379-1387
208. Wang S, Cao Q, Wang X, Li B, Tang M, Yuan W, Fang J, Qian J, Qin C, Zhang W (2013) PAI-1 4G/5G polymorphism contributes to cancer susceptibility: evidence from meta-analysis. *PLoS One* 8:e56797
209. Weidemann F, Niemann M, Herrmann S, Ertl G, Stork S (2013) Assessment of diastolic heart failure. Current role of echocardiography. *Herz* 38:18-25
210. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169-172
211. Wilkens H (2010) Diagnostik der pulmonalen Hypertonie. *Der Pneumologe* 7:174-186
212. Wilkens H, Lang I, Behr J, Berghaus T, Grohe C, Guth S, Hoepfer MM, Kramm T, Krüger U, Langer F, Rosenkranz S, Schäfers H-J, Schmidt M, Seyfarth H-J, Wahlers T, Worth H, Mayer E (2011) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): Updated Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2011. *International Journal of Cardiology* 154:S54-S60
213. Wilkens H, Lang I, Blankenburg T, Grohe C, Guth S, Held M, Klepetko W, Konstantinides S, Kramm T, Kruger U, Lankeit M, Schafers HJ, Seyfarth HJ, Mayer E (2014) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension--a position paper. *Dtsch Med Wochenschr* 139:2204-2206
214. Wilkens H, Konstantinides S, Lang IM, Bunck AC, Gerges M, Gerhardt F, Grgic A, Grohe C, Guth S, Held M, Hinrichs JB, Hoepfer MM, Klepetko W, Kramm T, Kruger U, Lankeit M, Meyer BC, Olsson KM, Schafers HJ, Schmidt M, Seyfarth HJ, Ulrich S, Wiedenroth CB, Mayer E (2018) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): Updated Recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018. *Int J Cardiol* 272S:69-78
215. Witt I (1998) APC-Resistenz (Faktor-V-Mutation). *Deutsches Ärzteblatt* 95:2316-2323
216. Wolf M, Boyer-Neumann C, Parent F, Eschwege V, Jaillet H, Meyer D, Simonneau G (2000) Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *European respiratory Journal* 15:
217. Wong CL, Szydlo R, Gibbs S, Laffan M (2010) Hereditary and acquired thrombotic risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood Coagul Fibrinolysis* 21:201-206
218. Wu X, Yang K, Tang X, Sa Y, Zhou R, Liu J, Luo Y, Tang W (2015) Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for preeclampsia: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 32:797-805
219. Xu L, Qin Z, Wang F, Si S, Li L, Lin P, Han X, Cai X, Yang H, Gu Y (2017) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Biosci Rep* 37
220. Yang JX, Pan YY, Zhao YY, Wang XX (2013) Endothelial progenitor cell-based therapy for pulmonary arterial hypertension. *Cell Transplant* 22:1325-1336
221. Yaoita N, Satoh K, Satoh T, Sugimura K, Tatebe S, Yamamoto S, Aoki T, Miura M, Miyata S, Kawamura T, Horiuchi H, Fukumoto Y, Shimokawa H (2016) Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:1293-1301
222. Yaoita N, Satoh K, Satoh T, Shimizu T, Saito S, Sugimura K, Tatebe S, Yamamoto S, Aoki T, Kikuchi N, Kurosawa R, Miyata S, Nagasaki M, Yasuda J, Shimokawa H (2020) Identification of the Novel Variants in Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *J Am Heart Assoc* 9:e015902
223. Zania P, Papaconstantinou M, Flordellis CS, Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE (2008) Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1215-1226
224. Zeng J, Zeng Q (2019) Correlations between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and venous thromboembolism: A meta-analysis of 99 genetic association studies. *Eur J Prev Cardiol* 26:120-134

225. Zhang H, Dong P, Yang K, Liu Z (2014) Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with coronary artery disease risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 7:3777-3788
226. Zighetti ML, Cattaneo M, Falcon CR, Lombardi R, Harari S, Savoritto S, Mannucci PM (1997) Absence of hyperhomocysteinemia in ten patients with primary pulmonary hypertension. *Thrombosis Research* 85:279-282
227. Zivelin A, Rosenberg N, Faier S, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, Horellou MH, Seligsohn U (1998) A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. *Blood* 92:1119-1124
228. Zoller B, Svensson PJ, Dahlback B, Hillarp A (1998) The A20210 allele of the prothrombin gene is frequently associated with the factor V Arg 506 to Gln mutation but not with protein S deficiency in thrombophilic families. *Blood* 91:2210-2211

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Hierzu zählen Frau Prof. Dr. med. Heinrike Wilkens und Herr Prof. Dr. med. Jürgen Geisel für das Überlassen des Themas sowie die Betreuung bei der Durchführung. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Marion Bodis, die mir mit ihrer langjährigen Expertise bei der Arbeit im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso geht mein Dank an die Kollegen des UMC Amsterdam für die gute Zusammenarbeit. Herrn Prof. Dr. Harm Jan Bogaard und Herrn Prof. Dr. Anton Vonk Noordegraaf möchte ich für das Überlassen der Proben, Frau Dr. Liza Botros für das Zusammentragen der zugehörigen klinischen Daten danken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Betreuern Herrn Dr. med Ralf Kaiser und Frau Dr. med. Katharina Grottemeyer für die Hilfe und Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit bedanken, besonders aber für die Geduld, die sie mitgebracht haben.

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.