tirol kliniken
universitätskliniken
innsbruck

MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
INNSBRUCK

ao Univ. Prof. Dr. Judith Löffler-Ragg

Universitätsklinik für Innere Medizin II
Infektiologie, Immunologie,
Rheumatologie,
Pneumologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Günter Weiss
A-6020 Innsbruck, Anichstraße 35
Telefon +43(0)50 504-23251
Telefax +43(0)50504-23317

an die

Initiative Lungenhochdruck
Herrn Dr. G. Fischer
Wilhelmstraße 19 | 1120 Wien

www.lungenhochdruck.at

ZWISCHENBERICHT betreffend Förderung des PAH-Zentrums Innsbruck

Zeitraum Leistungen 2016 und ANSUCHEN für 2017

1. Seit 01. 01.2016 konnte kontinuierlich das **Studiensekretariat** mit einer ausgebildeten Study Nurse besetzt, laufende Studien aktualisiert und Zugang zu 2 neuen PAH-Studien rekrutiert werden: 18588 REPLACE und BEL004 Inovation.

2. Alle PAH Patienten werden systematisch in ein lokales **Register** eingetragen.

3. Parallel dazu wird eine **Biobank** aufgebaut. Pro Woche wird von 2 Patienten eine umfangreiche Biobank inkl. Separierung von Entzündungszellen aufgebaut.

4. Als Schwerpunktforschung wird der Fokus auf **„Lungenhochdruck und Eisen"** gesetzt. Erste klinische Auswertungen wurden bereits beim PneumoUpdate Igls, ERS London und ÖGP Wien gezeigt (siehe anbei). In Abhängigkeit von der Eisenmangeldefinition können wir in unserer Patientenkohorte bis zu 50% Eisenmangel finden.

Infolge wurde ein prospektives translationales Studienprotokoll erarbeitet, welches bei Lungenhochdruck-Patienten mit Eisenmangel die Bedeutung von verschiedenen Wachstumsfaktoren, die Expression der Eisenachse auf Ebene von Entzündungszellen und den mitochondrialen Stoffwechsel untersucht. Dieses Projekt wurde im Dezember 2016 bei der Ethikkomission eingereicht und hat eine Zustimmung erhalten. Projektkurzfassung siehe S. 7.

5. Es wurde ebenfalls mit dem Aufbau eines **Kollagenose-Registers** begonnen. Eine erste Auswertung hinsichtlich Frequenz von Fibrose und PAH wurde bereits beim ÖGR in Wien vorgestellt (siehe anbei).

6. Im Jahr 2016 wurde in Kooperation mit der hiesigen Humangenetik die **PAH-Mutationsanalyse** mittels der Methode Next-Generation-Sequencing in einem Zwei-Stufentest für 7 Gene, in denen Mutationen beschrieben wurden, etabliert.
   In einem ersten Mutationsscreening bei 25 Patienten mit IPAH/FPAH wurde einen Mutationsfrequenz von 12% gefunden. Führend sind hierbei Veränderungen im BMPR2-Gen. Diese Daten wurden bereits bei der Jahrestagung der ÖGP in Wien präsentiert (Okt. 2016, siehe Poster anbei. Es konnten bereits Familien mit PAH auf Basis der Mutationsanalyse interdisziplinär humangenetisch beraten werden. Dieses Projekt wurde spezifisch von der Initiative Lungenhochdruck unterstützt und daher als Sponsor am Poster erwähnt.

7. Erstmalig konnte für Innsbruck auch ein **MRI-Standardprotokoll** für PAH-Patienten etabliert werden. Eine erste Auswertung im Rahmen einer Diplomarbeit hat gerade begonnen.

Antiinflammatory Properties of PAH Drugs

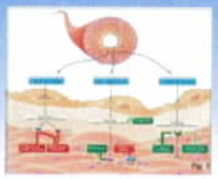
Kathrin Witzinger [1], Ivan Tancevski [1], Thomas Sonnweber [1], Judith Löffler-Ragg [1]
[1] Pneumology/USPH Innsbruck,
Internal Medicine VI, Department of Internal Medicine Innsbruck
Medical University Innsbruck, Austria

Background

In patients suffering from pulmonary arterial hypertension (PAH) elevated levels of monocyte-derived cytokines have been described in early stage of disease. Beside vasodilatory potential, specific anti-inflammatory activities of current PAH drugs might contribute to their therapeutic efficacy.

Aim

We studied the anti-inflammatory properties of different classes of PAH drugs in human cultured monocytes.

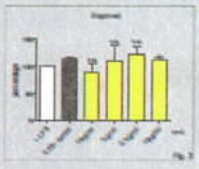


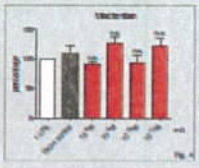
Methods

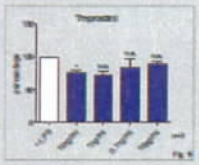
CD14+ monocytes were isolated from blood taken from healthy donors with their informed consent. Peripheral mononuclear cells were isolated via density gradient centrifugation, following by magnetic cells sorting with an anti-CD-14+ specific antibody. Cultured cells were stimulated with different concentrations of macitentan, riociguat, prostacyclin I_2 analogues (iloprost, treprostinil) with LPS (100ng/ml) for 24 h. For blocking experiments of the Toll-like receptor 4 pathway cells were pretreated with an inhibitor of NfkB or MAPK activation, followed by incubation with LPS and the medications. The IL-6, IL-10 and TNF-α concentration of cell supernatants were measured with a commercially available ELISA-based assay system.
Statistic analysis was performed by non-parametric testing (Mann-Whitney-U Test).

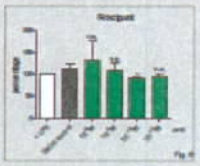
Results

IL-6

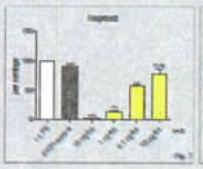


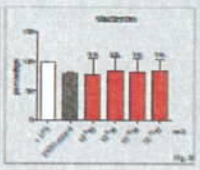


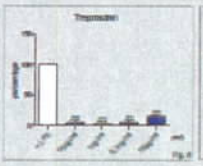


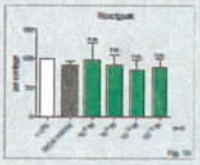


TNF-α

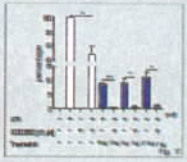


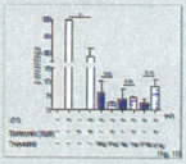


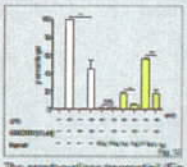


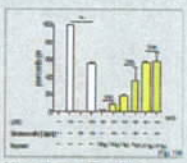


pathway inhibition









LPS activated monocytes stimulated with iloprost or treprostinil (Fig. 7 and 5) showed a significant reduction of TNF-α, but no effect on the IL-6 (Fig. 3 and 5) and IL-10 (data not shown) release. Macitentan (Fig. 4 and 9) and riociguat (Fig. 8 and 10) showed neither an effect on IL-6 nor on TNF-α expression.

The prostacyclines treprostinil (Fig. 11) and iloprost (Fig. 12) show a further reduction of the TNF-α release, independent of the MAPK pathway inhibition, but dependent on NfkB inhibition (Fig. 13 a 14).

Results

We show that PGI_2 analogues pronounced suppress TLR4-dependent TNF-α expression in human monocytes via the MAPK and NFκB pathway. This observation suggests a specific anti-TNF class effect of prostacyclin analogues in PAH therapy.

Correspondence: Prof. Judith Löffler-Ragg, Medical University of Innsbruck - Anichstrasse 35, A-6020 Innsbruck - e-mail: judith.loeffler@i-med.ac.at

PU Igls,
ERS London
ÖGP Wien
2016

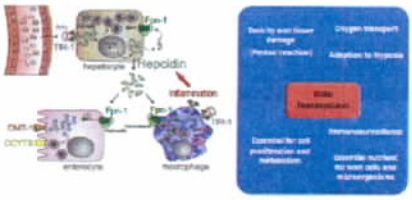
Iron deficiency in pulmonary arterial hypertension: a matter of definition!

Thomas Soennweber, Eva Susanna Berger, Kathrin Weidinger, Katharina Lins, Günter Weiss, Judith Müller-Tasch

Internal Medicine VI, Department of Internal Medicine Innsbruck
Medical University Innsbruck, Austria

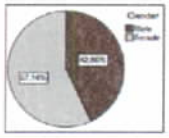
Background and Aims

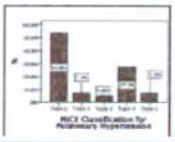
Iron deficiency (ID) plays an important role in chronic disease modulation. There is increasing interest in the role of iron homeostasis in the natural history of pulmonary arterial hypertension (PAH). ID in the absence of anemia has been reported in patients with idiopathic pulmonary hypertension (IPAH) and in systemic sclerosis patients with pulmonary hypertension and correlated with both, disease severity and clinical outcome. In chronic left heart failure parenteral iron treatment has already been established as standard of care in ID, improving exercise capacity and NYHA functional class. In our study we describe a work-up of iron status in a heterogeneous "real-life" PAH cohort according to different definitions of ID.



Methods

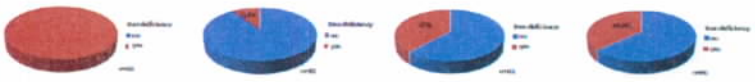
In a retrospective study in 84 patients with PAH the presence of ID was assessed according to four different definitions. (1) soluble transferrin receptor (sTfR) >2.07mg/l, (2) ferritin <30µg/l and transferrin saturation <15%, (3) ferritin <100µg/l and transferrin saturation <20% and (4) an elevated ferritin-index (sTfR/log ferritin). The impact of ID on exercise capacity, hemodynamic measurements and blood analyses was assessed. In a subgroup of 46 patients serum levels of hepcidin were measured via ELISA.





Results

The frequency of ID varied depending on its definition. All PAH patients displayed elevated sTfR, whereas according to the stringent definition (2) only 8.8% of the patients were iron deficient. The criteria for ID in left heart disease (3) displayed 67.6% iron deficient patients, and according to ferritin index (4) ID was present in 30.6% of the patients. In contrast to definition (1) and (2) the use of criteria (3) and (4) showed a significant difference between patients with normal iron status and patients lacking iron in exercise capacity as reflected by differences in 6MWD and NYHA FC, hemodynamic parameters such as PvO2 and blood testing with significant differences in hemoglobin and NT-proBNP levels. All patients with evidence of absolute iron deficiency displayed elevated hepcidin levels.



Figures 1 – 4: Percentage of iron deficient iron patients depending on the definition of iron deficiency

clinical parameter	ID-definition (1)	ID-definition (2)	ID-definition (3)
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

Mutation analysis of Austrian patients with pulmonary arterial hypertension

Elisabeth Maurer[1], Martina Witsch-Baumgartner[1], Regina Mascherbauer[2], Günter Weiss[3], Johannes Zschocke[1], Judith Löffler-Ragg[3]

[1]Division of Human Genetics, Innsbruck Medical University Austria, e-mail: elisabeth.maurer@i-med.ac.at
[2]Interne 2, Allgemein öffentliches Krankenhaus der Elisabethinen Linz, Austria
[3]Universitätsklinik für Innere Medizin VI, Innsbruck Medical University, Austria, e-mail: judith.loeffler@i-med.ac.at

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare disease with increased pulmonary arterial pressure (PAPm ≥ 25 mmHg, PAWP ≤ 15mmHg) and a risk of fatal right heart failure. The pathogenesis of PAH is complex and includes both genetic and environmental factors that alter vascular structure. Mutations in *BMPR2* are the single most common causal factor for hereditary cases and have been identified in familial PAH (FPAH, 70%), as well as in idiopathic PAH (IPAH, 10-40%). Hemorrhagic telangiectasia accompanied by PAH is caused by mutations in *ACVRL1* or *ENG*. Mutations in *KCNK3*, *CAV1* or in genes belonging to the SMAD family are rare (<3%).

Method

We analyzed the genes *BMPR2*, *ACVRL1* and *ENG* in 25 patients with PAH and additional *EIF2AK4* gen in case of PVOD (pulmonary veno-occlusive diseases) by massive parallel sequencing (MPS). Enrichment of target exonic regions and adjacent exon-flanking regions (±30bp) from genomic DNA by Nextera® Rapid Capture (Custom Designed Sequencing Panel, Illumina®) and adjacent massive parallel sequencing (MiSeq, Illumina®). Alignment of sequences to the human reference sequence GRCh37 (hg19) and analysis of *BMPR2*, *ACVRL1* and *ENG* (qualitative and quantitative) with NextGENe® and Geneticist Assistant™ (Softgenetics®). Confirmation of all relevant variants by Sanger sequencing or MLPA. Analysis of Sanger sequencing data and MLPA by Sequence Pilot (JSI®).

Results

We identified two different mutations in *BMPR2*, one mutation in *ENG*, and two *ENG* variants with unknown significance, while no mutation was found in *ACVRL1*.

Table 1: Studied patients (n=25)

patient	age	gender	diagnosis	mutation
1	58	male	IPAH	
2	65	male	IPAH	
3	20	female	IPAH	
4	61	female	IPAH	
5	69	male	IPAH	ENG c.7C>T (p.Arg3Cys) heterozygous
6	59	female	IPAH	
7	69	female	IPAH and lung disorder	
8	34	female	IPAH with congenital heart defect	
9	22	female	IPAH	
10	64	male	IPAH and lung disorder	ENG c.-9G>A heterozygous
11	70	male	IPAH	
12	52	female	IPAH	
13	60	female	IPAH	
14	50	female	IPAH	
15	21	female	FPAH	BMPR2 c.637C>T (p.Arg213Ter) heterozygous ENG c.-524-12G>A heterozygous
16	27	female	FPAH	BMPR2 heterozygous deletion of whole BMPR2 gene
17	57	male	PVOD	
18	57	female	CTEPH	
19	71	male	CTEPH	
20	72	male	CTEPH	
21	60	female	Sjögren/Lyndrom	
22	73	male	CTEPH	
23	58	male	PAH, VSD	
24	65	female	IPAH/PVOD	
25	44	male	PVOD	

IPAH: idiopathic PAH; FPAH: familial PAH; CTEPH: chronic thromboembolic pulmonary hypertension; VSD: ventricular septal defect; PVOD: pulmonary veno-occlusive disease

Conclusion

The genetics of PAH is complex due to incomplete penetrance and genetic heterogeneity. We examined three genes in our cohort and identified putative pathogenic mutations in three patients (2x in *BMPR2* and once in *ENG*) and one *ENG* variant with unknown significance in one patient. We have established an interdisciplinary team for genetic and clinical counselling and a screening of further candidate genes is ongoing.

Patient 16:

Patient 16 (27 yr female) with IPAH harbored a heterozygous deletion of whole *BMPR2*. *De novo* deletions of *BMPR2* are already described (*Aldred et al, Human Mutation, 2006*).

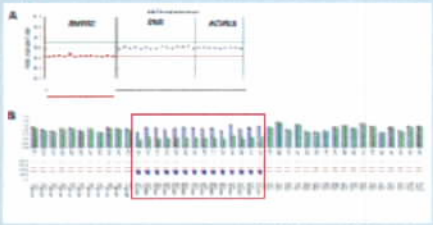


Fig. 2: Determination of a heterozygous deletion of whole BMPR2-Gen in a 27a female by CNV tool. A heterozygous deletion of whole *BMPR2*-gene was analyzed by CNV tool (NextGENe®) (A). MLPA (MRC-Holland®) was performed to confirm the deletion in the *BMPR2*-gene (analyzed by Sequence Pilot®, JSI) (B).

Patient 15:

Patient 15 (21 yr female) with FPAH carried the *BMBP2* mutation c.637C>T which is predicted to lead to a premature stop-codon p.Arg213Ter in exon 6. This mutation has already been described associated with PAH (Morisaki et al, Hum Mutat, 2004; Raamsteeboers et al, Eur Respir Rev, 2014).
Additionally, this patient carried the *ENG* variant c.524-12G>A. This variant is until now described in 0,041 % in the total population, *in silico* splice predictions programs (Gene Splicer, Human Splicing Finder, Max Ent Scan) predict no splice effect for this variant.

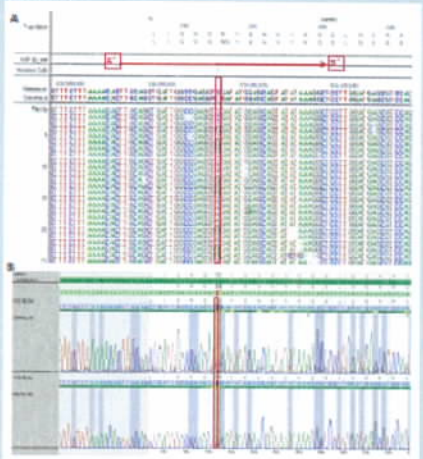


Fig. 1: Identification of a pathogenic BMPR2 mutation in a 21 a female with FPAH. The pathogenic *BMPR2* mutation (NM_001204.6): c.637C>T (p.Arg213Ter) was found heterozygous by MPS (A). For confirmation, Sanger-Seq was performed and sequences were analyzed by Sequence Pilot® (JSI) (B).

Patient 10:

Patient 10 (64 yr male) with IPAH carried the *ENG* variant c.-9G>A heterozygously. In literature the effect of the *ENG* variant c.-9G>A is contradictory: expression studies by Damjanovich et al. showed decreased protein levels suggesting that the c.-9G>A is a hypomorphic mutation (*Journal of Rare Diseases, 2011*), while Gedge et al. (*Journal of Molecular Diagnostics, 2007*) described the variant as benign.

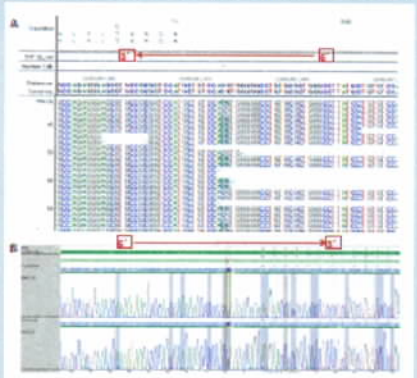


Fig. 3: Determination of a *ENG* variant in a 64 a male with IPAH. The *ENG* variant (NM_000118.3): c.-9G>A (rs368423588) was found heterozygous by MPS (A). For confirmation, Sanger-Seq was performed and sequences were analyzed by Sequence Pilot® (JSI) (B).

Patient 5:

Patient 5 (69 yr male) with IPAH harbored the *ENG* variant c.7C>T heterozygously. The expected effect of this variant is an amino acid change p.Arg3Cys, which concerns a highly conserved amino acid. The variant is listed in the mutation database ExAC with an allele frequency of 0,084% in the European population; in the *ENG* database http://arup.utah.edu/database this variant is classified as variant with unknown significance. The *in silico* prediction programs GWGD and SIFT predict for this variant a disease causing effect, while MutationTaster and PolyPhen2 define the variant as benign.

Support: [illegible]

ÖGR 2016
Wien

Systematisches Screening auf Lungenbeteiligung bei Kollagenosen

Josef Schalk[1], Birgit Mosheimer-Feistritzer[1], Gudrun Ratzinger[2], Thomas Sonnweber[1], Ivan Tancevski [1], Barbara Böckle[2], Norbert Sepp[2], Christian M Kähler[3], Günter Weiss[1], Judith Löffler-Ragg[1]
[1]Medizinische Universität Innsbruck, Innere Medizin VI, [2]Medizinische Universität Innsbruck, Klinik für Dermatologie und Venerologie, [3]Waldburg-Zeil Kliniken - Fachkliniken Wangen, Lungenzentrum Süd-West

Ziel: Kollagenosen umfassen eine klinisch heterogene Gruppe von Autoimmunerkrankungen mit Befall der Haut und/oder der inneren Organe, zu denen definitionsgemäß die Krankheitsbilder des systemischen Lupus erythematodes (SLE), der systemischen Sklerose, Mischkollagenosen, Dermatomyositis/Polymyositis (DM/PM) und das Sjögren-Syndrom zählen. Eine Lungenbeteiligung kann alle Teile des Respirationstrakts betreffen und stellt eine der Haupttodesursachen bei Kollagenosepatienten dar. In unserer Studie werden retrospektiv die Ergebnisse eines systematischen Lungenscreenings bei Kollagenosepatienten und deren klinische Relevanz untersucht.

Methoden: In einer retrospektiven Untersuchung wurden 167 innerhalb eines Jahres konsekutiv vorgestellte Kollagenosepatienten hinsichtlich einer möglichen Lungenbeteiligung evaluiert. Es wurden laborchemische, lungenfunktionelle, kardiologische und bildgebende Befunde ausgewertet. Für die Untersuchung wurden jeweils die Daten vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. die ersten in unserer Ambulanz vorhandenen Daten und jene der Letztuntersuchung ab 2014 herangezogen.

Ergebnisse: In unserem Kollektiv sind 92.8 % (n = 155) der erfassten Patienten weiblich, 7.2 % (n = 12) männlich. Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt 58 ± 14 Jahre mit einer durchschnittlichen Erkrankungsdauer von 150 ± 95 Monaten. Zwischen Erst- und Letztuntersuchung liegen 78 ± 37 Monate.

Bei 43% (n = 72) der Patienten besteht die Diagnose einer systemischen Sklerose, bei 4% (n = 7) eines Sjögren-Syndroms, bei 42% (n = 70) eines SLE, bei 8% (n = 14) einer Mischkollagenose und bei 2% (n = 4) einer DM/PM. In unserem Kollektiv sind 68% (n = 113) der Patienten ANA positiv, wobei die häufigsten drei Subtypten anti-SSA, anti-SSB und anti-CENP-B (43%, 20% und 40%) sind.

Abbildung 1: Verteilung der FVC

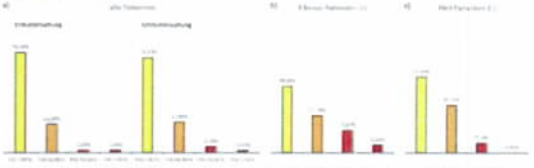


Abbildung 1: a) Verteilung der FVC bei allen gescreenten Patienten bei Erst- (n=118) und Letztuntersuchung (n=140), b) Verteilung der FVC bei allen Fibrose Patienten bei Letztuntersuchung (n=18), c) Verteilung der FVC bei allen PAH Patienten bei Letztuntersuchung (n=14).

Abbildung 2: Verteilung der DLCO

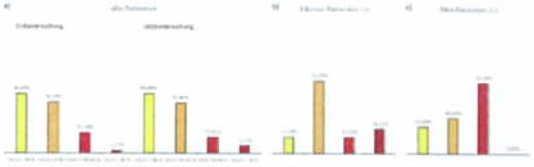


Abbildung 2: a) Verteilung der DLCO bei allen gescreenten Patienten bei Erst- (n=112) und Letztuntersuchung (n=127), b) Verteilung der DLCO bei allen Fibrose Patienten bei Letztuntersuchung (n=16), c) Verteilung der DLCO bei allen PAH Patienten bei Letztuntersuchung (n=12).

Abbildung 3: Prozentueller Anteil der Lungenbeteiligung im Sinne von Fibrose, Fibrose mit PAH und PAH ohne Fibrose

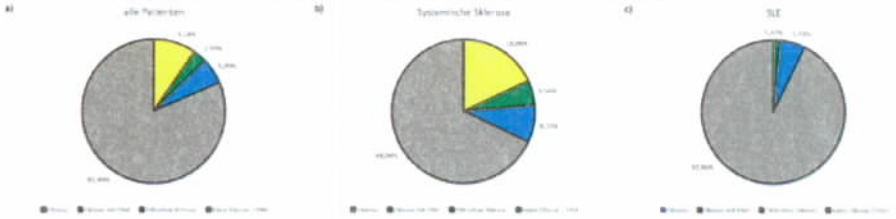


Abbildung 3: Prozentueller Anteil der gescreenten Patienten mit Lungenbeteiligung im Sinne von Fibrose, Fibrose mit PAH und PAH ohne Fibrose, a) bei allen Patienten (n=167), b) bei Patienten mit systemischer Sklerose (n=72), c) bei Patienten mit SLE (n=70).

Tabelle 1: Entwicklung lungenfunktioneller und laborchemischer Parameter sowie des pO2

	Erstuntersuchung		Letztuntersuchung			
	N	Mittelwert (SD)	N	Mittelwert (SD)	Entwicklung	p-Value
Serum NTproBNP mean (SD)	52	327,52 (508,29)	125	346,12 (804,41)	+ 18,6	0,525 (n=45)
bei Fibrose	8	588,75 (656,44)	19	640,47 (608,28)	+ 79,72	0,812 (n=7)
bei PAH	9	847,22 (942,51)	14	699,14 (672,51)	- 148,08	0,214 (n=9)
Serum Harnsäure mean (SD)	129	4,69 (1,66)	127	5,06 (1,59)	+ 0,38	0,023 (n=103)
bei Fibrose	17	5,35 (2,04)	20	5,37 (1,81)	+ 0,02	0,254 (n=16)
bei PAH	15	6,04 (1,51)	15	6,17 (1,89)	+ 0,13	0,394 (n=15)
FVC Prozent mean (SD)	118	88,59 (16,46)	140	90,34 (19,17)	+ 1,75	0,795 (n=100)
bei Fibrose	10	83,00 (20,03)	18	79,25 (21,99)	- 3,84	0,036 (n=18)
bei PAH	15	93,58 (14,07)	14	87,04 (20,93)	- 6,54	0,116 (n=14)
DLCO Prozent mean (SD)	112	77,17 (1,834)	127	77,34 (18,92)	+ 0,19	0,358 (n=89)
bei Fibrose	18	75,44 (26,42)	16	85,06 (16,12)	10,4	0,011 (n=16)
bei PAH	15	63,06 (19,62)	12	52,81 (18,13)	10,25	0,041 (n=12)
pO2 ernrig mean (SD)	6	72,83 (13,97)	77	79,18 (11,24)	+ 6,35	0,138 (n=5)
bei Fibrose	1	71,8	18	80,24 (14,93)	+ 8,44	
bei PAH	1	71,8	10	75,84 (21,98)	+ 4,04	

Tabelle 1: Vergleich lungenfunktioneller und laborchemischer Parameter sowie des pO2 zwischen Erstuntersuchung und Letztuntersuchung bei allen Patienten und getrennt nach Fibrose und PAH Patienten

Abbildung 4: Verteilung der Lungenbeteiligung in Abhängigkeit vom Antikörperprofil

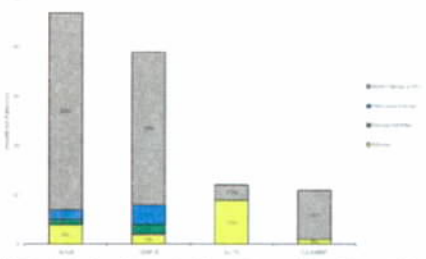


Abbildung 4: Verteilung der Lungenbeteiligung im Sinne von Fibrose, Fibrose mit PAH und PAH ohne Fibrose in Abhängigkeit vom Antikörperprofil bezüglich SS-A/B (n=47), CENP-B (n=39), Scl-70 (n=12), U1-SnRNP (n=11).

Zusammenfassung/Schlussfolgerung:
Eine Lungenbeteiligung bei Kollagenosen ist häufig und mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert. Da diese auch aufgrund der insgesamt reduzierten Belastbarkeit bei Kollagenosepatienten oft längere Zeit subklinisch verläuft, sollte ein regelmäßiges lungenfunktionelles und kardiologisches Screening zur frühzeitigen Erkennung einer ILD oder einer PAH erfolgen.

Title

Clinical and translational analysis of iron dyshomeostasis in patients with pulmonary arterial hypertension.

Summary

Systemic iron deficiency without anemia is frequent in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH). Whether this is an independent comorbidity or is causally related to the initiation or progression of PAH is still unknown. Our research aims to understand the physiological control of systemic and cellular iron metabolism and its disturbances in PAH. By investigation of clinical phenotypes of a cohort of PAH patients and characterization of associated iron dyshomeostasis at serum and monocytes level, including cytokines, growth factors and mitochondrial function signature further insights on iron metabolism will be gained.

EK-Votum vorliegend
Start 1. Quartal 2017

Meilensteine für 2017:

1. Start der Forschungstätigkeit des Projektes "Clinical and translational analysis of iron dyshomeostasis in patients with pulmonary arterial hypertension".
2. Einbringen von Patienten in 2 neue PAH-Studien: 18588 REPLACE und BEL004 Inovation.
3. Fortführung des Kollagenose-Screening Projektes mit Ausarbeitung hinsichtlich der Bedeutung von Entzündungsmarkern.
4. Fortführung des Kollagenose-Screening Projektes mit Ausarbeitung einer prospektiven Studie (Studienprotokoll-Erstellung und Einreichung in EK).
5. Weiterführung der Mutations-Analysen. Dies kann österreichweit angeboten werden. Erstellung eines Artikels für die Wiener Klinische Wochenzeitschrift zur Erhöhung der Awareness.
6. Fertigstellung der Auswertung hinsichtlich der Bedeutung von Vitamin –D bei PAH (Diplomarbeit, inkl. Publikation).
7. Fertigstellung einer Auswertung hinsichtlich der Wirkung-Nebenwirkungen von Riociguat im Rahmen der EXPERT-Studie (Diplomarbeit, inkl. Publikation).
8. Untersuchung der Bedeutung von Malnutrition bei PAH.

Nach Vorlage des Tätigkeitsberichtes und Planung der neuen Meilensteine suchen wir daher bei der Initiative Lungenhochdruck um weitere finanzielle Unterstützung des PAH-Zentrums Innsbruck an.

Mit freundlichen Grüßen,

Ao Univ. Prof. Dr. Judith Löffler-Ragg