

Aus der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Biomarker und klinisch-diagnostische Parameter bei pulmonaler arterieller
Hypertonie im Rahmen der systemischen Sklerose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marissa Andrea Michelfelder, geb. Kutsche,

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
Abstract.....	5
Abstract (english)	6
Einführung.....	7
Methodik.....	8
Ergebnisse.....	11
Diskussion	15
Literaturverzeichnis	20
Eidesstattliche Versicherung	26
Anteilerklärung	27
Publikationen	29
Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis	29
Interstitial lung disease increases mortality in systemic sclerosis patients with pulmonary arterial hypertension without affecting hemodynamics and exercise capacity	39
Serum cytokines and their predictive value in pulmonary involvement of systemic sclerosis	49
Curriculum Vitae	60
Publikationsliste	62
Danksagung	62

Abkürzungsverzeichnis

6MWT	6-Minuten-Gehtest
ACA	Anti-Zentromer-AK
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre AK
Anti-AT ₁ R-AK	Anti-Angiotensin ₁ -Rezeptor-Autoantikörper
Anti-ET _A R-AK	Anti-Endothelin _A -Rezeptor-Autoantikörper
Anti- α -SMA-AK	Anti- α -smooth muscle actin-Autoantikörper
AT ₁ R	Angiotensin ₁ -Rezeptor
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2, <i>Synonym</i> : MCP1
CCL4	CC-Chemokin-Ligand-4, <i>Synonym</i> : MIP-1 β
CHD	Congenital Heart Disease, angeborener Herzfehler
CI	Confidence interval, Konfidenzintervall
CTD	Connective Tissue Disease, Kollagenose
CTEPH	Chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie
DLCO	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ETAR	EndothelinA-Rezeptor
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FVC	Forcierte Vitalkapazität
HR	Hazard ratio
HR-CT	High resolution computed tomography
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
IPAH	Idiopathische PAH
MCP1	Monocyte Chemotactic Protein 1, <i>Synonym</i> : CCL2
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein-1 β , <i>Synonym</i> : CCL4

mPAP	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck
PAH	Pulmonal-arterielle Hypertonie
PE	Perikarderguss
PH	Pulmonale Hypertonie
PmScl	Anti-Pm-Scl-AK
Pol3	Anti-RNA-Polymerase III-AK
PVR	Pulmonalvaskulärer Widerstand
RAP	Rechtsatrialer Druck
RHK	Rechtsherzkatheteruntersuchung
ROC	Receiver-operating-characteristic
RR _{systemax}	Maximaler systolischer Blutdruck
Scl70	Anti-Scl70-AK
SD	Standard deviation, Standardabweichung
sPAP	Systolischer pulmonal-arterieller Druck
SSc	Systemische Sklerose
TAPSE	Tricuspid annular plane systolic excursion
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TLC	Totale Lungenkapazität
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U1RNP	Anti-U1RNP-AK
VA	Alveolarvolumen
VHfli	Vorhofflimmern
VO _{2max}	Maximale Sauerstoffaufnahme

Abkürzungen außerhalb des medizinischen Fachvokabulars sind, soweit nicht anders angegeben, dem Duden [1] entnommen.

Abstrakt

Die häufigste Todesursache von an systemischer Sklerose (SSc) Erkrankten ist eine Lungenbeteiligung. 35% der an SSc Erkrankten versterben an den Folgen einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) und 26% an pulmonaler Hypertonie (PH) [2]. Die Kombination beider Erkrankungen kommt in 2-18% der Fälle vor [3-5], wobei pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) und ILD sowohl unabhängig koinzident sein können als auch die ILD infolge von chronischer Hypoxämie und pulmonaler Vasokonstriktion eine PH bedingen kann. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit Biomarkern und klinisch-diagnostischen Parametern, die prädiktiv für einen schlechteren Verlauf bei SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung sind.

Hierfür wurden 279 SSc-Patienten (37 SSc-PAH-Patienten, 43 SSc-ILD-Patienten, 25 SSc-PH-ILD-Patienten und 174 SSc-Patienten ohne pulmonale Beteiligung) untersucht. Zentrenübergreifend wurden zudem in Serumproben von 182 PH-Patienten unterschiedlicher Ätiologie Vorhandensein und Höhe der Anti-Angiotensin₁-Rezeptor-Autoantikörper (Anti-AT₁R-AK) und Anti-Endothelin_A-Rezeptor-Autoantikörpern (Anti-ET_AR-AK) gemessen. Weiterhin wurde die Wirkung der Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK im Tierversuch getestet.

Es zeigte sich, dass nicht nur die PAH in sich, sondern insbesondere auch die Kombination aus PAH und ILD im Vergleich zur isolierten PAH bei SSc-Patienten mit erhöhter Mortalität assoziiert ist (1-, 5- und 10-Jahresüberlebensrate 86%, 54% und – da sich in der Kohorte kein neuer Todesfall ergab – 54% bei SSc-PAH-ILD-Patienten; 1-, 5-, und 10-Jahresüberlebensrate bei SSc-PAH-Patienten ohne ILD 96%, 92% und 82%, $p=0,013$). Dennoch konnten hämodynamische Parameter (mPAP, sPAP, PVR, RAP, TAPSE, cardiac index, EF, NTproBNP) nicht zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohne ILD diskriminieren. Hingegen konnten DLCO-Werte bei SSc-Patienten eine Lungenbeteiligung vorhersagen und zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohne ILD unterscheiden. Auch verschiedene Serumzytokine (IL-6, CCL2, CCL4) konnten bei SSc-Patienten eine Lungenbeteiligung und eine erhöhte Mortalität von SSc-Patienten vorhersagen (IL-6, IL-7). Weiterhin konnten Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK bei SSc-Patienten PAH und bei SSc-PAH-Patienten Mortalität vorhersagen. Sie wirkten im Tiermodell pathogen an Lungengefäßen.

Zusammenfassend scheinen Lungenfunktionsparameter wie auch verschiedene Serumzytokine und die Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK als Screeningparameter für eine pulmonale Beteiligung bei SSc in Frage zu kommen. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchung. Zudem

scheinen die Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Vaskulopathie von Patienten mit systemischer Sklerose zu spielen.

Abstract (english)

The most frequent cause of death in systemic sclerosis (SSc) is pulmonary involvement. 35% of SSc patients die due to interstitial lung disease (ILD) and 26% due to pulmonary hypertension (PH) [2]. A combination of both diseases occurs in 2-18% of the patients [3-5], and pulmonary arterial hypertension (PAH) and ILD may both coexist independently, or ILD may cause chronic hypoxemia and pulmonary vasoconstriction that leads to PH. In this study, we investigated biomarkers and clinical diagnostic parameters that may be predictive of a poorer outcome for SSc patients with pulmonary involvement.

We investigated 279 patients (37 SSc-PAH patients, 43 SSc-ILD patients, 25 SSc-PH-ILD patients and 174 SSc patients without pulmonary involvement). In a multicentric approach we analysed additional serum samples from 182 PH patients of different PH entities for angiotensin₁ receptor autoantibodies (AT₁R antibodies) and endothelin_A receptor autoantibodies (ET_AR antibodies). Furthermore, we tested the effect of these antibodies in an animal model.

We were able to show that not only PAH but also coexisting PAH and ILD is associated with higher mortality in SSc patients, as compared to isolated PAH in particular (1, 5 and 10 year survival rates 86%, 54% and, as there was no new case of death among the remaining patients, 54% versus 96%, 92% and 82%, $p=0.013$). However, hemodynamic parameters (mPAP, sPAP, PVR, RAP, TAPSE, cardiac index, EF, NTproBNP) could not discriminate between SSc-PAH patients with or without ILD. On the other hand DLCO was able to predict pulmonary involvement in SSc patients and to discriminate between SSc-PAH patients with or without ILD. Several serum cytokines (IL-6, CCL2, CCL4) were able to predict pulmonary involvement in SSc patients as well and to predict mortality in SSc patients (IL-6, IL-7). In addition, AT₁R antibodies and ET_AR antibodies could predict PAH in SSc patients and mortality in SSc-PAH patients. They were implied in PAH pathogenesis in an animal model.

In summary, lung function parameters, as well as different serum cytokines and AT₁R antibodies and ET_AR antibodies, seem to be valuable screening parameters for pulmonary involvement in SSc, but further investigation into this is required. AT₁R antibodies and ET_AR antibodies seem to play an important role in the pathogenesis of vasculopathy in SSc patients.

Einführung

1. Die systemische Sklerose

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine heterogene Multiorganerkrankung, die durch Vaskulopathie, Autoimmunität und Fibrose gekennzeichnet ist. Die Inzidenz beträgt 0,6-2,3/100.000 Einwohner pro Jahr [6], womit sie zu den seltenen Erkrankungen gezählt wird. Gleichzeitig ist die Mortalität von an SSc Erkrankten etwa 3,5 mal höher als in der Allgemeinbevölkerung [7]. Die Diagnose wird gemäß der ACR/EULAR-Kriterien anhand von klinischen Untersuchungsbefunden, Serologie und (Lungen-) spezifischer apparativer Diagnostik gestellt [8, 9].

Die Ätiopathogenese der systemischen Sklerose ist bis heute nicht vollständig verstanden, jedoch scheint es durch ein frühes (möglicherweise genetisch, durch Umwelteinflüsse oder Virusinfektion getriggertes) immunologisches Event zu Endothelzellschäden an kleinen Gefäßen zu kommen (klinisch u.a. in Form des Raynaud-Phänomens erkennbar). Die vaskulären Schäden führen ihrerseits zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und zur Aktivierung zellulärer und humoraler Immunkomponenten (u.a. mit der Folge spezifischer Autoantikörperproduktion) sowie zur Aktivierung von Fibroblasten und bedingen letztlich eine sich selbst unterhaltende Vaskulopathie und Fibrose [10].

Die Behandlung der systemischen Sklerose umfasst daher neben symptomatischen Maßnahmen eine immunsuppressive Therapie. Letztere sollte frühzeitig begonnen werden, um (irreversible) Organschäden zu verhindern und die Krankheitsprogression zu verlangsamen. Hierfür ist ein frühes Erkennen von Hochrisikopatienten mit zu erwartenden schweren Verläufen bedeutsam und die Erforschung geeigneter Screening-Parameter und Biomarker von hohem Interesse.

2. Pulmonale Beteiligung bei systemischer Sklerose

Etwa 25% der SSc-Patienten entwickeln eine substantielle pulmonale Beteiligung innerhalb der ersten 3 Jahre nach SSc-Diagnosestellung. Diese ist auch die häufigste Todesursache von an SSc Erkrankten [11]. 35% der an SSc Erkrankten versterben an den Folgen einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) und 26% an pulmonaler Hypertonie (PH) [2]. Die Kombination beider Erkrankungen kommt in 2-18% der Fälle vor [3-5], wobei pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) und ILD sowohl unabhängig koinzident sein können als auch die ILD infolge von chronischer Hypoxämie und pulmonaler Vasokonstriktion eine PH bedingen kann.

Die Diagnose der ILD wird anhand von Lungenfunktionsparametern und anhand von radiographischen Kriterien mittels Computertomographie (HR-CT) gestellt. Goldstandard zur

Diagnosestellung einer PH ist die Rechtsherzkatheteruntersuchung (RHK). Die Diagnostik sollte frühzeitig und in regelmäßigen Intervallen erfolgen, da klinische Symptome (Dyspnoe, unproduktiver Husten, Leistungsminderung) unspezifisch sind und bisweilen nicht oder spät auftreten.

Therapeutisch kommt für die PAH (neben der Therapie der zugrundeliegenden SSc) und neben einer Basistherapie (Diuretika, Sauerstoff, Sport etc.) eine differenzierte Therapie mittels Calciumkanalblockern, Endothelinrezeptorantagonisten, Phosphodiesterase-5-Hemmern und Prostacyclin-Analoga in Frage [12]. Die inflammatorische ILD wird im Allgemeinen immunsuppressiv behandelt, wobei Notwendigkeit und Wahl des jeweiligen Immunsuppressivums Gegenstand aktueller Diskussionen sind [13].

3. Fragestellung

Während über die Bedeutung von ILD und PAH bei SSc als häufiger Todesursache Konsens besteht, wird die Frage nach einer erhöhten Mortalität bei Patienten mit kombinierter ILD und PH kontrovers diskutiert [3, 14-17]. Gleichzeitig besteht Unklarheit darüber, anhand welcher klinischer Parameter das erhöhte Risiko bei SSc-PAH sowie bei SSc-PAH-ILD am besten eingeschätzt werden kann.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit Biomarkern und klinisch-diagnostischen Parametern, die prädiktiv für einen schlechteren Verlauf bei SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung sind. Neben hämodynamischen und Lungenfunktionsparametern werden hier insbesondere ausgewählte Zytokine und Autoantikörper betrachtet. Spezielle Aufmerksamkeit wird den Anti-Angiotensin₁-Rezeptor-Autoantikörpern (Anti-AT₁R-AK) und den Anti-Endothelin_A-Rezeptor-Autoantikörpern (Anti-ET_AR-AK) gewidmet. Zusätzlich wird die Frage eines möglichen Beitrags einzelner Biomarker zur Pathogenese der systemischen Sklerose bzw. ihrer pulmonalen Komplikationen untersucht.

Methodik

1. Patienten

Von 279 SSc-Patienten, die im klinischen Alltag in der Klinik für Rheumatologie der Charité Berlin vorstellig wurden, wurde retrospektiv der bisherige Krankheitsverlauf erfasst sowie kontinuierlich mit jeder weiteren Vorstellung ergänzt. Alle Patienten erfüllten die ACR/EULAR-Kriterien [8]. 62 SSc-Patienten hatten eine durch Rechtsherzkatheteruntersuchung gesicherte PAH [12]. Bei 68 SSc-Patienten wurde anhand von Lungenfunktionsuntersuchungen und HR-

CT die Diagnose einer ILD (in 43 Fällen ohne gleichzeitige Diagnose einer PAH, in 25 Fällen in Kombination mit PAH) gestellt. 174 SSc-Patienten hatten keinerlei pulmonale Beteiligung. Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Anti-AT₁R-AK und der Anti-ET_AR-AK Serumproben von insgesamt 182 weiteren PH-Patienten aus zwei weiteren PAH-Zentren (Medizinische Hochschule Hannover und Justus-Liebig-Universität Gießen) verwendet. Diese Patienten wurden von erfahrenen Klinikern in 62 Patienten mit idiopathischer PAH (IPAH), 31 Patienten mit chronisch-thrombembolischer PH (CTEPH), 14 Patienten mit PH aufgrund kongenitaler Herzerkrankung (CHD), 19 Patienten mit SSc-PAH und 56 mit PH infolge von sonstigen Bindegewebserkrankungen (connective tissue diseases, CTD) klassifiziert.

2. Klinische Datenerfassung

Die erhobenen klinischen Parameter umfassten die routinemäßig von der EUSTAR (EULAR Scleroderma Trial and Research) group erhobenen Parameter [18]. Zusätzlich wurden Kreatinin, NTproBNP und spiroergometrische Parameter erfasst. Die Erfassung erfolgte alle 6 Monate bzw., falls sich Patienten seltener vorstellten, im Rahmen der nächsten Vorstellung.

3. Anti-AT₁R-AK- und Anti-ET_AR-AK-Messungen und experimentelle Untersuchungen

Serumlevel der Anti-AT₁R-AK und der Anti-ET_AR-AK wurden gemäß zuvor beschriebener Verfahren mittels ELISA (CellTrend GmbH, Luckenwalde bzw. One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) bestimmt [19, 20].

In vivo- und in vitro-Experimente wurden mit gereinigtem gemischtem IgG von 14 SSc-Patienten mit hohen Autoantikörperleveln bzw. von 15 gesunden Spendern als Kontrollen durchgeführt (Verfahren zur Gewinnung des Materials siehe [21]). In wie auch in anderen Versuchsreihen [22, 23] vorpräparierten Rattenlungen wurde die endotheliale Calciumkonzentration (als Marker einer AT₁R- bzw. ET_AR-Aktivierung durch die entsprechenden Autoantikörper) mittels Real-time Fluoreszenzmikroskopie nativ, nach Zugabe von SSc-IgG und nach Zugabe von IgG gesunder Spender in die Lungenkapillaren gemessen. Anschließend wurden die Rattenlungen vor nochmaliger Durchführung desselben Experiments mit dem AT₁R-Blocker Valsartan bzw. dem ET_AR-Blocker Sitaxsentan perfundiert.

Weiterhin wurde die Kontraktilität intralobärer Pulmonalarterien von Ratten in Reaktion auf Administration von Angiotensin II bzw. Endothelin-1 nach Inkubation mit IgG gesunder Spender, SSc-IgG sowie SSc-IgG und Bosentan als ET_{A/B}R-Antagonist bzw. Valsartan als AT₁R-Blocker (zum Nachweis der Funktion der Autoantikörper als Agonisten am jeweiligen

Rezeptor) mit Hilfe eines Myographen gemessen (genaue Beschreibung des Verfahrens siehe [24]).

Schließlich erhielten Versuchsmäuse Injektionen von IgG gesunder Spender bzw. von SSc-IgG. Im Anschluss wurden histologische Schnitte dieser Mäuselungen mit anti- α -smooth muscle actin-Antikörpern (anti- α -SMA-AK) und anti-human IgG F(ab')₂-Fragment sowie mit Anti-CD31-Antikörpern (Nachweis endothelialer Zellen) und Hämatoxylin/Eosin gefärbt, um eine Bindung der Autoantikörper und das Entstehen einer Vaskulopathie nachzuweisen.

4. Zytokinmessungen

Von 125 SSc-Patienten wurden bei der ersten Vorstellung in der Klinik für Rheumatologie der Charité Berlin venöse Blutproben entnommen und ausgewählte Zytokine (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, CCL2, CCL4, TNF- α und TGF- β 1) mit einem kommerziell erhältlichen Bioplex-System bzw. ELISA (für TGF- β 1) gemessen. In gleicher Art und Weise wurden von 21 SSc-ILD-Patienten genannte Zytokine aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) gemessen (vgl. auch [25]).

5. Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics Version 20-22 und GraphPad Prism 5.0-6.0 durchgeführt. Ergebnisse sind als Häufigkeiten und Prozentangabe für dichotome und kategoriale Variablen bzw. als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder Median und Interquartilsabstand für stetige Variablen angegeben. Intervallskalierte normalverteilte Daten wurden mittels t-Test bzw. im Fall mehrerer Stichproben mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Intervallskalierte nicht-normalverteilte Daten wurden mittels nicht-parametrischer Tests verglichen. Vergleichsanalysen zweier kategorialer Zielgrößen unverbundener Stichproben wurden mittels χ^2 -Test bzw. bei kleiner Stichprobenanzahl mittels Fisher's exact-Test durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen einer metrischen und einer dichotomen nominalen Variable wurde durch bivariate Korrelationsanalyse mit dem Pearson Korrelationskoeffizienten untersucht. Receiver-operating-characteristic- (ROC-) Kurven-Analyse wurde zur Bestimmung der Area under the curve (AUC), Sensitivität und Spezifität eines bestimmten Cut-off genutzt. Kaplan-Meier-Analysen wurden zum Vergleich des kumulativen Überlebens verschiedener Patientengruppen durchgeführt. Die Signifikanz eines Überlebensunterschiedes wurde mittels Log Rank Test bestimmt. Eine Cox-Regression wurde zur Untersuchung der Größe des Einflusses verschiedener Variablen auf die Überlebenszeit durchgeführt und mit entsprechender Hazard ratio (HR) und 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Effekte anderer Variablen auf eine bestimmte Variable wurden mit univariater sowie, falls statistisch signifikant, mit

multivariater Regressionsanalyse untersucht. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

6. Ethikstandard

Die jeweiligen Studien wurden durch die Ethikkommission der Charité Berlin bzw. der anderen teilnehmenden Zentren genehmigt (EA1/013/705, EA1/013/05, EA1/160/10) und beinhalteten die schriftliche Einwilligung der Patienten zur Studienteilnahme nach angemessener Aufklärung. Alle Versuche wurden gemäß der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt und von der Tierversuchskommission des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) genehmigt (Genehmigungsnummer: G0288/10).

Ergebnisse

1. Bei SSc-Patienten ist die Kombination aus pulmonaler Hypertonie und interstitieller Lungenerkrankung im Vergleich zur isolierten PAH mit erhöhter Mortalität assoziiert.

Bei 125 SSc-Patienten war die Diagnose der PAH zum Zeitpunkt der Erstvorstellung mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (HR 84,38, 95% CI 9,377-759,314). Zudem war bei SSc-PAH-Patienten (n=51) die Überlebensrate derjenigen mit zusätzlicher ILD signifikant geringer (1-, 5- und 10-Jahresüberlebensrate 86%, 54% und – da sich in der Kohorte kein neuer Todesfall ergab – 54% bei SSc-PAH-ILD-Patienten; 1-, 5- und 10-Jahresüberlebensrate bei SSc-PAH-Patienten ohne ILD 96%, 92% und 82%, $p=0,013$).

2. Hämodynamische Parameter diskriminieren zwischen SSc-PAH-Patienten und PH-Patienten anderer Ursachen, nicht aber zwischen SSc-PAH- und SSc-PAH-ILD-Patienten. Sie sind ungenügende Parameter zur Prädiktion erhöhter Mortalität bei SSc-PAH-Patienten.

Mittlerer pulmonal-arterieller Druck (mPAP) und pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR) zeigten sich bei SSc-PAH-Patienten (n=67) signifikant niedriger als bei Patienten mit IPAH ($p<0,001$ bzw. $p<0,0001$) oder CTEPH ($p=0,029$ bzw. $p=0,002$). Der cardiac index war bei den SSc-PAH-Patienten signifikant höher als bei IPAH- oder CTEPH-Patienten. Hingegen waren die hämodynamischen Parameter mPAP, systolischer pulmonal-arterieller Druck (sPAP), PVR, rechtsatrialer Druck (RAP), tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), Cardiac Index,

Ejektionsfraktion (EF), Vorhofflimmern (VHFli), NTproBNP und Perikarderguss (PE) nicht in der Lage, zwischen SSc-PAH-Patienten (n=24) und SSc-PAH-ILD-Patienten (n=27) zu diskriminieren. In der Kohorte von 67 SSc-PAH-Patienten waren mPAP, PVR und Cardiac Index zudem ungenügende Parameter, um Mortalität vorherzusagen (AUC 0,505; AUC 0,543 und AUC 0,587).

3. Initiale DLCO-Werte können bei SSc-Patienten eine Lungenbeteiligung vorhersagen. Sie sind, genau wie FVC-, FEV1- und TLC-Werte, bei SSc-PAH-Patienten mit begleitender ILD signifikant niedriger als bei SSc-PAH-Patienten ohne ILD.

Bei den untersuchten Patienten zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Ausgangs-DLCO (Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid) von SSc-Patienten mit und ohne pulmonale Beteiligung, nicht aber in der weiteren Entwicklung der DLCO. So hatten von 125 SSc-Patienten 60 Patienten mit pulmonaler Beteiligung (43 SSc-ILD-Patienten, 7 SSc-PAH-Patienten und 10 SSc-PH-ILD-Patienten) eine signifikant niedrigere DLCO ($p=0,018$, $p=0,0005$ und $p=0,0003$). Die DLCO war im Rahmen einer ROC-Analyse mit 253 SSc-Patienten ein ausreichender Parameter, um PAH bei diesen Patienten vorherzusagen (AUC 0,713, optimaler Cut-off 61%) und zeigte sich auch analog zu anderen Untersuchungen [26] mit einem Cut-off von 55% in der Lage, PAH bei SSc-Patienten vorherzusagen ($p<0,0001$). Zudem war die DLCO bei PAH-Diagnosestellung bei SSc-PAH-ILD-Patienten (n=21) signifikant niedriger als bei SSc-PAH-Patienten ohne ILD (n=26) ($p<0,001$). Hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich eines weiteren Abfalls der DLCO ($> 10\%$ bzw. $> 20\%$ vom Ausgangswert) zwischen SSc-Patienten mit PAH (n=7), ILD (n=43) oder kombinierter PH-ILD (n=10) im Vergleich zu lungengesunden SSc-Patienten (n=65) noch ein signifikanter Unterschied bezüglich der DLCO 1 bzw. 2 Jahre nach PAH-Diagnosestellung zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohne ILD.

FVC (forcierte Vitalkapazität) und TLC (totale Lungenkapazität) waren bei SSc-PAH-ILD-Patienten definitionsgemäß geringer als bei SSc-PAH-Patienten ohne ILD. Entsprechend hatten auch von oben erwähnten 125 SSc-Patienten diejenigen mit SSc-PH-ILD und SSc-ILD eine signifikant niedrigere FVC als SSc-PAH-Patienten oder SSc-Patienten ohne Lungenbeteiligung. Zudem war ein FVC-Abfall $> 10\%$ signifikant häufiger bei SSc-PH-ILD-Patienten zu beobachten als bei lungengesunden SSc-Patienten (dies traf auf SSc-PAH- und SSc-ILD-Patienten nicht zu). Umgekehrt war ein FVC-Abfall $> 20\%$ bei SSc-ILD-Patienten häufiger zu beobachten als bei lungengesunden SSc-Patienten, was wiederum für SSc-PAH- und SSc-PH-ILD-Patienten nicht zutraf.

Eine FVC/DLCO $> 1,6$ konnte bei unseren SSc-Patienten (n=253), wie bereits in der Literatur beschrieben [26], eine PAH vorhersagen (p=0,046). Allerdings konnten weder FVC/DLCO noch FEV1 (forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde)/FVC oder DLCO/TLC zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohneILD unterscheiden. Im Gegensatz dazu war die FEV1 sowohl vor PAH-Diagnosestellung als auch im weiteren Verlauf der Erkrankung bei SSc-PAH-ILD-Patienten signifikant niedriger als bei SSc-PAH-Patienten ohneILD.

4. Die körperliche Belastbarkeit von SSc-PAH-Patienten mit und ohneILD ist vergleichbar.

Spiroergometrische Befunde (maximale Sauerstoffaufnahme VO_{2max} und maximaler systolischer Blutdruck $RR_{systmax}$) unterschieden sich zwischen SSc-PAH-Patienten mit und ohneILD nicht signifikant. Auch anhand des 6-Minuten-Gehtest (6MWT) oder bei Klassifizierung der Patienten nach WHO-Grad zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen, allenfalls ein Trend zum höheren WHO-Grad bei SSc-PAH-ILD-Patienten.

5. Serumzytokine (IL-6, IL-7) können Mortalität von SSc-Patienten vorhersagen. Sie können (IL-6, CCL2, CCL4) zwischen SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung und lungengesunden SSc-Patienten differenzieren und sind teilweise (IL-7, IL-10, CCL2) mit Änderungen der Lungenfunktion assoziiert. Serumzytokine lassen keine direkten Rückschlüsse auf Zytokinlevel in bronchoalveolärer Lavage zu.

IL-6 und IL-7 waren bei SSc-Patienten (n=125) sowie der Subgruppe von SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung (n=60) mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Für IL-6 traf dies zudem auf die weitere Subgruppe der SSc-ILD-Patienten (n=43) zu. In der Kaplan-Meier-Analyse ergab sich für jeweils höhere Interleukin-Level ein signifikanter Überlebensnachteil in der Gesamtkohorte wie auch in der Gruppe von SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung (optimale Cut-offs der Gesamtkohorte 4,75 pg/ml mit AUC 0,724 für IL-6 und 2,62 pg/ml mit AUC 0,686 für IL-7 sowie bei SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung 16,45 pg/ml mit AUC 0,693 für IL-6). In der Gesamtkohorte gab es zudem mehr Todesfälle (24,3%) bei den Patienten, deren IL-6- und IL-7-Level beide oberhalb der genannten Cut-offs lagen als bei denen, bei denen dies nur für einen bzw. keinen der Werte zutraf (4,6%, p=0,01).

IL-6 war bei SSc-ILD-Patienten (n=43) und SSc-PH-ILD-Patienten (n=10) signifikant höher als bei lungengesunden SSc-Patienten (n=65) (p=0,0075 und p=0,0045). Hingegen waren CCL2 bei SSc-PAH-Patienten (n=7) und CCL4 bei SSc-ILD-Patienten signifikant niedriger als bei

lungengesunden SSc-Patienten ($p=0,0321$ und $p=0,0346$). Für sonstige Serumzytokine (IL-7, IL-8, TGF- β , TNF- α) ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Niedrige IL-10-Level (Cut-off 0,16 pg/ml, AUC 0,729) waren bei SSc-Patienten ohne pulmonale Beteiligung mit einem DLCO-Abfall $> 20\%$ assoziiert (HR 0,064, 95% CI 0,006-0,744). In der gleichen Patientengruppe waren CCL2-Werte $< 60,4$ pg/ml zwar statistisch signifikant, aber gering mit einem FVC-Anstieg $> 10\%$ assoziiert (HR 0,972, 95% CI 0,947-0,997). Höhere IL-7-Werte waren mit einem DLCO-Abfall bei SSc-ILD-Patienten assoziiert (HR für einen DLCO-Abfall $> 20\%$ 1,591, 95% CI 1,078-2,349 bzw. HR für einen DLCO-Abfall $> 30\%$ 1,996, 95% CI 1,078-3,695). Optimaler Cut-off für die Vorhersage eines derartigen DLCO-Abfalls war hierbei für IL-7 $> 2,2$ pg/ml (AUC 0,713) (DLCO-Abfall $> 20\%$) bzw. IL-7 $> 3,7$ pg/ml (AUC 0,726) (DLCO-Abfall $> 30\%$).

Beim Vergleich von Zytokinleveln in Serum und BAL bei 21 SSc-ILD-Patienten zeigten sich IL-7 und IL-8 in BAL signifikant höher ($p=0,0445$ und $p<0,0001$), CCL4 und TNF- α in BAL hingegen signifikant niedriger ($p=0,0153$ und $p=0,0138$). Korrelationen ergaben sich zwischen IL-8 im Serum und IL-8 und TNF- α in BAL ($r=0,574$ und $r=0,521$) sowie zwischen TGF- β im Serum und IL-7, IL-10, CCL2 und TNF- α in BAL ($r=0,626$, $r=0,466$, $r=0,488$ und $r=0,570$).

6. Anti-AT₁R-AK- und Anti-ET_AR-AK-Level sind bei PAH-Patienten mit zugrunde liegender rheumatologischer Erkrankung (CTD, SSc) höher als bei anderen PAH-Patienten. Sie können bei SSc-Patienten PAH und bei SSc-PAH-Patienten Mortalität vorhersagen und wirken im Tiermodell pathogen an Lungengefäßen.

Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK waren signifikant höher bei SSc-Patienten mit und ohne PAH sowie CTD-PAH-Patienten als bei Patienten mit IPAH, CTEPH oder CHD. Gemessen an bereits zuvor ermittelten Grenzwerten für diese Antikörper (Anti-AT₁R-AK $> 9,2$ units und Anti-ET_AR-AK $> 10,4$ units) [19] waren SSc-PAH- und CTD-PAH-Patienten häufiger Antikörper-positiv (69% und 63% der Patienten für Anti-AT₁R-AK und 65% und 55% für Anti-ET_AR-AK) als IPAH-, CHD- oder CTEPH-Patienten (21%, 21% und 8 % der Patienten für Anti-AT₁R-AK und 11%, 14% und 0% für Anti-ET_AR-AK).

Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK konnten bei SSc-Patienten ($n=253$) eine PAH vorhersagen (AUC 0,642 bzw. 0,633). Bei einem Cut-off von 19 units (Anti-AT₁R-AK) bzw. 23 units (Anti-ET_AR-AK) betrug die entsprechende HR 4,3 bzw. 2,7. Bei SSc-PAH-Patienten ($n=81$) korrelierten die Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK zudem stark miteinander.

Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK konnten bei SSc-PAH-Patienten Mortalität vorhersagen. Je nach betrachteter Kohorte ergaben sich hierbei unterschiedliche Cut-offs: In einer Kohorte von 44 SSc-PAH-Patienten (mit und ohne ILD) ergab die ROC-Analyse einen optimalen Cut-off von 21,4 units und eine AUC von 0,701 für Anti-AT₁R-AK und einen Cut-off von 20,4 units und eine AUC von 0,698 für Anti-ET_AR-AK. Hingegen ergaben sich in einer zentrenübergreifenden Kohorte von 70 SSc-PAH-Patienten (Charité Berlin/Hannover) für Anti-AT₁R-AK ein Cut-off von 15,8 units (AUC 0,669) und für Anti-ET_AR-AK ein Cut-off von 18,3 units (AUC 0,672). In letzterer Kohorte wurde der Mortalitätsunterschied allerdings nur für Anti-ET_AR-AK (HR 2,7, p=0,0271) signifikant. Für andere Patientengruppen (CTD-PAH, Non-CTD-PAH, alle Patienten mit PAH) konnten die Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK keine Mortalität vorhersagen.

Bezüglich anderer mit der SSc oder ihren Komplikationen assoziierter Autoantikörper (antinukleäre AK (ANA), Anti-Zentromer-AK (ACA), Anti-Scl-70-AK (Scl70), Anti-Pm-Scl-AK (PmScl), Anti-U1RNP-AK (U1RNP), Anti-RNA-Polymerase III-AK (Pol3)) zeigte sich weder zwischen SSc-PAH-Patienten und SSc-Patienten ohne Lungenbeteiligung noch zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohne ILD ein signifikanter Unterschied. Einzig SSc-ILD-Patienten waren im Vergleich zu lungengesunden SSc-Patienten häufiger Scl70-positiv und ACA-negativ. Im Tiermodell führte SSc-IgG zu einem signifikant höheren Calcium-Anstieg in den Lungengefäßen von Ratten als Kontroll-IgG. Dieser Effekt konnte durch den AT₁R-Blocker Valsartan bzw. den ET_AR-Blocker Sitaxsentan blockiert werden. Die Kontraktilität intralobärer Pulmonalarterien von Ratten in Reaktion auf Administration von Angiotensin II bzw. Endothelin 1 war nach Zugabe von Anti-AT₁R-AK- und Anti-ET_AR-AK-positivem IgG (von SSc-Patienten) signifikant erhöht und konnte durch Zugabe von Bosentan als ET_{A/B}R-Antagonisten bzw. Valsartan als AT₁R-Blocker wieder vermindert werden. Schließlich zeigte sich, dass SSc-IgG, nicht aber Kontroll-IgG gesunder Spender 7 Tage nach Injektion in den Lungen von Mäusen nachgewiesen werden konnte. Außerdem zeigten die mit SSc-IgG behandelten Mäuse eine verstärkte α -SMA-Expression in der Gefäßwand der Lungengefäße. Bei repetitiver SSc-IgG-Gabe konnte eine obliterative pulmonale Arteriopathie in den Mäusen nachgewiesen werden.

Diskussion

In unserer Studienpopulation konnte eine signifikant geringere Überlebensrate der SSc-PAH-Patienten mit ILD im Vergleich zu solchen ohne ILD nachgewiesen werden. Während Studien aus früheren Jahren [3, 14, 27] andere Ergebnisse erzielten, kamen zwei andere Studien aus den Jahren 2008 und 2009 [15, 16] zum gleichen Ergebnis. Im Jahr 2003 erschienen die

Veröffentlichungen von Mukerjee et al. [27] und Chang et al. [3], die keinen signifikanten Überlebensunterschied zwischen beiden Gruppen ausmachen konnten, mit allerdings recht unterschiedlichen Überlebensraten von etwa 55% (Mukerjee et al.) bzw. etwa 90% (Chang et al.) nach 3 Jahren. Es sei darauf hingewiesen, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine spezifische Therapie der PAH existierte und die Diagnosekriterien der PAH noch die Kategorie einer belastungsinduzierten pulmonalen Hypertonie umfassten. Chang et al. diagnostizierten eine PAH zudem anhand echokardiographischer Befunde, was insbesondere bei PAH-ILD-Patienten, die oft nur leicht erhöhte pulmonal-arterielle Drücke haben [28], zu Ungenauigkeiten geführt haben kann. Condliffe et al. [15] und Mathai et al. [16] hingegen wiesen einen Überlebensunterschied zuungunsten der SSc-PAH-ILD-Patienten nach, was wir in unseren Untersuchungen bestätigen konnten. Die Überlebensraten dieser beiden Autoren waren deutlich geringer als unsere, was möglicherweise durch die unterschiedlichen Studienpopulationen und unterschiedliche Therapieregimes erklärt werden kann.

Vor dem Hintergrund der hohen Mortalität von SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung ist die Suche nach Prädiktoren für diesen Verlauf von Bedeutung. NTproBNP ist als Prädiktor für einen erhöhten pulmonal-arteriellen Druck und damit eine PAH bekannt [29-32], konnte in unseren Untersuchungen aber nicht zur Differenzierung zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohneILD beitragen, was pathogenetisch zum Bild einer vaskulopathischen PAH im Gegensatz zu einer hypoxämischenILD passt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Kohorten [15] konnten weitere hämodynamische Parameter ebenfalls weder zwischen SSc-Patienten mit bzw. ohneILD differenzieren noch Mortalität im Allgemeinen bei SSc-PAH-Patienten vorhersagen. Ersteres könnte auf die Bedeutung der PAH für die Hämodynamik, letzteres auf einen von der kardialen Beeinträchtigung unabhängigen Pathomechanismus bei SSc-PAH-Patienten hinweisen. Die naheliegende Annahme, Lungenfunktionsparameter könnten die pulmonale Beteiligung von SSc-Patienten aufzeigen, konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden. Ein besonders vielversprechender Parameter scheint dabei die DLCO zu sein. Initiale DLCO-Werte konnten in unseren Untersuchungen zwischen SSc-Patienten mit bzw. ohne pulmonale Beteiligung im Allgemeinen und mit bzw. ohne PAH im Speziellen differenzieren. Dies ist in der Literatur verschiedentlich vorbeschrieben [15, 29, 33]. In der Praxis stellt sich die Frage, welcher Grenzwert der DLCO dafür gewählt werden sollte. Optimal erschien in unseren Untersuchungen ein Cut-off von 61% zur Vorhersage einer PAH bei SSc-Patienten (auch bei Allanore et al. 60% [30]), doch auch der schon vor Jahren von Steen et al. verwendete Cut-off von 55% [34] konnte in unserer Kohorte eine PAH vorhersagen. Die ebenfalls von Steen et al. beschriebene Beobachtung, die DLCO würde bei SSc-PH-Patienten im Gegensatz zu SSc-Patienten ohne

pulmonale Beteiligung im Verlauf der Erkrankung weiter abfallen [33], konnten wir in unseren Untersuchungen nicht bestätigen. Steen und Kollegen konnten weiterhin aufzeigen, dass ein FVC/DLCO-Quotient $> 1,4$ [34] bzw. $> 1,8$ [35] ein guter Marker zur Vorhersage von PAH bei SSc-Patienten ist. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Trad et al. (FVC/DLCO > 2) [14] und Hsu et al. (FVC/DLCO $> 1,6$) [26] und auch wir konnten dies für unsere Patienten bestätigen (FVC/DLCO $> 1,6$). Entgegen unserer Annahme, dass der FVC/DLCO-Quotient geeignet sein müsste, um SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohneILD voneinander zu unterscheiden, da SSc-PAH-ILD-Patienten definitionsgemäß niedrige FVC-Werte aufweisen, konnten wir dies leider nicht zeigen. Möglicherweise spielt dabei eine Rolle, dass wir keine SSc-Patienten mit isolierterILD, sondern stets die kombinierte PAH-ILD mit SSc-PAH-Patienten ohneILD verglichen haben.

Dyspnoe ist ein typisches Symptom sowohl der PAH als auch derILD. Ob jedoch das kombinierte Auftreten von PAH undILD zu verstärkter Dyspnoe führt, wird kontrovers diskutiert und konnte in unseren Untersuchungen nicht gezeigt werden. SSc-PAH-ILD-Patienten hatten hingegen bei Trad et al. signifikant häufiger Dyspnoe als SSc-ILD-Patienten ohne PAH [14] und SSc-PAH-ILD-Patienten bei Condliffe et al. signifikant höhere WHO-Grade als SSc-PAH-Patienten ohneILD [15]. Andere Autoren konnten keinen Zusammenhang zwischenILD und WHO-Grad herstellen [36]. Der 6MWT ist ein einfacher und nicht-invasiver Test zur Verlaufsbeurteilung von SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung, wobei der Einfluss durch die muskuloskeletale Beteiligung bei SSc im Hinterkopf behalten werden muss. PAH-Patienten mit einer Gehstrecke von mehr als 330 m haben signifikant höhere Überlebensraten als PAH-Patienten, die diese Strecke nicht zurückzulegen vermögen [37, 38]. Auch konnte der 6MWT zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohneILD diskriminieren [15]. Für unsere Patienten konnten wir dies nicht zeigen und stimmen darin mit einer größeren Metaanalyse aus dem Jahr 2016 überein [39]. Es ist allerdings zu bemerken, dass unsere Patienten insgesamt deutlich längere Gestrecken zurücklegten (Median 359 m bzw. 407 m für SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohneILD bei Diagnosestellung). Die maximale Sauerstoffaufnahme VO_{2max} konnte zwar nicht zwischen SSc-PAH-Patienten mit bzw. ohneILD differenzieren, war bei unseren Patienten aber im Vergleich zu SSc-Patienten ohne pulmonale und kardiale Beteiligung [40] drastisch reduziert. Es ist dabei anzumerken, dass auch SSc-Patienten ohne kardiale oder pulmonale Beteiligung eine reduzierte VO_{2max} haben, wenn man sie mit gesunden Kontrollen vergleicht [40].

Bei Patienten mit interstitieller Lungenerkrankung kommt es zu einer Leukozyteninfiltration in das betroffene Gewebe und einer Zytokinproduktion. Diese Zytokine können in bronchoalveolärer Lavage bestimmt werden [25]. Einfacher und kostengünstiger ist aber die Bestimmung entsprechender Zytokine aus dem Serum, so dass die Möglichkeit eines

Rückschlusses von Serumzytokinen auf eine lokale bronchopulmonale Zytokinproduktion von Interesse ist. IL-6 ist als Marker für Fibrose sowohl aus experimentellen [41, 42] als auch aus klinischen Studien bekannt [25, 43-46]. IL-6 ist sowohl bei SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen [43-45] als auch bei SSc-ILD- [25] und ILD-Patienten [45] höher als bei ILD-negativen Patienten. So zeigte sich auch in unseren Untersuchungen IL-6 bei SSc-ILD- und SSc-PH-ILD-Patienten signifikant höher als bei lungengesunden SSc-Patienten. Zudem war bei unseren SSc-Patienten bzw. SSc-Patienten mit pulmonaler Beteiligung IL-6 mit erhöhter Mortalität assoziiert und wir konnten hierfür für die verschiedenen Patientengruppen IL-6-Grenzwerte ausmachen, die einen Überlebensnachteil bedeuteten. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen anderer Autoren [45, 47]. Das Zytokin IL-7 hat bislang bezogen auf die SSc wenig Beachtung gefunden. Eine lokale IL-7-Produktion ist beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis bekannt [48]. Systemisch ist IL-7 beispielsweise bei Sarkoidose-Patienten erhöht [49], während es bei Patienten mit rheumatoider Arthritis [48, 50] oder SSc [51] im Serum erniedrigt zu sein scheint und sich auch bei unseren SSc-Patienten vergleichbar niedrig zeigte. Allerdings sind die Ergebnisse bezogen auf den Einfluss von IL-7 auf die Pathogenese der SSc widersprüchlich. Auf der einen Seite führte IL-7 im Mausmodell zur verstärkten Expansion autoreaktiver Lymphozyten [52, 53], und damit zu einer Autoimmunreaktion. Andererseits verminderte IL-7 in einem anderen Mausmodell das Ausmaß der interstitiellen Lungenerkrankung, gemessen an pulmonalem Hydroxyprolin- und Kollagengehalt [54]. Im gleichen Mausmodell verminderte IL-7-Administration die TGF- β -Produktion. In unseren Untersuchungen konnten wir allerdings keine Korrelation zwischen IL-7 und TGF- β im Serum feststellen. Des Weiteren untersuchten wir die Zytokine CCL2 und CCL4. CCL2 war in unseren Untersuchungen bei SSc-PAH-Patienten signifikant niedriger als bei lungengesunden SSc-Patienten. Dies war unerwartet, denn in einer anderen Untersuchung zählte das CCL2-Gen zu den 20 am stärksten hochregulierten Genen [55] bei SSc-PAH- wie auch bei SSc-ILD-Patienten. CCL2 zeigte sich auch bei anderen Autoren bei SSc-Patienten [43] oder SSc-Patienten mit ILD [25, 56] erhöht und korrelierte mit dem Schweregrad der Lungenerkrankung [56, 57]. CCL4 zeigte sich in unseren Untersuchungen an SSc-ILD-Patienten signifikant erniedrigt im Vergleich zu lungengesunden SSc-Patienten. In einer anderen Studie war CCL4 bei SSc-Patienten mit Lungenbeteiligung nicht signifikant erhöht [58].

Es gibt in der Literatur verschiedene Hinweise darauf, dass Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK zu einer Vaskulopathie führen und somit pathogen sind. Sie treten beispielsweise bei Patienten mit Abstoßungsreaktionen nach Nieren- oder Herztransplantationen [59, 60] und bei Patienten mit Präeklampsie [61] auf. Gleichzeitig können ET_{A/B}R-Antagonisten wie Bosentan und AT₁R-

Blocker wie Valsartan die Vaskulopathie bei der SSc abmildern, indem sie zu einer Vasodilatation führen, und geben so einen Hinweis auf eine AT₁- und ET_A-Rezeptor-vermittelte Pathogenese der SSc bzw. SSc-PAH [62, 63]. Auch in unseren Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf Pathogenität der Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK im Tiermodell, wo antikörperreiches Serum von SSc-Patienten in intralobären Pulmonalarterien von Ratten zu einer Aktivierung der AT₁- und ET_A-Rezeptoren führte, die durch Bosentan und Valsartan wiederum inhibiert werden konnte und in Mäusen bei repetitiver Gabe zu einer obliterativen pulmonalen Arteriopathie führte. In anderen Studien ergaben sich Hinweise auf eine SSc-IgG-vermittelte Zytokinproduktion und T-Zell- sowie Neutrophilenmigration [21, 64]. Interessanterweise ergab sich in o.g. Versuch nach Aktivierung der AT₁- und ET_A-Rezeptoren eine verstärkte Kontraktilität auf Angiotensin II, die durch Bosentan (!) verhindert wurde und eine verstärkte Reaktion auf Endothelin-1, die durch Valsartan (!) vermindert wurde. Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK korrelieren zudem stark miteinander, so dass man die Möglichkeit einer Heterodimerisierung der Rezeptoren diskutieren könnte [65]. Anti-AT₁R-AK und Anti-ET_AR-AK sind bei SSc im Vergleich zu anderen rheumatologischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem Sjögren Syndrom, dem Raynaud-Syndrom oder der Morphea signifikant erhöht [19]. Zudem sind sie aber bei SSc-Patienten mit PAH im Vergleich zu SSc-Patienten ohne PAH erhöht. Unserer Ansicht nach stellen sie daher einen interessanten Screeningparameter für SSc-Patienten auf der Suche nach einer PAH dar, der gegebenenfalls in andere, bereits existierende Screeningalgorithmen implementiert werden könnte. So existiert beispielsweise der Detect-Algorithmus der gleichnamigen Studie, der FVC/DLCO, Vorhandensein von Teleangiektasien, ACA, NTproBNP, Harnsäure und Rechtstyp im EKG und in einem zweiten Schritt echokardiographische Befunde umfasst und damit eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 35% erreicht [66]. Etwa zeitgleich entwickelten Thakkar et al. den sog. ASIG-Algorithmus, der mit Hilfe von NTproBNP, DLCO und FVC/DLCO eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 77,8% für SSc-PAH-Patienten erreicht [67]. Ein anderer Score ist der Cochin Risk Prediction Score, der in der Ausgangsuntersuchung anhand von Alter, FVC und DLCO/VA eine PAH bei SSc-Patienten mit einer Sensitivität von 93,8% und einer Spezifität von 73,5% vorhersagen konnte [68]. In einer Folgeuntersuchung an einer anderen Kohorte ergab sich für diesen Score jedoch eine deutlich geringere Sensitivität [69].

Zusammenfassend erscheint es wahrscheinlich, dass die Vaskulopathie eine wichtige Ursache für die erhöhte Mortalität von SSc-PAH- und SSc-PAH-ILD-Patienten ist, wenngleich sich dies nicht an hämodynamischen Parametern zeigen ließ. Sowohl die Ergebnisse aus den Tierversuchen mit erhöhter Kontraktilität intralobärer Pulmonalarterien und obliterativer

pulmonaler Arteriopathie als auch der Nachweis einer systemischen Autoimmunreaktion lassen dies als wahrscheinlich erscheinen. Dies unterstreicht Sinn und Zweck einer frühzeitigen Therapie der Vaskulopathie. Es bleibt zu hoffen, dass die neueren Erkenntnisse über die Pathogenese der pulmonalen Komplikationen der SSc diese eines Tages in den Hintergrund rücken lassen. Dies bedarf allerdings weiterer intensiver Forschung.

Literaturverzeichnis

1. Wissenschaftlicher Rat der Dudenredaktion (Hrsg.). Duden Die deutsche Rechtschreibung. 2006, Mannheim: Dudenverlag.
2. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, Airo P, Cozzi F, Carreira PE, Bancel DF, Allanore Y, Muller-Ladner U, Distler O, Iannone F, Pellerito R, Pileckyte M, Miniati I, Ananieva L, Gurman AB, Damjanov N, Mueller A, Valentini G, Riemekasten G, Tikly M, Hummers L, Henriques MJ, Caramaschi P, Scheja A, Rozman B, Ton E, Kumanovics G, Coleiro B, Feierl E, Szucs G, Von Muhlen CA, Riccieri V, Novak S, Chizzolini C, Kotulska A, Denton C, Coelho PC, Kotter I, Simsek I, de la Pena Lefebvre PG, Hachulla E, Seibold JR, Rednic S, Stork J, Morovic-Vergles J, Walker UA (2010) Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 69:1809-15
3. Chang B, Wigley FM, White B, Wise RA (2003) Scleroderma patients with combined pulmonary hypertension and interstitial lung disease. *J Rheumatol* 30:2398-405
4. Pope JE, Lee P, Baron M, Dunne J, Smith D, Docherty PS, Bookman A, Abu-Hakima M (2005) Prevalence of elevated pulmonary arterial pressures measured by echocardiography in a multicenter study of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 32:1273-8
5. Avouac J, Airo P, Meune C, Beretta L, Dieude P, Caramaschi P, Tiev K, Cappelli S, Diot E, Vacca A, Cracowski JL, Sibilia J, Kahan A, Matucci-Cerinic M, Allanore Y (2010) Prevalence of pulmonary hypertension in systemic sclerosis in European Caucasians and metaanalysis of 5 studies. *J Rheumatol* 37:2290-8
6. Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, Verpillat P (2019) Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Clin Epidemiol* 11:257-273
7. Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y (2012) Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)* 51:1017-26
8. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Naden RP, Medsger TA, Jr., Carreira PE, Riemekasten G, Clements PJ, Denton CP, Distler O, Allanore Y, Furst DE, Gabrielli A, Mayes MD, van Laar JM, Seibold JR, Czirjak L, Steen VD, Inanc M, Kowal-Bielecka O, Muller-Ladner U, Valentini G, Veale DJ, Vonk MC, Walker UA, Chung L, Collier DH, Ellen Csuka M, Fessler BJ, Guiducci S, Herrick A, Hsu VM, Jimenez S, Kahaleh B, Merkel PA, Sierakowski S, Silver RM, Simms RW, Varga J, Pope JE (2013) 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 72:1747-55
9. Romanowska-Prochnicka K, Walczyk M, Olesinska M (2016) Recognizing systemic sclerosis: comparative analysis of various sets of classification criteria. *Reumatologia* 54:296-305

10. Abraham DJ, Varga J (2005) Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 26:587-95
11. McNearney TA, Reveille JD, Fischbach M, Friedman AW, Lisse JR, Goel N, Tan FK, Zhou X, Ahn C, Feghali-Bostwick CA, Fritzler M, Arnett FC, Mayes MD (2007) Pulmonary involvement in systemic sclerosis: associations with genetic, serologic, sociodemographic, and behavioral factors. *Arthritis Rheum* 57:318-26
12. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M, Aboyans V, Vaz Carneiro A, Achenbach S, Agewall S, Allanore Y, Asteggiano R, Paolo Badano L, Albert Barbera J, Bouvaist H, Bueno H, Byrne RA, Carerj S, Castro G, Erol C, Falk V, Funck-Brentano C, Gorenflo M, Granton J, Jung B, Kiely DG, Kirchhof P, Kjellstrom B, Landmesser U, Lekakis J, Lionis C, Lip GY, Orfanos SE, Park MH, Piepoli MF, Ponikowski P, Revel MP, Rigau D, Rosenkranz S, Voller H, Luis Zamorano J (2016) 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 37:67-119
13. Cappelli S, Bellando Randone S, Camiciottoli G, De Paulis A, Guiducci S, Matucci-Cerinic M (2015) Interstitial lung disease in systemic sclerosis: where do we stand? *Eur Respir Rev* 24:411-9
14. Trad S, Amoura Z, Beigelman C, Haroche J, Costedoat N, Boutin le TH, Cacoub P, Frances C, Wechsler B, Grenier P, Piette JC (2006) Pulmonary arterial hypertension is a major mortality factor in diffuse systemic sclerosis, independent of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 54:184-91
15. Condliffe R, Kiely DG, Peacock AJ, Corris PA, Gibbs JS, Vrapai F, Das C, Elliot CA, Johnson M, DeSoyza J, Torpy C, Goldsmith K, Hodgkins D, Hughes RJ, Pepke-Zaba J, Coghlan JG (2009) Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Am J Respir Crit Care Med* 179:151-7
16. Mathai SC, Hummers LK, Champion HC, Wigley FM, Zaiman A, Hassoun PM, Girgis RE (2009) Survival in pulmonary hypertension associated with the scleroderma spectrum of diseases: impact of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* 60:569-77
17. Young A, Vummidi D, Visovatti S, Homer K, Wilhalme H, White ES, Flaherty K, McLaughlin V, Khanna D (2019) Prevalence, Treatment, and Outcomes of Coexistent Pulmonary Hypertension and Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 71:1339-1349
18. The EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR): The EUSTAR-database – Project description. Internet. Accessed October 12,2016. Available from: <http://www.eustar.org/application/EUSTAR%20cohort%20description%20UW%2014.01.08%20English%20version.doc>.
19. Riemekasten G, Philippe A, Nather M, Slowinski T, Muller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirjak L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D (2011) Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 70:530-6
20. EIA for Quantitative Determination of Anti-AT1R Antibodies. Internet. Accessed October 13,2016. Available from: http://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/securedocs/docs/Product_Insert/AT1R-ANTI-PI-EN-00.pdf

21. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kuhl AA, Gunther J, Radic M, Becker MO, Heidecke H, Worm M, Witzernath M, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G (2014) Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther* 16:R29
22. Samapati R, Yang Y, Yin J, Stoerger C, Arenz C, Dietrich A, Gudermann T, Adam D, Wu S, Freichel M, Flockerzi V, Uhlig S, Kuebler WM (2012) Lung endothelial Ca²⁺ and permeability response to platelet-activating factor is mediated by acid sphingomyelinase and transient receptor potential classical 6. *Am J Respir Crit Care Med* 185:160-70
23. Kerem A, Yin J, Kaestle SM, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, Kuebler WM (2010) Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circ Res* 106:1103-16
24. Lukitsch I, Kehr J, Chaykovska L, Wallukat G, Nieminen-Kelha M, Batuman V, Dragun D, Gollasch M (2012) Renal ischemia and transplantation predispose to vascular constriction mediated by angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies. *Transplantation* 94:8-13
25. Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, Witt C, Meisel C, Hanitsch LG, Becker MO, Huscher D, Burmester GR, Riemekasten G (2009) Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 11:R111
26. Hsu VM, Chung L, Hummers LK, Wigley F, Simms R, Bolster M, Silver R, Fischer A, Hinchcliff ME, Varga J, Goldberg AZ, Derk CT, Schioppa E, Khanna D, Shapiro LS, Domsic RT, Medsger T, Mayes MD, Furst D, Csuka ME, Molitor JA, Alkassab F, Steen VD (2014) Development of pulmonary hypertension in a high-risk population with systemic sclerosis in the Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma (PHAROS) cohort study. *Semin Arthritis Rheum* 44:55-62
27. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, Black CM, Coghlan JG (2003) Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 62:1088-93
28. Girgis RE, Mathai SC (2007) Pulmonary hypertension associated with chronic respiratory disease. *Clin Chest Med* 28:219-32
29. Hesselstrand R, Wildt M, Ekmehag B, Wuttge DM, Scheja A (2011) Survival in patients with pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis from a Swedish single centre: prognosis still poor and prediction difficult. *Scand J Rheumatol* 40:127-32
30. Allanore Y, Borderie D, Avouac J, Zerkak D, Meune C, Hachulla E, Mouthon L, Guillevin L, Meyer O, Ekindjian OG, Weber S, Kahan A (2008) High N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels and low diffusing capacity for carbon monoxide as independent predictors of the occurrence of precapillary pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 58:284-91
31. Mukerjee D, Yap LB, Holmes AM, Nair D, Ayrton P, Black CM, Coghlan JG (2003) Significance of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 97:1230-6
32. Williams MH, Handler CE, Akram R, Smith CJ, Das C, Smee J, Nair D, Denton CP, Black CM, Coghlan JG (2006) Role of N-terminal brain natriuretic peptide (N-TproBNP) in scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 27:1485-94
33. Steen V, Medsger TA, Jr. (2003) Predictors of isolated pulmonary hypertension in patients with systemic sclerosis and limited cutaneous involvement. *Arthritis Rheum* 48:516-22
34. Steen VD, Graham G, Conte C, Owens G, Medsger TA, Jr. (1992) Isolated diffusing capacity reduction in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 35:765-70

35. Steen V (2005) Advancements in diagnosis of pulmonary arterial hypertension in scleroderma. *Arthritis Rheum* 52:3698-700
36. Fischer A, Swigris JJ, Bolster MB, Chung L, Csuka ME, Domsic R, Frech T, Hinchcliff M, Hsu V, Hummers LK, Gomberg-Maitland M, Mathai SC, Simms R, Steen VD (2014) Pulmonary hypertension and interstitial lung disease within PHAROS: impact of extent of fibrosis and pulmonary physiology on cardiac haemodynamic parameters. *Clin Exp Rheumatol* 32:S-109-14
37. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, Nakanishi N, Miyatake K (2000) Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med* 161:487-92
38. Provencher S, Sitbon O, Humbert M, Cabrol S, Jais X, Simonneau G (2006) Long-term outcome with first-line bosentan therapy in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 27:589-95
39. Vandecasteele E, De Pauw M, De Keyser F, Decuman S, Deschepper E, Piette Y, Brusselle G, Smith V (2016) Six-minute walk test in systemic sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 212:265-73
40. de Oliveira NC, dos Santos Sabbag LM, Ueno LM, de Souza RB, Borges CL, de Sa Pinto AL, Lima FR (2007) Reduced exercise capacity in systemic sclerosis patients without pulmonary involvement. *Scand J Rheumatol* 36:458-61
41. O'Reilly S, Ciechomska M, Cant R, Hugel T, van Laar JM (2012) Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. *Cytokine Growth Factor Rev* 23:99-107
42. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, Asano Y, Kadono T, Sato S (2011) Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis Rheum* 63:3575-85
43. Codullo V, Baldwin HM, Singh MD, Fraser AR, Wilson C, Gilmour A, Hueber AJ, Bonino C, McInnes IB, Montecucco C, Graham GJ (2011) An investigation of the inflammatory cytokine and chemokine network in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 70:1115-21
44. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW (1992) Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 35:67-72
45. De Lauretis A, Sestini P, Pantelidis P, Hoyles R, Hansell DM, Goh NS, Zappala CJ, Visca D, Maher TM, Denton CP, Ong VH, Abraham DJ, Kelleher P, Hector L, Wells AU, Renzoni EA (2013) Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 40:435-46
46. De Santis M, Bosello S, La Torre G, Capuano A, Toluoso B, Pagliari G, Pistelli R, Danza FM, Zoli A, Ferraccioli G (2005) Functional, radiological and biological markers of alveolitis and infections of the lower respiratory tract in patients with systemic sclerosis. *Respir Res* 6:96
47. Muangchant C, Pope JE (2013) The significance of interleukin-6 and C-reactive protein in systemic sclerosis: a systematic literature review. *Clin Exp Rheumatol* 31:122-34
48. Churchman SM, Ponchel F (2008) Interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 47:753-9
49. Patterson KC, Franek BS, Muller-Quernheim J, Sperling AI, Sweiss NJ, Niewold TB (2013) Circulating cytokines in sarcoidosis: phenotype-specific alterations for fibrotic and non-fibrotic pulmonary disease. *Cytokine* 61:906-11
50. Ponchel F, Verburg RJ, Bingham SJ, Brown AK, Moore J, Protheroe A, Short K, Lawson CA, Morgan AW, Quinn M, Buch M, Field SL, Maltby SL, Masurel A, Douglas SH,

- Straszynski L, Fearon U, Veale DJ, Patel P, McGonagle D, Snowden J, Markham AF, Ma D, van Laar JM, Papadaki HA, Emery P, Isaacs JD (2005) Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis: consequences for therapy-induced lymphopenia. *Arthritis Res Ther* 7:R80-92
51. Makino T, Fukushima S, Wakasugi S, Ihn H (2009) Decreased serum IL-7 levels in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 27:68-9
 52. Calzascia T, Pellegrini M, Lin A, Garza KM, Elford AR, Shahinian A, Ohashi PS, Mak TW (2008) CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2999-3004
 53. Pathak K (2014) The expanding role of IL-7 and thymic stromal lymphopoietin as therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 18:581-94
 54. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, Burdick MD, Lin YQ, Dohadwala M, Gardner B, Batra RK, Strieter RM, Dubinett SM (2002) IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 109:931-7
 55. Hsu E, Shi H, Jordan RM, Lyons-Weiler J, Pilewski JM, Feghali-Bostwick CA (2011) Lung tissues in patients with systemic sclerosis have gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 63:783-94
 56. Yalcinkaya Y, Cinar S, Artim-Esen B, Kamali S, Ocal L, Deniz G, Inanc M (2016) The relationship between vascular biomarkers and disease characteristics in systemic sclerosis: elevated MCP-1 is predominantly associated with fibrotic manifestations. *Clin Exp Rheumatol* 34 Suppl 100:110-114
 57. Wu M, Baron M, Pedroza C, Salazar GA, Ying J, Charles J, Agarwal SK, Hudson M, Pope J, Zhou X, Reveille JD, Fritzler MJ, Mayes MD, Assassi S (2017) CCL2 in the Circulation Predicts Long-Term Progression of Interstitial Lung Disease in Patients With Early Systemic Sclerosis: Data From Two Independent Cohorts. *Arthritis Rheumatol* 69:1871-1878
 58. Hasegawa M, Sato S, Takehara K (1999) Augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 117:159-65
 59. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schonemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G (2005) Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 352:558-69
 60. Hiemann NE, Meyer R, Wellenhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, Hetzer R, Dragun D (2012) Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation* 94:919-24
 61. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC (1999) Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 103:945-52
 62. Opitz CF, Ewert R (2006) Dual ET(A)/ET(B) vs. selective ET(A) endothelin receptor antagonism in patients with pulmonary hypertension. *Eur J Clin Invest* 36 Suppl 3:1-9
 63. Chaumais MC, Macari EA, Sitbon O (2013) Calcium-channel blockers in pulmonary arterial hypertension. *Handb Exp Pharmacol* 218:161-75
 64. Gunther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, Radi M, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G (2014) Angiotensin receptor type 1 and endothelin

- receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 16:R65
65. Barnes PJ (2006) Receptor heterodimerization: a new level of cross-talk. *J Clin Invest* 116:1210-2
 66. Coghlan JG, Denton CP, Grunig E, Bonderman D, Distler O, Khanna D, Muller-Ladner U, Pope JE, Vonk MC, Doelberg M, Chadha-Boreham H, Heinzl H, Rosenberg DM, McLaughlin VV, Seibold JR, on behalf of the Dsg (2013) Evidence-based detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: the DETECT study. *Ann Rheum Dis*
 67. Thakkar V, Stevens WM, Prior D, Moore OA, Byron J, Liew D, Patterson K, Hissaria P, Roddy J, Zochling J, Sahhar J, Nash P, Tymms K, Celermajer D, Gabbay E, Youssef P, Proudman SM, Nikpour M (2012) N-terminal pro-brain natriuretic peptide in a novel screening algorithm for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 14:R143
 68. Meune C, Avouac J, Airo P, Beretta L, Dieude P, Wahbi K, Caramaschi P, Tiev K, Cappelli S, Diot E, Vacca A, Cracowski JL, Sibilia J, Kahan A, Matucci-Cerinic M, Allanore Y (2011) Prediction of pulmonary hypertension related to systemic sclerosis by an index based on simple clinical observations. *Arthritis Rheum* 63:2790-6
 69. Hachulla E, Clerson P, Humbert M (2012) Could the "Cochin risk prediction score" be applied in daily practice to predict pulmonary hypertension in systemic sclerosis? *Arthritis Rheum*

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marissa Michelfelder, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Biomarker und klinisch-diagnostische Parameter bei pulmonaler arterieller Hypertonie im Rahmen der systemischen Sklerose‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe ‚Uniform Requirements for Manuscripts (URM)‘ des ICMJE – www.icmje.org –) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Marissa Michelfelder, geb. Kutsche, hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Becker MO, Kill A, **Kutsche M**, Guenther J, Rose A, Tabeling C, Witzenrath M, Kühl AA, Heidecke H, Ghofrani HA, Tiede H, Schermuly RT, Nickel N, Hoepfer MM, Lukitsch I, Gollasch M, Kuebler WM, Bock S, Burmester GR, Dragun D, and Riemekasten G (2014) Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 190:808-17

Beitrag im Einzelnen: Erhebung epidemiologischer und klinischer Parameter von 62 SSc-PAH-Patienten (S. 30: Tab. 1, linke Spalte), ROC-Kurven-Analyse (S. 32: Tab. 2), statistische Analyse und Anfertigung der entsprechenden Grafiken bzgl. des prädiktiven Wertes der Autoantikörper zur Vorhersage einer PAH (S. 33: Abb. 2A, 2B oben, 2C und 2D) bzw. zur Vorhersage der Mortalität (S. 34: Abb. 3A, 3B oben), statistische Analyse und Anfertigung der entsprechenden Grafiken, Revision des Manuskripts

Publikation 2: **Michelfelder M**, Becker M, Riedlinger A, Siegert E, Dromann D, Yu X, Petersen F and Riemekasten G (2017) Interstitial lung disease increases mortality in systemic sclerosis patients with pulmonary arterial hypertension without affecting hemodynamics and exercise capacity. *Clin Rheumatol* 36:381-390

Beitrag im Einzelnen: Konzeptionelle Planung und Erarbeitung der Fragestellung, Datenerhebung sämtlicher veröffentlichter Daten, Analyse und -interpretation aller verwendeten Daten nach Rücksprache sowie Erstellung aller Abbildungen und Tabellen, Anfertigung des Manuskripts, Einarbeitung der interpretatorischen und gestaltungstechnischen Vorschläge der Co-Autoren sowie des veröffentlichenden Journals, Revision des Manuskripts

Publikation 3: Becker MO, Radic M, Schmidt K, Huscher D, Riedlinger A, **Michelfelder M**, Meisel C, Ewert R, Burmester GR, Riemekasten G (2019) Serum cytokines and their predictive value in pulmonary involvement of systemic sclerosis. *Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung disease* 36(4):274-84

Beitrag im Einzelnen: Erhebung epidemiologischer und hämodynamischer/
Lungenfunktionsparameter von 7 SSc-PAH-ILD-Patienten (S. 52: Tab. 1, Spalte 2), Anfertigung
von Teilen des Manuskripts (u.a. S. 57: Diskussion über IL-7), Formatierung und Revision des
Manuskripts

Unterschrift der Doktorandin

Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, Witzernath M, Kühl AA, Heidecke H, Ghofrani HA, Tiede H, Schermuly RT, Nickel N, Hoeper MM, Lukitsch I, Gollasch M, Kuebler WM, Bock S, Burmester GR, Dragun D, and Riemekasten G (2014) Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 190:808-17

<https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0442OC>

Michelfelder M, Becker M, Riedlinger A, Siegert E, Dromann D, Yu X, Petersen F and Riemekasten G (2017) Interstitial lung disease increases mortality in systemic sclerosis patients with pulmonary arterial hypertension without affecting hemodynamics and exercise capacity. Clin Rheumatol 36:381-390

<https://doi.org/10.1007/s10067-016-3504-6>

SERUM CYTOKINES AND THEIR PREDICTIVE VALUE IN PULMONARY INVOLVEMENT OF SYSTEMIC SCLEROSIS

Mike Oliver Becker^{*1}, Mislav Radic^{*2}, Katrin Schmidt³, Dörte Huscher⁴, Arne Riedlinger^{3,5}, Marissa Michelfelder^{3,6}, Christian Meiself, Ralf Ewert⁸, Gerd-Rüdiger Burmester³, Gabriela Riemekasten⁹

¹ University Hospital Zürich, Dept of Rheumatology, Zürich, Switzerland; ² University Hospital Split, Dept of Rheumatology and Clinical Immunology, Croatia; ³ University Hospital Charité, Dept of Rheumatology and Clinical Immunology, Berlin, Germany; ⁴ German Rheumatism Research Centre (DRFZ), a Leibniz Institute, Epidemiology Unit, Berlin, Germany; ⁵ Dept of Neurology, Asklepios Hospital, Teupitz, Germany; ⁶ Dept of Anesthesiology, University Hospital Bonn, Germany; ⁷ University Hospital Charité, Clinical Laboratory, Berlin, Germany; ⁸ University Medicine Greifswald, Department of Internal Medicine B - Cardiology, Intensive Care, Pulmonary Medicine and Infectious Diseases; ⁹ University Hospital Lübeck, Dept of Rheumatology and Research Center Borstel, a Leibniz institute

ABSTRACT. *Objective:* To identify serum cytokines which predict mortality and/or disease progression in patients with systemic sclerosis, especially with pulmonary involvement. *Methods:* Serum cytokines (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, CCL2, CCL4, TGF- β , TNF- α) were measured in 125 SSc patients, who were recruited and observed in our outpatient clinic. Of these, 60 had pulmonary involvement, classified as either interstitial lung disease (ILD, 43 patients), pulmonary arterial hypertension (PAH, 7 patients) or pulmonary hypertension and ILD (PH-ILD, 10 patients). The association of serum cytokines with clinical features was analysed and their correlation with BAL cytokines measured in a subset of SSc patients with ILD. *Results:* Serum cytokines were detected at different levels: high (TGF- β , median 287.5 pg/ml; CCL2, median 89.7 pg/ml; CCL4, median 104.2 pg/ml), low (IL-6, median 3.2 pg/ml; IL-7 median 2.3 pg/ml; IL-8, median 5.2 pg/ml; TNF- α , median 0 pg/ml but with a bimodal distribution) and very low (IL-10, median 0.4 pg/ml). IL-6 and IL-7 were predictive for death in a Cox regression analysis in all SSc patients as well as in all patients with pulmonary involvement; IL-6 was predictive for mortality in SSc-ILD patients. In a multivariate analysis, cytokine levels could also predict a change in lung function, e.g. IL-7 was a predictor for a decline of diffusion capacity (DLCO) by 20 or 30% in ILD patients. In a subset of ILD patients, serum cytokines were compared to BAL cytokines, but revealed only few correlations. *Conclusion:* In conclusion, the analysis of serum cytokines implicates a role as biomarkers, distinct from BAL. (*Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2019; 36 (4): 274-284)

KEY WORDS: systemic sclerosis, cytokines, chemokines, lung involvement, survival

Received: 9 August 2019

Accepted after revision: 20 September 2019

Correspondence: Dr Mike Becker

Dept. of Rheumatology,
University Hospital Zürich
Switzerland

Tel. 0041 44 255 3543

Fax: 0041 255 4415

E-mail: mikeoliver.becker@usz.ch

* equal contribution

List of abbreviations

ACA	Anti-centromere antibodies
ACR	American College of Rheumatology
Anti-RNAP III	RNA polymerase III
Anti-Scl70	Anti-topoisomerase
AUC	Area under the curve
AZA	Azathioprine
BAL	Bronchoalveolar lavage
CCL18	CC-chemokine ligand 18

CCL2	CC-chemokine ligand 2
CCL4	CC-chemokine ligand 4
CI	Confidence interval
CYC	Cyclophosphamide
DLCO	Diffusion capacity for carbon monoxide
EULAR	European League Against Rheumatism
FVC	Forced vital capacity
HR	Hazard ratio
HRCT	High resolution computed tomography
IFN-g	Interferon gamma
IL-10	Interleukin-10
IL-6	Interleukin-6
IL-7	Interleukin-7
IL-8	Interleukin-8
ILD	Interstitial lung disease
IQR	Interquartile range
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1 (=CCL2)
MIP-1b	Macrophage inflammatory protein 1 beta (=CCL4)
MMF	Mycophenolate mofetil
mRSS	Modified Rodnan skin score
MTX	Methotrexate
PAH	Pulmonary arterial hypertension
PH	Pulmonary hypertension
PH-ILD	Pulmonary hypertension associated with interstitial lung disease
ROC	Receiver operating characteristics
SD	Standard deviation
SSc	Systemic sclerosis
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc, scleroderma) is a connective tissue disease characterised by vascular damage, inflammation and progressive fibrosis of the skin and other internal organs (1). The exact etiology of SSc is unknown, current concepts include genetic predisposition, environmental factors and an abnormal immune function (2, 3). At present, it is unclear how inflammation and vasculopathy translate into the later fibrotic stages that cause multiple end-stage organ damage and death (4). The activity and frequency of T cells and monocytes/macrophages is increased in the circulation and tissues of SSc patients. They produce various cytokines, such as interleukin (IL)-8, CCL18, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , IL-6, and transforming growth factor (TGF)- β , that regulate inflamma-

tion and tissue fibrosis in SSc and are elevated in the serum of SSc patients (2, 5, 6). In addition, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1 or CCL2) and macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β or CCL4) have been implicated in the initiating phase and in the perpetuation of the inappropriate fibroblast activation and concomitant extracellular matrix deposition that characterise this disease (7, 8).

Pulmonary involvement, and amongst it interstitial lung disease, has become the main determinant of mortality in systemic sclerosis (9). Because treatment is only efficacious for some patients and harbors side effects (10), there is a need to identify patients whose pulmonary involvement will progress. Bronchoalveolar lavage (BAL) has been evaluated for its prognostic capability with contradicting results (11-13). Even less data are available for a BAL cytokine analysis, but there is some evidence that BAL cytokines could predict clinical worsening (14, 15). In a previous study, our group has identified associations between BAL cytokines and pulmonary involvement: IL-7, IL-4, IL-8, and CCL2 were associated with ILD and of these, IL-4, IL-8, CCL2 were negatively correlated with LFT and CCL2 also with the CT fibrosis score (14).

However, BAL is not a routine procedure and there is scarce knowledge about the correlation of BAL and serum cytokine levels. Hence, we investigated the predictive capacity of the serum cytokines for survival in our SSc cohort, especially in patients with pulmonary involvement.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Serum cytokines were measured in 125 SSc patients and all of these fulfilled the ACR/EULAR classification criteria for SSc (16). They were recruited consecutively during routine care through our outpatient clinic/ward and were followed up in our outpatient clinic. Of all 125 patients, 43 had interstitial lung disease (ILD) and 10 patients had ILD and pulmonary hypertension (named PH-ILD). 7 patients had pulmonary arterial hypertension (PAH). After approval of the local ethics committee of the Charité (EA1/013/705), patients were included on the basis of informed consent. For 21 of the patients

with interstitial lung disease (ILD), concomitant BAL and serum cytokine analysis was available. Clinical and laboratory characteristics of the enrolled SSc patients are shown in Table 1. Disease duration was defined as the time from onset of the first non-Raynaud's manifestation of SSc. The presence of anti-centromere antibodies (ACA), anti-topoisomerase I antibodies (Anti-Scl 70) and anti-RNA polymerase III antibodies (Anti-RNAP III) were determined by validated assays. Data were collected at the first visit and during follow-up. Only data from patients with serum cytokine measurements and available clinical evaluations were analysed. Missing items are indicated (e.g. in Table 1).

Clinical assessments

A complete medical history, physical examination and laboratory evaluation were obtained in each patient. Clinical assessment of skin sclerosis measured by modified Rodnan skin score (mRSS) was performed concurrently with blood sampling. SSc patients were classified according to the presence/absence of internal organ involvement at first visit, in which cytokine expression was measured, and during the follow up period (mean period 66.16±26.38 months). All patients were assessed for signs of lung fibrosis with pulmonary function tests and high-resolution computed tomography (HRCT) scans. Pulmonary fibrosis was defined by evidence of fibrosis such as bibasilar fibrosis on chest radiograms or HRCT scans or both. Pulmonary function tests included measurement of forced vital capacity (FVC) by flow-volume spirometry and pulmonary diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO) by single-breath test (Jaeger GmbH, Würzburg, Germany). Values for FVC and DLCO were expressed as percentages of predictive normal values adjusted for age, sex, and height. Pre-capillary pulmonary hypertension (PH) was defined as estimated right ventricular systolic pressure ≥ 25 mmHg at right heart catheterization and a wedge pressure ≤ 15 mmHg; in patients without ILD, pulmonary hypertension was defined as pulmonary arterial hypertension (PAH). Clinical and laboratory characteristics on the basis of pulmonary involvement of the enrolled SSc patients are shown in Table 1. Development of lung function and mortality was assessed during follow-up.

Serum cytokines and chemokine assays

Fresh venous blood samples were taken at the SSc patients' first visit. Samples were centrifuged shortly after clot formation. All serum samples were stored at -70°C prior to assays. For the detection of cytokines and chemokine concentrations, a commercially available bioplex system was used as previously described (14) for selected cytokines (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, CCL2, CCL4, TNF- α , and TGF β 1).

Statistical analysis

Descriptive statistics for continuous variables are presented either by the mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range, where appropriate, categorical variables as frequency (and percentage). Significant differences to the group without pulmonary involvement were determined using a student's t-test for normally distributed data or otherwise a Mann-Whitney test, and Fisher's exact test for categorical data. The Cox proportional hazards model was used to evaluate predictors of time to death, displayed with respective hazard ratio (HR) and 95% confidence interval (CI). Parameters assumed to be associated with an improvement or decline of lung function were assessed with univariate and, if statistically significant, subsequent multivariate logistic regression. Improvement or decline of lung function was categorized as follows: improvement was defined by an increase of FVC or DLCO over 10% (of absolute predicted values), and a decline of FVC and DLCO was determined to be over 10%, 20% or 30% (of absolute predicted values). P values less than 0.05 were considered significant. Only for those cytokines, that were significantly associated with an outcome in the Cox model, receiver operating characteristic curves (ROC) with the area under the curve (AUC) were calculated to determine discriminative power of cytokine levels for predicting mortality or increase/decline of lung function parameters. Cut-offs were determined by the minimal distance of the ROC to the graph coordinates $x=0, y=1$. All calculations were performed using IBM SPSS Statistics version 20 and Graphpad Prism 6.0.

Table 1. Clinical characteristics of 125 SSc patients

Clinical characteristics of patients	No pulmonary involvement (n = 65)	SSc-PAH (n = 7)	SSc PH-ILD (n = 10)	SSc-ILD (n = 43)
Female patients (%)	61 (93.8)	7 (100)	8 (80.0)	37 (86.0)
Age (mean±SD)	59.0±11.6	59.7±10.8	57.1±15.0	55.5±14.4
SSc form (dSSc/lSSc)	15/50	0/7	5/5	31/12 (p < 0.001)
Disease duration in years at inclusion/first visit (mean±SD)	7.5±7.6	12.7±10.3	3.3±3.2	5.7±7.0
Antibody profile (Scl70/ACA/Anti-RNAP III/Other) (n)	11/42/1/11	1/6/0/0	4/4/0/2	22/8/2/11 (p < 0.0001)
MRSS (median, IQR)	6 (3-10)	9 (5-16)	6.0 (5-16)	11 (8-18) (p < 0.0001)
Follow-up duration (months, mean±SD)	69.1±3.2	73.9±10.4	47.2±9.9 (p = 0.017)	64.6±4.1
Deceased patients (%)	2 (3.0)	1 (14.3)	4 (40.0) (p = 0.0023)	7 (16.3) (p = 0.028)
DLCO (% predicted, median, IQR) [#]	81.0 (71.1-90.0)	65.4 (43.6-83.1) (p=0.018)	42.7 (22.4-70.3) (p = 0.0005)	69.2 (57.8-80.8) (p = 0.0003)
FVC (% predicted, median, IQR) [#]	98.4 (85.0-109.)	94.5 (88.8-100)	72.0 (61.3-87.9) (p = 0.0002)	85.0 (72.6-99.4) (p = 0.0003)
DLCO decline >10% (%) [†]	33 (50.8)	5 (71.4)	4 (40.0)	23 (53.5)
DLCO decline >20% (n,%) [†]	14 (21.5)	3 (42.9)	3 (30.0)	13 (30.2)
FVC decline >10% (%) [†]	6 (9.2)	2 (28.6)	4 (40.0) (p < 0.024)	8 (18.6)
FVC decline >20% (%) [†]	1 (1.5)	0 (0)	1 (10.0)	5 (11.6) (p = 0.036)
Glucocorticoid use (%)	28 (43.1)	1 (14.3)	5 (50.0)	25 (58.1)
Immunosuppression (%) (CYC, MTX, AZA, MMF)	21 (32.3) [‡]	4 (57.1)	6 (60.0)	35 (81.4) (p < 0.0001)[‡]

Items are given as frequency (and percentage), mean and standard deviation (SD) for normally distributed data or median and interquartile range. Significant differences to the group without pulmonary involvement were calculated using a student's t-test for normally distributed data or a Mann-Whitney test, and Fisher's exact test for categorical data, and are marked in bold. # = only for 124 patients available. * = data only for 122 patients available.

1) Immunosuppression was mostly for progressive skin fibrosis, arthritis or myositis.

2) Of the 35 patients with immunosuppression, 14 received cyclophosphamide and 5 mycophenolate mofetil.

Abbreviations: SSc – systemic sclerosis; SSc-PAH – SSc-associated pulmonary arterial hypertension; PH-ILD – SSc-associated interstitial lung disease with pulmonary hypertension; SSc-ILD – SSc-associated interstitial lung disease; dSSc – diffuse systemic sclerosis; lSSc – limited systemic sclerosis; Scl70 – anti-topoisomerase I antibodies; ACA – anti-centromere antibodies; anti-RNAP III – anti-RNA-Polymerase III antibodies; mRSS – modified Rodnan skin score; FVC – forced vital capacity; DLCO – diffusion capacity for carbon monoxide; CYC – cyclophosphamide; MTX – methotrexate; AZA – azathioprine; MMF – mycophenolate mofetil; SD – standard deviation; IQR – interquartile range.

RESULTS

Clinical characteristics of SSc patients

All patients were classified according to the presence of pulmonary involvement at the first visit

and during the follow up period (Table 1). Patients with SSc-ILD had the highest proportion with diffuse SSc and anti-Scl70 positivity. According to pulmonary involvement, patients with SSc-ILD and PH-ILD had a lower FVC and DLCO. A decline >10% in FVC was most frequent in PH-ILD pa-

tients whereas a decline >20% was most frequent in ILD patients; in addition, immunosuppressive treatment was used more often in ILD. SSc-ILD and PH-ILD patients had the highest mortality during follow-up.

Serum cytokines in a cohort of 125 SSc patients

Serum cytokines could arbitrarily be grouped into three categories: high (TGF- β , median 287.5 pg/ml; CCL2, median 89.7 pg/ml; CCL4, median 104.2 pg/ml), low (IL-6, median 3.2 pg/ml; IL-7 median 2.3 pg/ml; IL-8, median 5.2 pg/ml; TNF- α , median 0 pg/ml, due to a bimodal distribution where most patients had undetectable levels of TNF- α) and very low (IL-10, median 0.4 pg/ml; Figure 1A). Patients with ILD and PH-ILD had higher serum levels of IL-6 than patients without pulmonary involvement ($p=0.0075$ and $p=0.0045$ respectively, Figure 1B), whereas CCL2 was lower in patients with PAH ($p=0.0321$, Figure 1C) and CCL4 was lower in ILD patients ($p=0.0346$, Figure 1D). Only a subset of patients had detectable levels of TNF- α , but there was no association between this cytokine and clinical features. Serum levels of IL-7 and TGF- β were not different between the patient subgroups (Figure 1E and 1F); however, 44.2% of SSc-ILD patients were above the 75th percentile of the TGF- β level of patients without pulmonary involvement (406 pg/ml; $p=0.04$). There were no statistically significant differences in serum cytokine levels between lSSc and dSSc patients within the subgroups of pulmonary involvement (data not shown).

Predictors of death

Of the SSc patients 125 patients in the cohort, we registered 14 deaths, of whom 7 were deemed SSc-related by the treating physicians, in 6 patients there was no information on this and 1 patient died breast cancer. In all patients, as well as in the subgroup with pulmonary involvement ($n=60$), in patients with PAH ($n=7$) or PH-ILD ($n=10$) or in patients with ILD ($n=43$), we calculated independently predictive factors for time to death with a Cox regression analysis using serum cytokine levels and clinical features (gender, age, SSc form, anti-Scl-70 and anti-centromere positivity, mRSS, DLCO, FVC, ILD and/or pulmonary hypertension at inclusion).

In the whole cohort, the presence of pulmonary hypertension at inclusion was the strongest predictor of time to death (HR 84.4, 95% CI 9.4-759.3), but a higher mRSS and a lower FVC were also associated with a higher likelihood of death (Table 2). IL-6 and IL-7 were also both predictive in this population (HR 1.017, 95% CI 1.008-1.026 and HR 1.256, 95% CI 1.056-1.495 respectively). These two cytokines were also able to predict mortality in the subset of patients with pulmonary involvement (HR 1.010, 95% CI 1.002-1.017 and HR 1.379, 95% CI 1.139-1.671 respectively), in addition to pulmonary hypertension at inclusion and a lower FVC (Table 2). No predictive items could be found for PAH and PH-ILD patients. However, in ILD patients, IL-6 was an independent factor associated with mortality (HR 1.033, 95% CI 1.011-1.055), next to a lower FVC (Table 2).

With cytokine cut-off levels calculated by a ROC analysis, Kaplan-Meier survival curves were generated for IL-6 and IL-7 in the respective level subsets (Figure 2). IL-6 and IL-7 cut-offs were able to define subgroups with a different mortality risk in the whole cohort (cut-off 4.75 pg/ml, AUC 0.724 and cut-off 2.62 pg/ml, AUC 0.686, respectively; Figure 2A). Furthermore, in the group of patients that had both IL-6 levels above 4.75 pg/ml and IL-7 levels above 2.62 pg/ml there were more deaths (24.3%) than in the group who had only one cytokine above the cut-off or none (4.6%, $p=0.01$). IL-6 was also a distinctive feature in all patients with pulmonary involvement (cut-off 16.45 pg/ml, AUC 0.693), whereas there was only a trend for IL-7 (Figure 2B). The Kaplan-Meier analysis in ILD patients showed no statistically significant difference of IL-6 or IL-7 subsets (cut-off IL-6 8.85 pg/ml, AUC 0.653; cut-off IL-7 2.51 pg/ml, AUC 0.700, both Figure 2C).

Multivariate analysis of cytokines predictive for improvement or decline of lung function

Improvement or decline of lung function was documented during follow-up (see Table 1 for follow-up times). Amongst cytokines and clinical features (gender, age, SSc form, anti-Scl-70 and anti-centromere positivity, mRSS, DLCO, FVC, ILD and/or pulmonary hypertension at inclusion) we identified the following predictive factors: In SSc patients without pulmonary involvement, lower CCL2

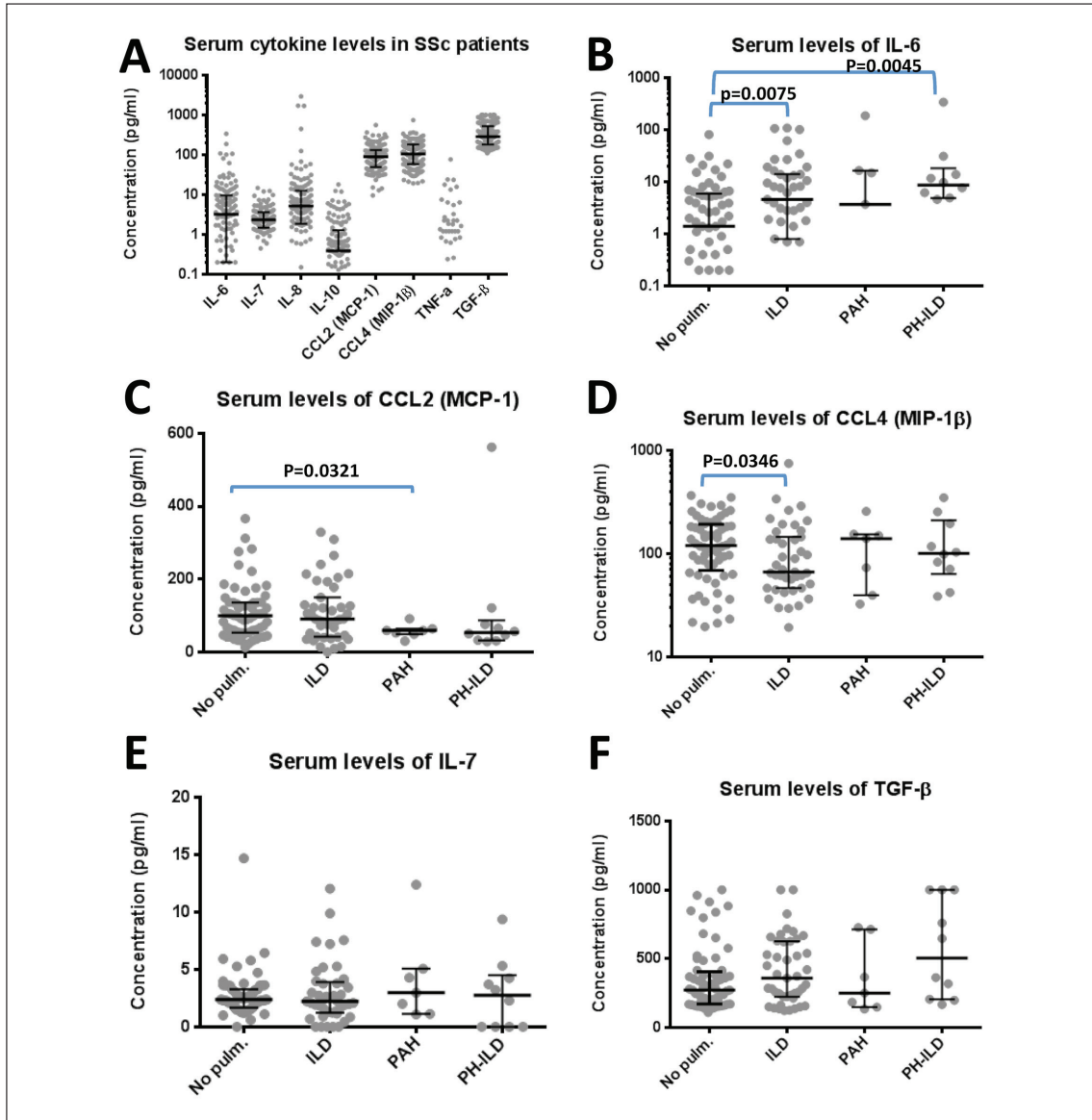


Fig. 1. Serum cytokines of 125 SSc patients. Fig. 1A: Serum cytokines measured are displayed as median and interquartile range. Due to the high frequency of values below the detection limit which are not shown, for IL-10 and TNF- α the IQR cannot be displayed. Serum cytokines split up for patients without pulmonary involvement (No pulm.), SSc-associated interstitial lung disease (ILD), SSc-associated pulmonary arterial hypertension (PAH) and SSc-associated interstitial lung disease with pulmonary hypertension (PH-ILD) are displayed for IL-6 (Fig. 1B), CCL2 (MCP-1, Fig. 1C), CCL4 (MIP-1 β , Fig. 1D), IL-7 (Fig. 1E) and TGF- β (Fig. 1F). Significant differences between the SSc subgroups were calculated using the Mann-Whitney test and are indicated.

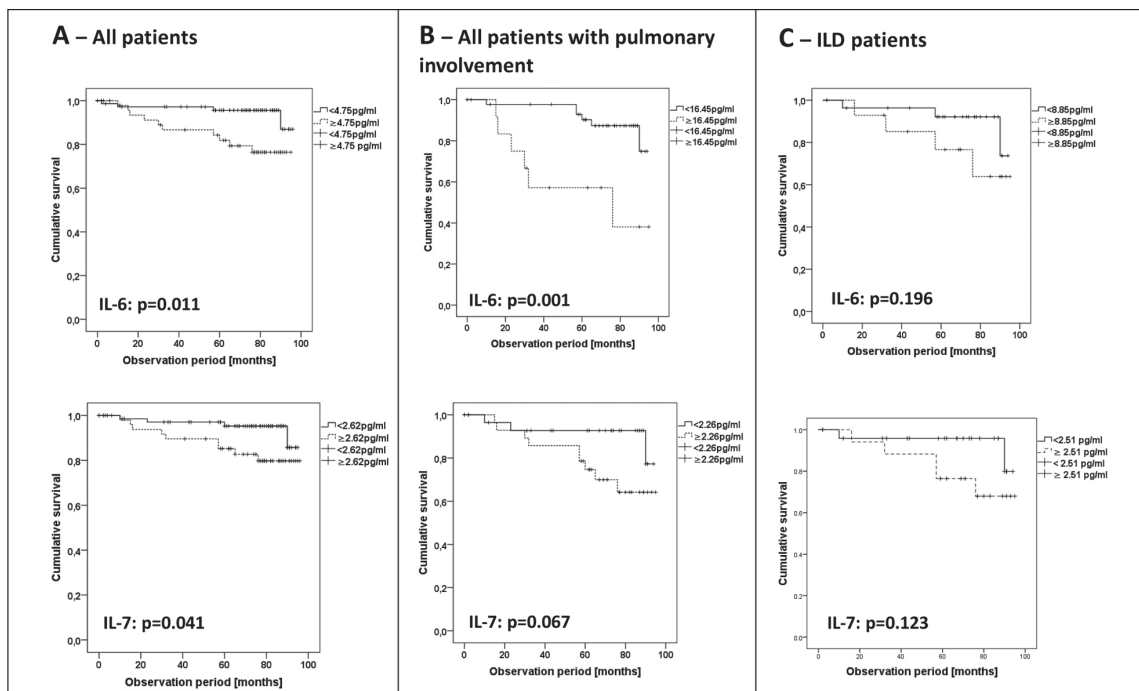
and younger age at inclusion were associated with an increase in FVC >10% (HR 0.972, 95% CI 0.947-0.997 and HR 0.903, 95% CI 0.820-0.994, respec-

tively; Table 3); whereas a higher age at inclusion was associated with a decline in FVC >10% (HR 1.107, 95% CI 1.003-1.222; Table 3). The cut-off level as-

Table 2. Cox regression analysis of predictive items for death

Group	Variable	Cox-Regression Analysis		
		P value	HR	95% CI
Whole cohort	IL-6	<0.0001	1.017	1.008 – 1.026
	IL-7	0.010	1.256	1.056 – 1.495
	Pulmonary hypertension at inclusion	<0.0001	84.38	9.377 – 759.314
	mRSS	0.035	1.102	1.007 – 1.207
	FVC	0.003	0.959	0.934 – 0.986
All patients with pulmonary involvement	IL-6	0.012	1.010	1.002 – 1.017
	IL-7	0.001	1.379	1.139 – 1.671
	Pulmonary hypertension at inclusion	<0.0001	48.512	6.039 – 389.679
	FVC	0.001	0.934	0.910 – 0.977
PAH/PH-ILD	None			
ILD	IL-6	0.003	1.033	1.011 – 1.055
	FVC	0.002	0.933	0.894 – 0.975

Clinical items (gender, age, SSc form, anti-Scl-70 and anti-centromere positivity, mRSS, DLCO, FVC, lung fibrosis and/or pulmonary hypertension at inclusion) and serum cytokines were included in a Cox regression analysis in order to calculate independently predictive factors for death. Only significant items are given with the hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (95% CI).

**Fig. 2.** Predictive capacity of cytokine levels IL-7 and IL-6 for survival in different cohorts.

Kaplan-Meier survival curves are shown according to cytokine cut-off levels determined by ROC analysis in different cohorts, restricted to cytokines that were predictive for time to death in Cox regression analysis. Significance is given by the log-rank test comparing survival curves. A) All patients (whole cohort). B) All patients with pulmonary involvement. C) Patients with ILD.

Table 3. Multivariate analysis of predictive items for improvement or deterioration of lung function

Group	Variable	Factor	Multivariate analysis		
			P value	HR	95% CI
No pulmonary involvement	FVC increase > 10%	CCL2 (MCP-1)	0.028	0.972	0.947-0.997
		Age at inclusion	0.038	0.903	0.820-0.994
	FVC decline > 10%	Age at inclusion	0.044	1.107	1.003-1.222
	DLCO decline > 20%	Female sex	0.031	13.364	1.267-140.934
IL-10		0.028	0.064	0.006-0.744	
All patients with pulmonary involvement	DLCO decline > 20%	TGF- β	0.041	0.997	0.995-1.000
ILD	DLCO decline > 20%	IL-7	0.019	1.591	1.078-2.349
	DLCO decline > 30%	IL-7*	0.028	1.996	1.078-3.695

Clinical items (gender, age, SSc form, anti-Scl-70 and anti-centromere positivity, mRSS, DLCO, FVC, lung fibrosis, pulmonary hypertension at inclusion) and serum cytokines were included in a multivariate analysis in order to calculate independently predictive factors for improvement or deterioration of lung function (e.g. decline of FVC or DLCO by 10, 20 or 30%). Only significant items are given with the hazard ratio (HR) and the 95% confidence interval (95% CI). Items were calculated with two methods (forward and backward inclusion), items marked with an asterisk (*) were calculated by both models.

sociated with an increase of FVC > 10% for CCL2 was calculated with a separate ROC analysis (cut-off 60.4 pg/ml, AUC 0.722). Both female sex and lower IL-10 levels (cut off 0.16 pg/ml, AUC 0.729) were associated with a decline of DLCO > 20% in this population (HR 0.13.364, 95% CI 1.267-140.934 and HR 0.064, 95% CI 0.006-0.744, respectively, Table 3). In patients with pulmonary involvement, TGF- β (cut-off 360.7 pg/ml, AUC 0.661) was the only factor associated with lung function change: it was inversely associated with a decline in DLCO > 20% (HR 0.997, 95% CI 0.995-1.000, Table 3). In patients with ILD, IL-7 was the only predictive factor for lung function change as it was associated with a decline of DLCO > 20% (HR 1.591, 95% CI 1.078-2.349) at a cut-off level of 2.2 pg/ml (AUC 0.713) and with a decline > 30% (HR 1.996, 95% CI 1.078-3.695) at a cut-off level of 3.9 pg/ml (AUC 0.726; Table 3).

Comparison of cytokine levels in BAL and serum

In 21 SSc patients with ILD, concomitant measurements of cytokine levels in BAL and in serum were compared (Figure 3). IL-7 and IL-8 were significantly higher in BAL ($p=0.0445$ and $p<0.0001$ respectively), whereas CCL4 ($p=0.0153$) and TNF- α ($p=0.0138$) were significantly lower in BAL than in serum. There were only few and weak to moderate

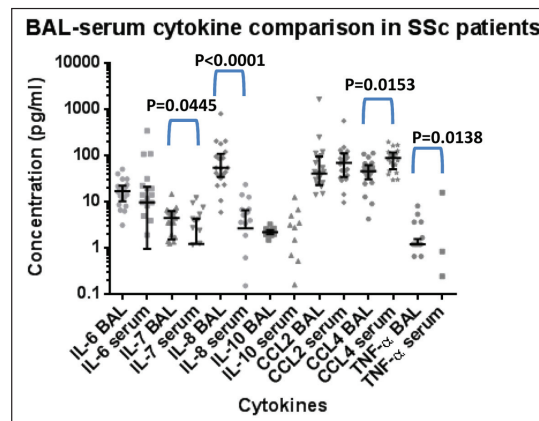


Fig. 3. Cytokine levels in BAL and serum of 21 SSc-ILD patients. BAL and serum cytokines measured at the same time point are displayed as median and interquartile range; due to the high frequency of values below the detection limit not done for serum IL-10 and TNF- α . Significant differences were calculated using a Wilcoxon signed rank test. Statistically significant differences are indicated.

correlations of BAL and serum cytokines: Serum IL-8 correlated with BAL IL-8 ($r=0.574$, $p=0.006$) and BAL TNF- α ($r=0.521$, $p=0.022$), whereas serum TGF- β correlated with the BAL cytokines IL-7 ($r=0.626$, $p=0.002$), IL-10 ($r=0.466$, $p=0.039$), CCL2 ($r=0.488$, $p=0.021$) and TNF- α ($r=0.570$, $p=0.009$). As reported earlier, TGF- β was below the detection range in BAL samples (14).

DISCUSSION

Serum cytokines were studied in a large SSc cohort with all forms of pulmonary involvement, even without lung disease. Different tests revealed both IL-6 and IL-7 as predicting factors for mortality in patients with different subtypes of pulmonary involvement. The predictive value of IL-6 for mortality in SSc patients with ILD could be confirmed, which was also found by De Lauretis et al. and anti-IL-6 treatment with tocilizumab has been shown to halt progression of lung fibrosis (17-19). In addition, IL-6 also predicted the mortality for a mixed cohort of SSc patients with different forms of pulmonary involvement and we identified IL-7 as a new marker for the prediction of mortality in SSc patients in general as well as all SSc patients with pulmonary involvement. In addition, IL-7 was predictive for the decline of DLCO in SSc-ILD patients. When comparing predicting factors for worsening of lung disease with those recently published to be associated with worsening of skin fibrosis, there is only little overlap (apart from the items that have only been included in one analysis or the other) (20). We found gender to be predictive for both worsening of skin and lung fibrosis. However, whereas disease duration played a major role in the prediction of skin fibrosis, the age at baseline was more important for the deterioration of lung function.

Compared to patients without pulmonary involvement, IL-6 was found to be elevated in ILD patients, but even more so in PH-ILD patients, whereas CCL4 was lower in ILD patients. This is contradictory to other reports where CCL4 was significantly increased in patients with SSc, regardless of the disease subtype and stage, and correlated with the presence of pulmonary fibrosis (15, 21). Serum CCL2 was lower in patients with PAH and had no predictive value for patients with lung involvement in our cohort. This was also unexpected because CCL2 is a chemokine that was amongst the top 20 up-regulated genes in SSc-PAH lungs in a different investigation and was predictive for lung function decline in two different cohorts (22, 23). However, the analyses of BAL cellularity and cytokine levels in SSc patients that have been hitherto published, did not always take into account the various subtypes of pulmonary involvement (ILD, PH/PAH, PH-ILD) and this may explain some of the new findings.

The cytokine IL-7 has not yet attracted much attention in patients with systemic sclerosis. IL-7 targets T and B cells as well as innate immune cells and can be found locally elevated in other autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (24). Systemically, IL-7 has been found to be elevated in sarcoidosis (25), while there are several studies indicating lower serum IL-7 levels in rheumatoid arthritis (24, 26) as well as in systemic sclerosis (27) compared to healthy controls; these IL-7 levels were comparable to our findings in the serum. However, there is contradictory evidence to its function: on the one hand, IL-7 drives autoimmunity in a mouse model by expansion of self-reactive lymphocytes (28, 29), whereas, on the other hand, it decreases pulmonary fibrosis, as measured by pulmonary hydroxyproline and collagen content, in a different mouse model (30). TGF- β is known to stimulate fibroblast proliferation and collagen deposition. In the same mouse model (30), IL-7 administration also decreased TGF- β production. In our patients, we have seen no correlation of serum IL-7 and TGF- β (data not shown). In rheumatoid arthritis, IL-7 influenced homing and angiogenesis by monocytes, partly via TNF- α and CCL2 (31); again there was no significant correlations in our cohort between the two cytokines (data not shown).

This might be interesting for further investigations, as monocytes are increasingly recognised to play an important role in the pathogenesis of SSc (32).

In addition, we have compared BAL and serum cytokines in a smaller subset of ILD patients and found cytokine levels in BAL in general to be either comparable or higher. Although this has also been reported by other groups for some cytokines such as IL-6 and IL-8 (33, 34), there is no such comprehensive comparison published. The correlation of serum IL-8 and TGF- β with BAL cytokines was only weak to moderate. IL-7 was significantly lower in serum than in BAL, but was also strongly associated with ILD in our previous study (14), confirming our present data. However, the commonalities and differences in cytokine levels imply a local cytokine production associated with ILD that is paralleled by a rise in serum cytokines, as well as distinct compartments with different levels for other cytokines. This is exemplified by the striking difference between serum and BAL TGF- β levels.

An important limitation of the present study, besides it being a retrospective analysis, is the fact that the majority of patients received immunosuppressive therapies at the time of cytokine/chemokine measurement for different indications such as progressing lung or skin fibrosis, but also myositis and arthritis (e.g. 14 patients had cyclophosphamide and 5 patients mycophenolate mofetil in the ILD group). This, together with the significant inter-individual variation of cytokine levels may explain some findings that are contradictory to other reports.

CONCLUSIONS

In summary, our study could confirm IL-6 as an important biomarker for pulmonary involvement and identify IL-7 as a new biomarker. Our findings extend earlier work on the association of serum cytokines with clinical manifestations and survival. IL-6 and IL-7 may be interesting biomarkers for further trials, possibly allowing for risk stratification of SSc patients with pulmonary involvement.

Author's contributions: M.O.B. and M.R. collected data, analysed the data and wrote the manuscript. K.S. collected data for the manuscript. D.H. supported the statistical analyses and revised the manuscript. A.R. collected data for the manuscript. M.M. collected data and wrote part of/improved the manuscript. C.M. contributed data. R.E. and G.R.B. improved the manuscript and G.R. formed the concept, wrote and improved the manuscript and supervised.

Ethical standards: The study was approved by the local ethics committee and has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments and included written consent of each patient.

REFERENCES

- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009; 360: 1989-2003.
- Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 132-60.
- Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117: 557-67.
- Katsumoto TR, Whitfield ML, Connolly MK. The pathogenesis of systemic sclerosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 509-37.
- Gunther J, Kill A, Becker MO, et al. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: R65.
- Schupp J, Becker M, Gunther J, Muller-Quernheim J, Riemekasten G, Prasse A. Serum CCL18 is predictive for lung disease progression and mortality in systemic sclerosis. *Eur Respir J* 2014; 43: 1530-2.
- Distler JH, Jungel A, Caretto D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 214-25.
- Yanaba K, Komura K, Koderu M, et al. Serum levels of monocyte chemoattractant protein-3/CCL7 are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 124-6.
- Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 940-4.
- Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 2655-66.
- Krause A, Hohberg B, Heine F, John M, Burmester GR, Witt C. Cytokines derived from alveolar macrophages induce fever after bronchoscopy and bronchoalveolar lavage. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997; 155: 1793-7.
- Goh NS, Veeraraghavan S, Desai SR, et al. Bronchoalveolar lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2005-12.
- Strange C, Bolster MB, Roth MD, et al. Bronchoalveolar lavage and response to cyclophosphamide in scleroderma interstitial lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008; 177: 91-8.
- Schmidt K, Martinez-Gamboa L, Meier S, et al. Bronchoalveolar lavage fluid cytokines and chemokines as markers and predictors for the outcome of interstitial lung disease in systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R111.
- Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, et al. CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1685-93.
- van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1747-55.
- De Laurentis A, Sestini P, Pantelidis P, et al. Serum interleukin 6 is predictive of early functional decline and mortality in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2013; 40: 435-46.
- Khanna D, Denton CP, Jhreis A, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in adults with systemic sclerosis (faSScinate): a phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet* 2016; 387: 2630-40.
- Khanna D, Denton CP, Lin CJF, et al. Safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab in systemic sclerosis: results from the open-label period of a phase II randomised controlled trial (faSScinate). *Ann Rheum Dis* 2018; 77: 212-20.
- Maurer B, Graf N, Michel BA, et al. Prediction of worsening of skin fibrosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis using the EUSTAR database. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 1124-31.
- Codullo V, Baldwin HM, Singh MD, et al. An investigation of the inflammatory cytokine and chemokine network in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1115-21.
- Hsu E, Shi H, Jordan RM, Lyons-Weiler J, Pilewski JM, Feghali-Bostwick CA. Lung tissues in patients with systemic sclerosis have gene expression patterns unique to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 783-94.
- Wu M, Baron M, Pedroza C, et al. CCL2 in the Circulation Predicts Long-Term Progression of Interstitial Lung Disease in Patients With Early Systemic Sclerosis: Data From Two Independent Cohorts. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69: 1871-8.
- Churchman SM, Ponchel F. Interleukin-7 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 753-9.

25. Patterson KC, Franck BS, Muller-Quernheim J, Sperling AI, Swiss NJ, Niewold TB. Circulating cytokines in sarcoidosis: phenotype-specific alterations for fibrotic and non-fibrotic pulmonary disease. *Cytokine* 2013; 61: 906-11.
26. Ponchel F, Verburg RJ, Bingham SJ, et al. Interleukin-7 deficiency in rheumatoid arthritis: consequences for therapy-induced lymphopenia. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R80-92.
27. Makino T, Fukushima S, Wakasugi S, Ihn H. Decreased serum IL-7 levels in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27: 68-9.
28. Calzascia T, Pellegrini M, Lin A, et al. CD4 T cells, lymphopenia, and IL-7 in a multistep pathway to autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2999-3004.
29. Pathak K. The expanding role of IL-7 and thymic stromal lymphopoietin as therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Expert opinion on therapeutic targets* 2014; 18: 581-94.
30. Huang M, Sharma S, Zhu LX, et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 109: 931-7.
31. Chen Z, Kim SJ, Chamberlain ND, et al. The novel role of IL-7 ligation to IL-7 receptor in myeloid cells of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2013; 190: 5256-66.
32. Kania G, Rudnik M, Distler O. Involvement of the myeloid cell compartment in fibrogenesis and systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2019; 15: 288-302.
33. Crestani B, Seta N, De Bandt M, et al. Interleukin 6 secretion by monocytes and alveolar macrophages in systemic sclerosis with lung involvement. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1260-5.
34. Hesselstrand R, Wildt M, Bozovic G, et al. Biomarkers from bronchoalveolar lavage fluid in systemic sclerosis patients with interstitial lung disease relate to severity of lung fibrosis. *Respiratory medicine* 2013; 107: 1079-86.

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Becker MO, Kill A, **Kutsche M**, Guenther J, Rose A, Tabeling C, Witzenrath M, Kühl AA, Heidecke H, Ghofrani HA, Tiede H, Schermuly RT, Nickel N, Hoeper MM, Lukitsch I, Gollasch M, Kuebler WM, Bock S, Burmester GR, Dragun D, and Riemekasten G (2014) Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. Am J Respir Crit Care Med 190:808-17

Michelfelder M, Becker M, Riedlinger A, Siegert E, Dromann D, Yu X, Petersen F and Riemekasten G (2017) Interstitial lung disease increases mortality in systemic sclerosis patients with pulmonary arterial hypertension without affecting hemodynamics and exercise capacity. Clin Rheumatol 36:381-390

Becker MO, Radic M, Schmidt K, Huscher D, Riedlinger A, **Michelfelder M**, Meisel C, Ewert R, Burmester GR, Riemekasten G (2019) Serum cytokines and their predictive value in pulmonary involvement of systemic sclerosis. Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung disease 36(4):274-84

Michelfelder M (2019) Akute Vigilanzstörung. In: Koch T, Heller AR, Schewe JC, Hrsg. Medizinische Einsatzteams. 1. Ausgabe, Berlin: Springer-Verlag:222-224.

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Riemekasten für ihre zahlreichen klugen Ratschläge und Hinweise und für ihre Bereitschaft, die Promotion auch aus der Ferne zu betreuen. Ihre Schnelligkeit jedweder Rückantwort war einmalig. Desweiteren danke ich Mike Becker für die hilfreichen Gespräche und Kommentare, ebenfalls mit der Zeit aus der Ferne. Weiterhin danke ich Dörte Huscher und Manfred Berres für die mathematischen Ausführungen zur Statistik und Helen Siegburg für die Korrektur meiner englischen Texte. Zuletzt danke ich Roman Michelfelder für sein geduldiges Zuhören und die vielen Stunden der Betreuung von Carlotta.