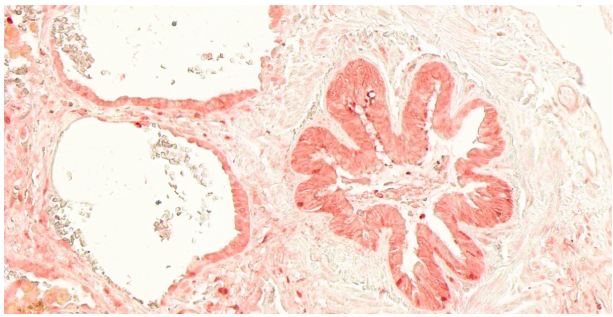
Nina Christine Lepper

Organbezogene Adipokin- und Immunzellexpression bei der systemischen Sklerose



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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Organbezogene Adipokin- und Immunzellexpression bei der systemischen Sklerose

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

vorgelegt von

Nina Christine Lepper

aus Gießen

Gießen 2017

Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. U. Müller-Ladner

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Gutachter: PD Dr. med. Thomas Karrasch

Tag der Disputation: 19.12.2017

Für Robert Dinser

Inhaltsverzeichnis

Seite

1 EINLEITUNG 1

1.1 Das Krankheitsbild der systemischen Sklerose (SSc) 1

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie 1

1.1.2 Klinisches Bild und Diagnostik 2

1.1.3 Gastrointestinale und pulmonale Beteiligung bei der SSc 7

1.1.4 Therapie und Prognose 12

1.2 Das Immunsystem und seine Rolle bei der systemischen Sklerose 13

1.2.1 Überblick über das Immunsystem 13

1.2.2 Pathogenese der systemischen Sklerose 14

1.2.3 Die Rolle von CD4-, CD8- und CD68-positiven Immunzellen 16

1.3 Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) 20

1.3.1 Definition, Epidemiologie und Ätiopathogenese 20

1.3.2 Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie 23

1.3.3 Vergleich zwischen IPF und SSc-ILD 26

1.4 Adipokine und ihre Rolle bei verschiedenen Erkrankungen 29

1.4.1 Adiponektin 30

1.4.2 Resistin 32

1.4.3 Visfatin 34

1.5 Fragestellung und Ziele 36

2 MATERIAL UND METHODEN 37

2.1 Material 37

2.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien 37

2.1.2 Gewebematerial 38

2.1.3 Antikörper 39

2.1.4 Geräte 40

2.2 Histologische Methoden 40
2.2.1 Anfertigung von Gefrierschnitten 40
2.2.2 Anfertigung von Paraffinschnitten 41
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 41
2.2.4 Immunhistochemie 41
2.3 Auswertung 43
2.3.1 Auswahl der Software 43
2.3.2 Auswertung der Magenproben 44
2.3.3 Auswertung der Lungenproben 46
2.3.4 Statistische Auswertung 48
3 ERGEBNISSE 49
3.1 Auswertung der Magenproben 49
3.1.1 CD4-positive Zellen 49
3.1.2 CD8-positive Zellen 52
3.1.3 CD68-positive Zellen 53
3.1.4 Resistin 56
3.1.5 Visfatin 59
3.1.6 Adiponektin 62
3.2 Auswertung der Lungenproben 67
3.2.1 Adiponektin 67
3.2.2 Resistin 75
3.2.3 Visfatin 81
3.2.4 Vergleich und Kolokalisation der pulmonalen Adipokinexpression 84
4 DISKUSSION 87
4.1 Diskussion der Methodik 87
4.2 Diskussion der Ergebnisse und Bezug zu anderen Studien 90

4.2.1 Immunzellinfiltration bei der systemischen Sklerose 90
4.2.2 Organbezogene Expression von Adiponektin..... 95
4.2.3 Organbezogene Expression von Resistin..... 100
4.2.4 Organbezogene Expression von Visfatin..... 102

5 ZUSAMMENFASSUNG..... 105

6 SUMMARY..... 107

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... 109

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 111

9 TABELLARISCHER ANHANG..... 113

10 ERKLÄRUNG..... 114

11 LITERATURVERZEICHNIS 115

12 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS 124

13 DANKSAGUNG..... 125

14 LEBENSLAUF..... 126

1 EINLEITUNG

1.1 Das Krankheitsbild der systemischen Sklerose (SSc)

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine autoimmun verursachte, chronisch verlaufende Erkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Dazu gehören neben der systemischen Sklerose der systemische Lupus erythematodes (SLE), die Poly- und Dermatomyositis, das Sjögren-Syndrom sowie das Sharp-Syndrom (Mischkollagenose). Allen Kollagenosen ist eine krankhafte Veränderung des Bindegewebes gemein. Die systemische Sklerose wird durch eine abnormale Immunreaktion, eine vaskuläre Mikrozirkulationsstörung sowie eine überschießende Fibrosierung der Haut und der inneren Organe charakterisiert. Wortwörtlich beschreibt „Sklerodermie“ eine Verhärtung der Haut (*gr. „scleros“* = hart; *gr. „derma“* = Haut). Die Bezeichnung Sklerodermie kann dabei als ein Überbegriff für die verschiedenen Entitäten der Erkrankung bezeichnet werden: Es bestehen sowohl Formen, die neben der Haut auch die inneren Organe betreffen (systemische Sklerose oder progressive systemische Sklerose) als auch solche, die nur die äußere Haut betreffen (Morphea oder zirkumskripte Sklerodermie) [1].

Die sytemische Sklerose ist eine seltene Erkrankung, die mit einer Prävalenz von 5-30/100.000 Einwohner auftritt. Es lassen sich dabei geographische Unterschiede finden: In den USA und Australien ist die Prävalenz für SSc höher als in Europa und Japan. Zudem wurde ein Nord-Süd-Gradient mit einer geringeren Rate in Nordeuropa als in Südeuropa beschrieben, der jedoch in aktuellen Studien kritisch in Frage gestellt wird [2, 3]. Frauen sind mit einer Rate von 4-10:1 häufiger betroffen als Männer. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr [4]. Auch zeigen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen: Dunkelhäutige Menschen sind häufiger, schwerer und im Mittel in einem jüngeren Alter betroffen als hellhäutige Menschen [5].

Die komplexe Ätiologie und vor allem die Auslöser des klinischen Beginns der systemischen Sklerose sind noch nicht hinreichend geklärt und beinhaltet sowohl genetische als auch umweltassoziierte Faktoren. Studien haben gezeigt, dass das Risiko, an systemischer Sklerose zu erkranken, ca. 100-fach erhöht ist, wenn die Erkrankung bereits in der Familie aufgetreten ist. Zwillingsstudien zeigen eine

Konkordanz von lediglich 5% bei mono- und dizygoten Zwillingspaaren [6, 7]. Da ein Großteil der Betroffenen weiblich ist, wird auch eine postnatale Persistenz Y-chromosomaler Zellen nach stattgehabter Gravidität diskutiert, welche eine Graft-versus-Host-Reaktion auslösen könnte [8]. Scheinbar sind neben einer genetischen Prädisposition auch exogene Faktoren in der Entstehung der Erkrankung beteiligt. So wird ein Zusammenhang mit dem Vorhandensein von CMV-Antikörpern vermutet, welche über ein molekulares Mimikry zu einer pathologischen Endothelzellreaktion und Fibroblastenaktivierung führen [9]. Weiterhin werden umweltassoziierte Stoffe wie Silikate, Benzol und Vinylchlorid und Medikamente wie beispielsweise Bleomycin als mögliche Trigger für das Entstehen der Erkrankung betrachtet [10].

1.1.2 Klinisches Bild und Diagnostik

Die klinische Manifestation der systemischen Sklerose kann individuell sehr unterschiedlich ausfallen und betrifft Haut und innere Organe [1]. Die **Hautbeteiligung** manifestiert sich initial häufig im Bereich der Hände und durchläuft oftmals drei Stadien: Zunächst zeigt sich eine ödematöse Schwellung („puffy fingers bzw. hands“), die von einer Induration und schließlich Atrophie gefolgt ist. Sehr häufig findet sich auch als erstes klinisches Zeichen ein Raynaud-Syndrom bei den betroffenen Patienten. Bedingt durch einen Vasospasmus kommt es hierbei zu einer gestörten Durchblutung der Finger, die sich in einem typisch trikoloren Muster darstellt: Initial kommt es zu einer bläulichen Zyanose, anschließend zu einem Weißwerden der Finger und letztendlich zu einer reaktiven Rötung durch Hyperämie. Darüber hinaus lassen sich weitere, typische Hautmanifestationen wie Ulzerationen (sogenannte „Rattenbissnekrosen“ im Bereich der distalen Extremitäten), Pigmentverschiebungen und Teleangiektasien finden. Im Gesicht zeigt sich oftmals eine mimische Starre durch die Verhärtung der Haut, eine radiäre Faltenbildung um den Mund („Tabaksbeutelmund“), ein Kleinerwerden der Mundöffnung („Mikrostomie“) sowie eine Verkürzung des Zungenbändchens. Auch lassen sich häufig Veränderungen im Bereich der Nägel finden, die sich in Form von Oncholyse und –dystrophie, Verdickung der Nagelfalze sowie Hämorrhagien und Riesenkapillaren im Bereich der Nägel manifestieren. Im Subkutangewebe lässt sich bei manchen Sklerodermieformen eine Verkalkung finden (subkutane Kalzinosis) [11].

Das klinische Bild der systemischen Sklerose ist neben den typischen Hauterscheinungen von der Beteiligung verschiedener **innerer Organe** geprägt. Die Organbeteiligungen sind Hauptursache der durch die Erkrankung entstehende

Morbidität und Mortalität. Dabei sind in absteigender Häufigkeit der Gastrointestinaltrakt, die Lunge sowie Niere, Herz und Bewegungsapparat betroffen. Im Gastrointestinaltrakt lässt sich häufig eine Ösophagusbeteiligung finden: Der Ösophagus ist starr und aton, es kommt zu einem Peristaltikmangel. Klinisch imponieren meist Schluckstörungen sowie ein gastroösophagealer Reflux bzw. eine Ösophagitis. Darüber hinaus kann es zu Diarrhoen, Malabsorption sowie Hypomobilität kommen. In der Lunge zeigt sich oftmals eine fibrosierende Alveolitis bzw. Lungenfibrose. Dabei geht dem fibrotischen Umbau in der Regel eine Alveolitis voraus. Die Patienten leiden unter (Belastungs-)dyspnoe, die durch eine restriktive Ventilationsstörung entsteht. Weitere, unspezifische Symptome einer interstitiellen Lungenerkrankung können mangelnde körperliche Belastbarkeit, Schwäche und Müdigkeit sein. Außerdem kann es zu einer pulmonalen Hypertonie mit konsekutiver Rechtsherzbelastung (Cor pulmonale) kommen, welche sich auch durch eine (Belastungs-)dyspnoe bemerkbar macht. Im Frühstadium zeigen sich jedoch häufig keinerlei Symptome. Das Herz kann auch selbst von der systemischen Sklerose betroffen sein. Fibrotische Veränderungen können im Bereich des Myo- und Perikards, aber auch im Reizleitungssytem gefunden werden. Als klinisches Korrelat können Rhythmusstörungen, Palpitationen, ein Perikarderguss sowie eine kardiale diastolische Funktionsstörung auftreten. Eine Nierenbeteiligung war früher die häufigste SSc-bedingte Todesursache, ist heutzutage jedoch durch eine medikamentöse Therapie und Verzicht auf Kortikosteroide verhinderbar. Bei einer renalen Beteiligung der systemischen Sklerose kommt es durch mikroangiopathische Veränderungen zu multiplen Niereninfarkten, einer nephrogenen Hypertonie und chronischer Niereninsuffizienz. Eine gefürchtete Komplikation ist die sogenannte renale Krise, die durch ein fortschreitendes Versagen der glomerulären Funktion, einer einhergehenden malignen Hypertonie gekennzeichnet ist und in einem progressiven Nierenversagen mündet. Auch der Bewegungsapparat kann von der systemischen Sklerose betroffen sein. Zum einen finden sich Gelenkbeteiligungen in Form von Arthritiden, Gelenkkontrakturen und Akroosteolysen. Diese lassen sich häufig bei Überlappungsformen mit anderen rheumatologischen Erkrankungen nachweisen. Weiterhin können Myalgien und Muskelatrophien bestehen [1, 4, 12].

Klinisch werden zwei unterschiedliche **Verlaufsformen** der systemischen Sklerose unterschieden: Die diffuse kutane sytemische Sklerose (dSSc) und die limitierte kutane systemische Sklerose (lSSc). Bei der limitierten Form (lSSc) kommt es zu einer Hautbeteiligung, welche auf die distalen Extremitäten beschränkt ist und in der Regel nur bis zur Ellbogen- bzw. Kniehöhe voranschreitet. Ausgenommen davon ist die Beteiligung der Gesichtshaut. Organbeteiligungen sind seltener und verlaufen

langsamer und weniger aggressiv als bei der diffusen Form (dSSc). Eine Sonderform der limitierten kutanen systemischen Sklerose ist das sogenannte CREST-Syndrom, welches ein Akronym aus verschiedenen Symptomen darstellt: Calcinosis cutis, Raynaud-Phänomen, Ösophagusdysfunktion (engl. Esophagus), Sklerodaktylie und Teleangiektasie [4]. Bei ca. 70% der Patienten, die unter einer limitierten kutanen systemischen Sklerose leiden, lassen sich Anti-Zentromer-Antikörper (ACA) nachweisen. Bei der dSSc zeigt sich eine generalisierte Hautbeteiligung, die sich auch proximal der Ellbogen und Kniebeugen nachweisen lässt. Es kommt zu einer häufigeren und schneller voranschreitenden Organbeteiligung, so dass diese Verlaufsform mit einer schlechteren Prognose einhergeht. In 40% der Fälle lassen sich bei der diffus kutanen systemischen Sklerose Antitopoisomerase-1-Antikörper (Anti-SCL70) nachweisen. Neben den beiden genannten Verlaufsformen gibt es auch seltene Sonderformen wie die SSc sine scleroderma, bei der es zu keiner Hautbeteiligung kommt, die inneren Organe jedoch betroffen sind [13].

Zur klinischen **Diagnose** der systemischen Sklerose werden die Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) herangezogen. Diese wurden initial im Jahr 1980 aufgestellt und im Jahr 2013 gemeinsam mit der European League Against Rheumatism (EULAR) modifiziert, um auch frühe Formen der systemischen Sklerose miteinzubeziehen. Bei beiden Varianten ist eine Sklerodermie proximal der Fingergrundgelenke ausreichend, um die Diagnose einer systemischen Sklerose stellen zu können [14, 15].

Da diese Arbeit mit Daten von Patienten gearbeitet hat, die nach den alten Klassifikationskriterien diagnostiziert wurden, werden diese mit erläutert. Die Klassifikationskriterien aus dem Jahr 1980 bestehen aus einem Hauptkriterium (Sklerodermie proximal der Fingergrundgelenke) sowie drei Nebenkriterien (Sklerodaktylie, grübchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Fingerweichteile, bilaterale basale Lungenfibrose). Zur Diagnosestellung musste entweder das Hauptkriterium oder mindestens zwei Nebenkriterien erfüllt sein. Diese Kriterien wurden mit der Zeit dahingehend hinterfragt, als dass frühe Formen der systemischen Sklerose nicht rechtzeitig erkannt würden. Die im Jahr 2013 modifizierten Klassifikationskriterien nach ACR/EULAR berücksichtigen mehrere Faktoren. Insgesamt muss eine Punktzahl von 9 erreicht werden, um die Diagnose einer systemischen Sklerose stellen zu können. Bei verschiedenen Unterkriterien zählt jeweils die höchste Punktzahl. Zudem müssen Patienten ausgeschlossen werden, die eine Erkrankung aufweisen, die Ähnlichkeiten mit der systemischen Sklerose aufweist, wie z.B. eine eosinophile Fasziitis, die ebenfalls mit einer Hautverhärtung einhergeht. Die aktuellen Klassifikationskriterien sind in Tab.1 aufgelistet.

Tabelle 1: Klassifikationskriterien der systemischen Sklerose des American College of Rheumatology/der European League Against Rheumatism 2013 (modifiziert nach van den Hoogen et al., 2013). Zur Diagnose einer systemischen Sklerose müssen 9 Punkte erreicht werden.

Kriterien	Unterkriterien	Punkte
Hautverdickung an den Fingern beider Hände proximal der Fingergrundgelenke *(ausreichendes Kriterium)*	-	9
Hautverdickung an den Fingern *(nur der höchste Punktwert zählt)*	geschwollene Finger	2
	Sklerodaktylie distal der Fingergrundgelenke, jedoch proximal der proximalen Interphalangealgelenken	4
Läsionen an den Fingerspitzen *(nur der höchste Punktwert zählt)*	Ulzera an den Fingerspitzen	2
	Grübchenförmige Narben an den Fingerspitzen	3
Teleangiektasie	-	2
Abnormale Kapillaren im Nagelfalz	-	2
Pulmonal arterielle Hypertonie und/oder interstitielle Lungenerkrankung *(nur der höchste Punktwert zählt)*	Pulmonal arterielle Hypertonie	2
	Interstitielle Lungenerkrankung	2
Raynaud-Syndrom	-	3
SSc-assoziierte Antikörper (Anti-Zentromer, Anti-Topoisomerase I (Anti-Scl-70), Anti-RNA-Polymerase III) (*maximal: 3 Punkte)*	Anti-Zentromer Anti-Topoisomerase I Anti-RNA-Polymerase III	3

Anhand der aktuellen Klassifikationskriterien besteht eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 92% [15]. Laut einer schwedischen Studie, die sich nach der Modifikation der Klassifikationskriterien mit der Epidemiologie der systemischen Sklerose beschäftigt hat, ist es durch die Veränderungen der Klassifikationskriterien zu einer Erhöhung der Inzidenz und Prävalenz um jeweils 30-40% gekommen [3].

Je nach Befallsmuster können verschiedene diagnostische Maßnahmen herangezogen werden, um Hinweise für eine Diagnosestellung finden zu können. Da die Haut das durch die Krankheit häufig am stärksten betroffene Organ ist, ist eine genaue

Hautuntersuchung unerlässlich. Dazu kann der sogenannte „modified Rodnan skin score“ (mRSS) herangezogen werden, der von Grad 0 (normale Haut) bis Grad 3 (starke Hautverdickung ohne Möglichkeit, eine Hautfalte anzuheben) reicht [4]. Zur Differenzierung eines primären Raynaudphänomens, welches idiopathisch besteht und durch Kälte ausgelöst wird, von einem sekundären Raynaudphänomen, das sich auf dem Boden einer Systemerkrankung entwickelt, kann die sogenannte Kapillarmikroskopie herangezogen werden. Die Kapillarmikroskopie ist eine Untersuchung der kleinen Blutgefäße im Bereich der Fingernägel, die bei einer vermuteten systemischen Sklerose möglichst zu Beginn durchgeführt werden sollte [4]. Dabei erfolgt eine Beurteilung der Gefäßarchitektur der Kapillarschlingen im Bereich der Nägel. Das Vorhandensein von Riesenkapillaren, avaskulären Arealen und kleinen Einblutungen sollte an das Bestehen einer Kollagenose denken lassen. Eine weitere wichtige diagnostische Maßnahme ist die Labordiagnostik. Bei fast allen Patienten lassen sich antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisen, diese sind jedoch unspezifisch und treten bei vielen verschiedenen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis auf. Häufig finden sich jedoch auch Sklerodermie-assoziierte Antikörper, deren Nachweis diagnostisch relevant für die Erkrankung ist. Die Labordiagnostik ist insbesondere zur Spezifizierung der unterschiedlichen SSc-Subtypen hilfreich, da bestimmte Antikörper oft mit den jeweiligen Verlaufsformen assoziiert sind. Bei der diffus kutanen systemischen Sklerose (dSSc) lassen sich in ca. 40% der Fälle sogenannte Anti-Topoisomerase-Antikörper (Anti-Scl 70) nachweisen. Diese sind auch mit dem Auftreten einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) korreliert. Bei der limitierten kutanen systemischen Sklerose (lSSc) bzw. dem CREST-Syndrom lassen sich zu 70% Anti-Zentromer-Antikörper finden. Diese sind häufig mit dem Auftreten einer pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH) assoziiert. Des Weiteren lassen sich in manchen Fällen (ca. 20% aller SSc-Patienten) Anti-RNA-Polymerase-Antikörper nachweisen, welche eine Assoziation mit einer schweren Nierenbeteiligung aufweisen. Somit lässt die Antikörperdiagnostik auch eine Abschätzung der Schwere des Verlaufs und einer eventuellen Organbeteiligung zu [16]. Entzündungsassoziierte Laborwerte wie das CRP (C-reaktives Protein) und die BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit) können bei der SSc erhöht sein, sind jedoch unspezifisch. Die weiteren, eventuell befallenen Organe sollten bei einer diagnostizierten systemischen Sklerose regelmäßig überwacht werden [4]. Um eine Nierenbeteiligung frühzeitig erkennen zu können, sollten regelmäßig Kreatininwert, Urinstatus und GFR (glomeruläre Filtrationsrate) bestimmt werden. Zur Abschätzung der Herztätigkeit können EKG (Elektrokardiogramm) und Langzeit-EKG, die Hinweise auf eventuelle Rhythmusstörungen geben können, sowie eine Echokardiographie, die Aufschluss

über die Herzfunktion und einen eventuellen Perikarderguss gibt, durchgeführt werden. Über die echokardiographische Untersuchung kann auch eine mögliche Rechtsherzbelastung erkannt werden, die Anzeichen für eine pulmonale Hypertonie und somit eine Lungenbeteiligung ist. Zur Abschätzung der pulmonalen Funktion sollte zunächst eine Lungenfunktionsprüfung durchgeführt werden, bei der insbesondere die Diffusionskapazität relevant ist. Darüber hinaus stehen Röntgen-Thoraxuntersuchung sowie eine HR-CT (hochauflösende Computertomographie) zur Verfügung. Falls der Verdacht auf eine pulmonale Hypertonie besteht, kann eine Rechtsherzkatheteruntersuchung herangezogen werden. Eine gastrointestinale Beteiligung kann – je nach Beschwerden – mit einer Ösophagogastroskopie, einer Ösophagomanometrie, einer pH-Wert-Messung, eines MR-Sellink sowie einer Koloskopie nachgewiesen werden [14, 17].

1.1.3 Gastrointestinale und pulmonale Beteiligung bei der SSc

Der **Gastrointestinaltrakt (GIT)** ist das mit am häufigsten betroffene Organsystem bei der SSc. Ca. 90% aller Patienten sind von einer gastrointestinalen Beteiligung betroffen, damit stellt es die zweithäufigste Beteiligung nach der Haut dar [4]. Prinzipiell kann jeder Abschnitt des GIT betroffen sein, was zu einer Vielzahl verschiedener Symptome führt. Manche Patienten weisen auch eine gastrointestinale Beteiligung auf, die kein klinisches Korrelat bietet. Ähnlich wie in den von der SSc betroffenen Hautarealen kommt es im Gastrointestinaltrakt zu einer veränderten Mikrozirkulation mit vaskulopathischen Veränderungen, einer Immunreaktion und letztlich einer vermehrten Fibrosebildung [18]. Die erhöhte Ablagerung von Kollagen und anderen Anteilen der EZM führt im GIT zu einer Atrophie und letztlich Dysfunktion der dort ansässigen Muskulatur. Da eine funktionierende Peristaltik unabdingbar für die normale gastrointestinale Passage ist, kommt es durch die muskuläre Dysfunktion zu einer Motilitätsstörung. Klinische Symptome sind Dysphagie, Sodbrennen, Reizhusten und Meteorismus. Auch eine Obstipationsneigung und Diarrhoen können auftreten.
Der Ösophagus ist das am häufigsten betroffene Organ des GIT. Insbesondere bei Beteiligung der unteren Ösophagusabschnitte kommt es zu einer Sphinkterdysfunktion, die in einem gastroösophagealen Reflux mündet. Dieser kann je nach Ausprägungsgrad in eine Refluxösophagitis, Ulcera oder narbigen Strikturen übergehen. Ein Therapieansatz ist der Einsatz von Protonenpumpeninhibitoren. Bei komplett fehlender Ösophagusmotilität kann das Vollbild einer Achalasie entstehen.

Eine Magenbeteiligung zeigt klinisch häufig das Bild einer verzögerten Magenentleerung, die wiederum zu einem gastroösophagealem Reflux führt. Properistaltisch wirksame Medikamente wie z.B. Metoclopramid oder Erythromycin können eingesetzt werden. Weiterhin wird bei der SSc das Auftreten eines sogenannten Wassermelonenmagens beschrieben, welcher dem Bild eines Gave-Syndroms (engl. GAVE = Gastric Antral Vascular Ectasia) entspricht. Hierüber kann es durch die Gefäßektasien zu einer erhöhten Blutungsneigung kommen. Endoskopische Argonplasmakoagulationen und bedarfsweise Bluttransfusionen stellen therapeutische Optionen dar.
Im Bereich des Dünndarms kann es zu einer bakteriellen Überwucherung kommen, deren Ursache ebenfalls in einer Motilitätsstörung begründet liegt. Konsekutiv kommt es dadurch zu einer Malabsorption und letztlich Mangelernährung, so dass eine Eradikation angestrebt werden sollte. Weitere Komplikationen können dilatierte Darmschlingen sowie Pseudoobstruktionen sein, die auf Grund der Motilitätsstörung entstehen.
Ähnlich wie im Magen können im Dickdarm auch gehäuft Angiodysplasien auftreten. Zudem kommt es durch die verzögerte Magen-Darm-Passage zu einer Obstipationsneigung; bei rektaler Beteiligung ggf. zur Ausbildung einer Inkontinenz [19].
Eine Beteiligung des oberen GIT kann indirekt mit dem Auftreten einer einer Lungenbeteiligung vergesellschaftet sein, da gastroösophagealer Reflux zu pulmonalen Mikroaspirationen führen kann, die als mitursächlich für das Auftreten einer interstitiellen Lungenerkrankung diskutiert werden [20].
Im Vergleich zu anderen rheumatologischen Erkrankungen zeigt die SSc die häufigste gastrointestinale Beteiligung [21].
Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine gastrointestinale Beteiligung bei den allermeisten aller SSc-Patienten auftritt und, obwohl diese nicht den lebenslimitierenden Faktor der Erkrankung darstellt, doch für eine ausgeprägte Morbidität sorgt.

Die **pulmonale Beteiligung** in Form einer interstitiellen Lungenerkrankung (ILD) oder pulmonalen Hypertonie (PAH) ist die führende Todesursache bei der SSc. Auf Grund dessen ist es besonders wichtig, für diese Organbeteiligung therapeutische Möglichkeiten aufzutun bzw. an solchen zu forschen. Es gibt verschiedene Formen der pulmonalen Beteiligung bei der SSc. So muss man zwischen direkter und indirekter Beteiligung unterscheiden: Bei der direkten Beteiligung handelt es sich entweder um eine ILD, PAH oder pleurale Beteiligung, bei der indirekten Beteiligung spielen

Komplikationen durch Aspirationen, Infektionen sowie Medikamentennebenwirkungen eine Rolle, darüber hinaus können durch eine kardiale Beteiligung und durch eine schwere thorakale Hautbeteiligung eine sekundäre Lungenerkrankung bzw. eine restriktive Ventilationsstörung entstehen [22].

Bei der direkten Lungenbeteiligung liegen meist eine ILD und/oder eine PAH vor; beide zusammen machen 60% aller SSc-bedingten Todesfälle aus [23]. Die ILD tritt häufiger bei der dSSc auf, die PAH mehr bei der lSSc. Jedoch können beide Entitäten bei den verschiedenen SSc-Formen auftreten. Die Scleroderma sine Scleroderma ist eine Form der SSc, die lediglich durch eine Lungenbeteiligung gekennzeichnet ist und gelegentlich fälschlicherweise als eine idiopathische ILD klassifiziert wird. Insgesamt sind die meisten aller SSc-Patienten in irgendeiner Art und Weise durch eine pulmonale Beteiligung betroffen. In einer frühen Studie von Schurawitzki et al. [24] zeigte sich, dass 90% aller SSc-Patienten interstitielle Veränderungen im HRCT aufweisen. In der Lungenfunktion finden sich Einschränkungen bei 40-75% aller Patienten. Dabei besteht eine Lungenbeteiligung häufig schon früh im Verlauf einer SSc. Nach der Diagnosestellung entwickeln 25% der SSc-Patienten eine klinisch relevante Lungenbeteiligung [25]. Bei Patienten, die eine Lungenbeteiligung entwickeln, können häufig Anti-Topoisomerase- und Anti-Endothelzell-Antikörper nachgewiesen werden, wohingegen Anti-Zentromer- und Anti-RNA-Polymerase III-Antikörper negativ mit dem Auftreten einer Lungenbeteiligung korrelieren [26].

Prädiktiv für das Auftreten einer ausgeprägten Lungenbeteiligung sind junges Alter, männliches Geschlecht sowie eine afroamerikanische Abstammung [27].

Die Pathogenese der SSc-ILD ist, wie auch die der Erkrankung selbst, in ihren Anfängen nicht im Detail verstanden. In der BAL (bronchoalveoläre Lavage) von Patienten mit SSc-ILD finden sich erhöhte Level der proinflammatorischen Zytokine IL-8, TNF-α und Makrophagen-inflammatorisches Protein 1α [28], welche allesamt mit inflammatorischen Prozessen assoziiert sind und die Immunantwort steuern. Dies impliziert das Vorhandensein einer Entzündungsreaktion vor dem Enstehen einer Fibrose.

Um eine SSc-ILD zu diagnostizieren, stellt die HRCT die Methode der Wahl dar, da hier bereits diskrete Veränderungen nachgewiesen werden können, die sich in einer Röntgenthoraxaufnahme ggf. nicht darstellen lassen. Wie bereits oben erwähnt, zeigt die Mehrheit der SSc-Patienten auch interstitielle Veränderungen in der HRCT. Patienten mit einem unauffälligen HRCT zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben dagegen ein nur geringes Risiko, im weiteren Verlauf eine Lungenbeteiligung zu entwickeln. In einer Studie zum Follow-up nach 5 Jahren wiesen 85% ein unauffälliges HRCT auf [29]. Die SSc-ILD geht CT-morphologisch meist mit dem Muster einer NSIP

(nicht spezifische interstitielle Pneumonie) einher [30], welche Milchglastrübungen, Mikronoduli und Honigwaben zeigt. Allerdings können Patienten mit SSc-ILD auch das Bild einer UIP (*engl.* usual interstitial pneumonia) im CT zeigen, so dass hier keine klare Zuordnung zu einem typischen radiologischen Muster erfolgen kann. Auch ist nicht ausgeschlossen, dass die verschiedenen CT-morphologischen Muster unterschiedlicher ILD verschiedene Krankheitsstadien einer Erkrankung beschreiben. Bei ca. 30% aller SSc-ILD Patienten zeigen sich sogenannte Honigwaben, welche dickwandige epitheliale Zysten beschreiben. Bereits aufgetretene Veränderungen in der HRCT sind selten reversibel. Viel mehr kommt es zu einem fortschreitendem Prozess, in dem zunächst häufig Milchglastrübungen auffallen, welche dann im Rahmen des Umbauprozesses des Lungenparenchyms scheinbar durch Honigwaben und Bronchiektasen ersetzt werden [29]. Die Mehrheit aller Patienten, bei denen Milchglastrübungen im HRCT beobachtet werden können, entwickeln mit der Zeit eine Lungenfibrose.

In der Lungenfunktionstestung lässt sich bei 40-75% der Patienten eine reduzierte Vitalkapazität beobachten [22]. Die Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid (DLCO) korreliert mit dem Ausmaß der CT-morphologischen Veränderungen. SSc-Patienten, die bioptisch ein UIP-Muster ihrer Lungenbeteiligung bieten, weisen eine niedrigere Diffusionskapazität auf. Die Diffusionskapazität der Lunge ist der aussagekräftigste Marker für eine schlechte Prognose [31].

Die Bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist ein weiteres diagnostisches Mittel. Ein erhöhter Anteil an Neutrophilen oder Lymphozyten wird bei ca. der Hälfte aller Patienten beobachtet, die auch parenchymatöse Veränderungen in der HRCT aufweisen, allerdings haben auch 50% der Patienten mit pathologichem HRCT eine unauffällige BAL. Aktuell wird die BAL jedoch vor allem dazu genutzt, um Infektionen auszuschließen.

Nach einer Studie von Bouros et al. zeigt die Mehrheit aller Patienten, die an einer SSc-ILD leiden, auch histologisch das Muster einer NSIP [31]. Dies korreliert mit den Befunden einer NSIP in der HRCT. Dabei wird vor allem das Muster einer fibrotischen NSIP beobachtet, weniger das einer zellulären NSIP. Wie auch in der HRCT kann bei einigen Patienten auch das Muster einer UIP nachgewiesen werden. Verglichen mit IPF-Patienten zeigen SSc-Patienten jedoch weniger fibroblastische Foci und dafür mehr inflammatorische Areale [32].

Die Behandlung der SSc-ILD gestaltet sich schwierig. Initiale Therapieansätze haben in der Regel auf eine immunmodulierende und/oder antiinflammatorische Wirkung gezielt. Auch Kortikosteroide wurden früher benutzt, zeigten aber ebenfalls keinen Benefit.

In der Scleroderma Lung Study I (SLS I) wurde die Wirkung von Cyclophosphamid auf die SSc-ILD untersucht. Eine leichte Besserung der Lungenfunktion durch Cyclophosphamid konnte aufgezeigt werden, allerdings hielt diese Wirkung nur für 2 Jahre an [33]. Eine weitere große Studie, die Scleroderma Lung Study II (SLS II) untersuchte die Wirkung von Mycophenolat-Mofetil (MMF) auf die SSc-ILD und verglichen diese mit der Wirkung von Cyclophosphamid [34]. Eingeschlossen wurden SSc-Patienten mit klinisch und radiologisch nachgewiesener SSc-ILD, jedoch nicht solche mit bestehender PAH, Obstruktion oder hochgradig eingeschränkter Lungenfunktion. Im Verlauf wurden sowohl Parameter zur Einschätzung der Lungenfunktion (FVC und Dyspnoeindex) erhoben als auch Auswirkungen auf die Hautfibrose durch Erhebung des mRSS. Sowohl durch Cyclophosphamid als auch durch MMF konnte die Lungenfunktion (FVC) verbessert werden. Zudem konnte ebenfalls eine Verbesserung der Dyspnoe und der CT-morphologischen Veränderungen verzeichnet werden. Beide Therapieansätze führten zu einem moderat verbesserten mRSS, ohne dass es zwischen den beiden Medikamenten einen signifkanten Unterschied gab [35]. In der Cyclophosphamid-Gruppe traten jedoch mehr Studienabbrüche, therapiebedingte Nebenwirkungen und auch Todesfälle auf.
Auf Grund dessen erscheint eine Therapie mit MMF aktuell sinnvoll, diese stellt zum jetzigen Zeitpunkt jedoch einen off-label-use dar.
Im Gegensatz zu anderen interstitiellen Lungenerkrankungen hat die SSc-ILD eine relativ gute Prognose, stellt aber nichtsdestotrotz die häufigste Todesursache bei der SSc dar. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 82-90%, die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 29-69% [31]. Dabei scheint das Muster (NSIP vs. UIP) keinen signifikanten Unterschied zu machen.
Neben der SSc-ILD existiert die PAH als pulmonale Manifestationsform. Bei allen Kollagenosen weisen neben Patienten mit einer Mischkollagenose (mixed connective tissue disease) SSc-Patienten das höchste Risiko für die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie auf. Dabei sind Patienten mit einer lSSc nicht weniger betroffen als Patienten mit einer dSSc. Im Patientenkollektiv der lSSc stellt die PAH die häufigste Todesursache dar, in dem der dSSc die zweithäufigste nach der SSc-ILD. Die Diagnose einer pulmonalen Hypertonie kann unter Zuhilfenahme einer Echokardiographie erfolgen, in der der pulmonalarterielle Druck geschätzt werden kann. Nativröntgenologisch sind eine Rechtsherzvergrößerung, eine Lungengefäßrarefizierung in der Peripherie sowie erweiterte zentrale Pulmonalarterien Zeichen einer pulmonalen Hypertonie. Der Goldstandard ist die Rechtsherzkathetermessung, in der exakte Parameter zur Verifizierung einer PAH erhoben werden können.

Darüber hinaus gibt es auch Patienten, die sowohl unter einer ILD als auch unter einer PAH leiden. Die Häufigkeit wird mit ca. 18% angegeben. Das kombinierte Auftreten einer SSc-ILD und -PAH geht mit einer verschlechterten Prognose einher [36].

1.1.4 Therapie und Prognose

Die Therapie der systemischen Sklerose ist schwierig, da die Pathogenese der Erkrankung noch nicht hinreichend geklärt ist und stellt somit nach wie vor eine Herausforderung dar. Corticosteroide sind auf Grund der Gefahr einer renalen Krise nicht bzw. nur unter großer Vorsicht indiziert. Es werden je nach befallenen Organsystemen unterschiedliche Immunsuppressiva, Gefäßdilatatoren und physikalische Therapiemaßnahmen eingesetzt. Einige Therapieempfehlungen wurden im Jahr 2009 von der EUSTAR (European Scleroderma Trials and Research Group) veröffentlicht [37]. Zur Prophylaxe des häufig auftretenden Raynaud-Syndroms sollte zunächst auf einen ausreichenden Kälteschutz geachtet werden und eine Kälteexposition vermieden werden. Zur medikamentösen Therapie werden Calciumantagonisten zur besseren Perfusion eingesetzt. Auch Prostaglandinanaloga wie z.B. Iloprost können intravenös appliziert werden und haben – neben der Wirksamkeit beim Raynaud-Syndrom – auch bei vorhandenen digitalen Ulzerationen einen positiven Effekt. Der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan kann als weitere Behandlungsmöglichkeit bei digitalen Ulzerationen in Erwägung gezogen werden, verhindert jedoch lediglich das Enstehen neuer Läsionen. Hautbeteiligungen sprechen so gut wie nicht auf medikamentöse Therapieformen an, es gibt lediglich eine Empfehlung für die Abwägung einer Methotrexat (MTX)-Therapie, welche scheinbar eine Verbesserung der Hautläsionen bewirkt. Andere Organe sprechen jedoch auf die MTX-Therapie nicht an. Die Nierenbeteiligung war bis zur Einführung der ACE-Hemmer die häufigste Todesursache. Ob sich die Prognose durch ACE-Hemmer verbessert ist umstritten, da mitunter häufiger renale Krisen bei prophylaktischer Gabe auftreten [38]. Bei vorhandener gastrointestinaler Beteiligung können je nach vorherrschender Symptomatik unterschiedliche Medikamente eingesetzt werden. Zur Behandlung bzw. Prävention von gastroösophagealem Reflux werden Protonenpumpeninhibitoren (PPI) eingesetzt. Weiter kann die Gabe von prokinetischen Medikamenten (Metoclopramid und Erythromycin) bei Motilitätsstörungen in Erwägung gezogen werden. Eine durch Bakterienüberwucherung bedingte Malabsorption kann durch den rotierenden Einsatz verschiedener Antibiotika wie z.B. Chinolonen oder Amoxicillin/Clavulansäure therapiert werden. Die Behandlung einer Lungenbeteiligung in Form einer ILD oder PAH stellt einen besonders wichtigen Eckpfeiler der Therapie

dar, da die pulmonale Manifestation der SSc mittlerweile die häufigste Todesursache ist. Zur Therapie einer ILD kann aktuell Cyclophosphamid oder MMF eingesetzt werden [34] (siehe Kap. 1.1.3), auch Biologika wie Rituximab, Tocilizumab oder Abatacept zeigen erste erfolgversprechende Ergebnisse. Bei vorhandener PAH können verschiedene vasodilatatorisch wirksame Medikamente eingesetzt werden. So besteht auch hier eine deutliche Therapieempfehlung für den Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan, der neben einem gefäßdilatierenden Effekt auch einen antifibrotischen Effekt zu haben scheint. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Phosphodiesterase-5-Hemmern wie Sildenafil, das zur Behandlung der PAH zugelassen ist. Auch die Gabe von intravenösen Prostaglandinen (z.B. Epoprostenol) bzw. von Prostaglandinanaloga (z.B. Iloprost) kann in Erwägung gezogen werden. Neben allen beschriebenen medikamentösen Therapiemaßnahmen ist auch der Einsatz einer symptomatischen Therapie wichtig. Hierbei kommen physikalische Behandlungsmaßnahmen zur Therapie bzw. Vorbeugung von Kontrakturen zum Einsatz sowie Balneo- und Physiotherapie [4, 37].
Die Prognose der systemischen Sklerose ist individuell sehr unterschiedlich und hängt sowohl vom Subtyp der Erkrankung, dem Geschlecht sowie den betroffenen Organsystemen ab. Die häufigste sklerodermieassoziierte Todesursache ist eine pulmonale Krankheitsmanifestation in Form einer interstitiellen Lungenerkrankung oder einer pulmonal arteriellen Hypertonie. Die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei 70%. Dabei ist die Prognose bei der dSSc signifikant schlechter als bei der lSSc. Außerdem haben Männer, wenn auch seltener betroffen, eine niedrigere 10-Jahres-Überlebensrate als Frauen [23, 39].

1.2 Das Immunsystem und seine Rolle bei der systemischen Sklerose

1.2.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein Mechanismus des Organismus vieler Lebewesen, der vor Schäden durch pathogene Erreger, Toxine und maligne Zellen schützt. Dabei erfolgt eine Einteilung in die sogenannte angeborene (unspezifische) Immunantwort und in die adaptive (spezifische) Immunantwort. Außerdem kann man das Immunsystem in seine zellulären und humoralen Anteile gliedern. Die angeborene Immunantwort ist der phylogenetisch ältere Teil des Immunsystems und wird unabhängig von der Art des eindringenden Pathogens aktiv. Dazu gehören die Haut- und Epithelbarriere des Körpers, das Komplementsystem sowie Interferone und Interleukine. Darüber hinaus sind auch verschiedene Zellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems:

Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, Monozyten und Makrophagen sowie NK-Zellen (natürliche Killerzellen). Granulozyten bilden die erste Reihe in der Verteidigung gegen unterschiedliche Erreger, indem sie die Erreger abtöten, um dann anschließend von Makrophagen abgelöst zu werden, die die Phagozytose übernehmen. Dendritische Zellen und Makrophagen haben die Eigenschaft, aufgenomme und prozessierte Antigene an ihrer Oberfläche zu präsentieren und dadurch mit anderen Immunzellen zu interagieren. Durch diese Mechanismen werden dann die Grundlagen für den Einsatz des adaptiven Immunsystems gestellt. Dazu gehören T- und B-Lymphozyten, die gemeinsam eine spezifische Immunantwort bilden und somit für ein Gedächtnis im Immunsystem sorgen. Dabei werden die T-Zellen in zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ T-Zellen) und T-Helferzellen ($CD4^+$ T-Zellen) unterteilt. T-Helferzellen lassen sich nochmals in TH1- und TH2-Zellen gliedern. Die Zellen des adaptiven Immunsystems reagieren spezifisch auf ein bestimmtes Antigen, dessen passenden Rezeptor sie an ihrer Oberfläche tragen. Zytotoxische T-Zellen reagieren dabei auf Antigene, die ihnen in Verbindung mit sogenannten MHC-I-Molekülen präsentiert werden, welche sich auf allen Körperzellen finden. Die wichtigste Aufgabe ist dabei die Elimination von virusinfizierten Zellen. T-Helferzellen sorgen für die Aktivierung von B-Zellen und katalysieren die Immunantwort durch Chemotaxis von weiteren Immunzellen. Dabei sind TH1-Zellen über die Sekretion unterschiedlicher Zytokine für die Proliferation und Spezifizierung der T-Zellen und somit für die zelluläre Immunreaktion verantwortlich. TH2-Zellen sorgen über eine Stimulierung von B-Zellen, die in antikörpersezernierende Plasmazellen differenzieren, für den humoralen Part der Immunantwort. Das adaptive Immunsystem darf dabei nicht als Ersatz für das angeborene Immunsystem verstanden werden, vielmehr gehen die beiden Systeme Hand in Hand [40, 41].

1.2.2 Pathogenese der systemischen Sklerose

Die Pathogenese der systemischen Sklerose ist komplex und besteht nach heutigem Wissen aus drei grundsätzlich involvierten Mechanismen: Vaskulopathie, autoimmune Reaktion und Fibrose.

Eine **Vaskulopathie** im Sinne einer mikroangiopathischen Veränderung scheint der eigentlichen Fibrose vorauszugehen. Zunächst kommt es zu einer Schädigung, Aktivierung und anschließend zur Apoptose von Endothelzellen. Dabei wird die Durchlässigkeit für Leukozyten erhöht und verschiedene Zytokine wie PDGF (Plateled Derived Growth Factor), TGF-β (Transforming Growth Factor beta) und Endothelin-1

von dem veränderten Endothel sezerniert. Es folgt eine Einwanderung und Aktivierung von Immunzellen und Fibroblasten; um die Kapillaren bilden sich perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate. Anschließend kommt es zu einem konsekutiven Remodelling der betroffenen Gefäße. Durch das Remodelling hypertrophieren und/oder fibrosieren die einzelnen Gefäßschichten (Intima, Media und Adventitia), was eine Verengung und letztlich eine Okklusion des jeweiligen Gefäßes zur Folge hat. Das von den versorgenden Kapillaren betroffene Gewebe wird hypoxisch. Normalerweise reagiert hypoxisches Gewebe mit einer gesteigerten Gefäßneubildung (Neoangiogenese), doch auch dieser Mechanismus scheint bei der SSc fehlerhaft zu sein. Paradoxerweise findet sich bei SSc-Patienten eine gesteigerte Bildung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), der physiologischerweise für eine Gefäßneubildung sorgt, die jedoch bei der systemischen Sklerose nicht beobachtet werden kann. Als histopathologisches Korrelat der Vaskulopathie finden sich Riesenkapillaren mit irregulärer Gefäßarchitektur, Mikrohämorrhagien sowie avaskuläre Areale. Klinisch zeigen sich als Ausdruck der mikrovaskulären Störungen digitale Ulzerationen, die PAH, die renale Vaskulopathie, das Raynaud-Phänomen sowie Gefäßektasien im gastrointestinalen Bereich [42–45].

Ein weiterer Aspekt in der Pathogenese der systemischen Sklerose ist die **autoimmune Reaktion**. Dabei sind sowohl das adaptive und das angeborene Immunsystem als auch dessen humoraler und zellulärer Schenkel beteiligt. Dabei kommt es im Rahmen der Endothelzellaktivierung und –zerstörung zur Einwanderung und Ansammlung von verschiedenen Immunzellen. Um die Gefäße finden sich perivaskuläre Infiltrate, die vor allem aus Lymphozyten und Makrophagen, aber auch aus B-Zellen und Mastzellen bestehen. Innerhalb der lymphozytären Zellansammlungen lassen sich insbesondere $CD4^+$ T-Zellen finden, die insbesondere über die TH2-Subpopulation verschiedene profibrotische Zytokine sezernieren. Darüber hinaus lässt sich auch eine überschießende B-Zell-Antwort nachweisen, die eventuell auf dem Boden eines molekularen Mimikrys enstehen könnte. Als Resultat der B-Zell-Aktivierung entstehen verschiedene mit der SSc assoziierte Antikörper (siehe Kap. 1.1.2), die oft Aufschluss über den Subtyp der Erkrankung und die Schwere des Verlaufs geben können. Allerdings ist ihre pathogenetische Relevanz im Einzelfall unklar. Über die von aktivierten B- und T-Zellen sezernierten Zyto- und Chemokine kommt es zur Einwanderung von Fibroblasten sowie deren Aktivierung und Differenzierung, was letztlich eine gesteigerte Synthese von Extrazellulärmatrix, v.a. Kollagen, zur Folge hat.

Die **Fibrose** ist das klinisch hervorstechende Krankheitsmerkmal und hauptverantwortlich für die Morbidität und Mortalität der systemischen Sklerose. Fibrotische Veränderungen finden sich sowohl in der Haut als auch in den inneren Organen. Die initiale Entzündungsphase wird graduell durch eine fibrotische Umwandlung des Gewebes abgelöst. Dabei kommt es durch eine Fehlregulation der EZM (Extrazellularmatrix)-Produktion zu einer Ansammlung von Kollagen, Proteoglykanen, Fibrillin und Glykosaminoglykanen. Fibroblasten haben bei der Produktion der EZM eine tragende Rolle inne. Die von Endothelzellen, Thrombozyten, Epithelzellen und Immunzellen ausgeschütteten Mediatoren führen zu einer Aktivierung und Differenzierung der Fibroblasten, die daraufhin Kollagen und andere Bestandteile der EZM produzieren sowie das bestehende Gewebe remodellieren. Fibroblasten wandeln sich zum Teil auch in Myofibroblasten um, die weiterhin die Fähigkeit zur Kollagensynthese besitzen und eine Hauptquelle des sezernierten profibrotischen Zytokins TGF-β sind. Außerdem führen Myofibroblasten durch ihre kontraktilen Eigenschaften zu einem Zusammenziehen des fibrotischen Gewebes. Während bei der physiologischen Wundheilung die beschriebenen Prozesse einer strengen Regulation unterliegen und sich im Verlauf selbst limitieren, fehlt diese in der systemischen Sklerose [42, 46, 47].
Zusammenfassend sorgt eine komplexe Interaktion von Vaskulopathie, fehlregulierter Immunantwort und konsekutiv entstehender Fibrose für das klinische Bild der systemischen Sklerose.

1.2.3 Die Rolle von CD4-, CD8- und CD68-positiven Immunzellen

$CD4^+$ T-Zellen sind auch als T-Helferzellen bekannt und Teil des adaptiven Immunsystens. CD steht für *Cluster of Differentiation*, welche eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenmoleküle von Immunzellen umfasst. Das CD4-Molekül befindet sich hauptsächlich auf T-Helferzellen, aber in geringerer Ausprägung auch auf Makrophagen und B-Zellen. T-Helferzellen sind für die Ausrichtung der Immunantwort in eine bestimmte Richtung verantwortlich, indem sie andere Immunzellen aktivieren und verschiedene Zytokine sezernieren. Um aktiv am Geschehen teilzunehmen, müssen T-Helferzellen jedoch zuerst aktiviert werden. Dies geschieht über antigenpräsentierende Zellen (APZ), zu denen B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen gehören. Von den APZ wird ein Antigen endozytotisch aufgenommen, prozessiert und Teile davon an ihrer Oberfläche in Kombination mit einem bestimmten Molekül, dem MHC-II-Rezeptor, präsentiert. Der MHC-II-Rezeptor

dockt an das CD4-Molekül einer zu dem Antigen passenden T-Helferzelle an und aktiviert diese dann. Anschließend erfolgt die Differenzierung entweder zur TH1- oder TH2-Zelle, die beide Subtypen der CD4-positiven Zellen darstellen und jeweils die Immunantwort in eine bestimmte Richtung lenken. Erfolgt die Weiterentwicklung zu einer TH1-Zelle, wird insbesondere der zelluläre Anteil des adaptiven und angeborenen Immunsystems aktiviert. Hierbei werden verschiedene Zytokine ausgeschüttet, die ihrerseits für die Aktivierung bzw. Stimulation von Makrophagen und $CD8^+$ T-Zellen (T-Killerzellen) sorgen. Wird die Immunantwort in Richtung des TH2-Pfades gelenkt, werden B-Zellen dazu stimuliert, sich in Antikörper-produzierende Plasmazellen umzuwandeln; es erfolgt also eine Aktivierung des humoralen Immunsystems. Dabei werden vor allem die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 sowie IL-10 und IL-13 ausgeschüttet. Neben den genannten TH1- und TH2-Zellen gibt es noch regulatorische T-Helferzellen und Memory-T-Zellen. Die Bedeutung der $CD4^+$ T-Zellen für das Funktionieren des Immunsystems kann am Beispiel der HIV-Infektion gezeigt werden: Das HI-Virus befällt $CD4^+$ T-Zellen und sorgt dafür, dass deren Anzahl stetig sinkt. Wird eine bestimmte Untergrenze erreicht, kommt es zur Insuffizienz des Immunsystems, welche sich durch das Auftreten opportunistischer Infektionen manifestiert. Auch in vielen Autoimmunkrankheiten scheinen T-Helferzellen eine wichtige Rolle zu spielen, so auch in der systemischen Sklerose. In befallenen Hautarealen lassen sich Immunzellinfiltrate nachweisen, die vor allem aus aktivierten Lymphozyten und Makrophagen bestehen und schon vor dem Auftreten fibrotischer Veränderungen zu beobachten sind. Dabei kann anhand des Zytokinprofils beobachtet werden, dass es sich bei den vorhandenen T-Helferzellen vor allem um TH2-Zellen handelt. Zu den sezernierten Zytokinen gehören v.a. IL-4, IL-6 und IL-13, die allesamt einen profibrotischen Effekt haben. Über diese Zytokine werden Fibroblasten dazu stimuliert, Bestandteile der EZM, allen voran Kollagen, zu produzieren [48]. Die Anzahl der sich in der Haut befindlichen T-Helferzellen scheint mit der Hautdicke zu korrelieren [49]. Im Ratten-Tiermodell von Westermann et al. zeigte sich bei einer durch Bestrahlung verursachten interstitiellen Lungenerkrankung ein Anstieg von TH2-Zellen sowie von IL-4 mRNA, welches vor allem von TH2-Zellen produziert wird und somit eine Rolle von TH2-Zellen in der Pathogenese der pulmonalen Fibrose impliziert [50]. Auch konnte in einer Studie von Tsukamoto et al., in der eine autologe hämapoetische Stammzelltransplantation als Therapiemaßnahme bei vorhandener SSc durchgeführt wurde, eine Reduktion der TH2-Zellen sowie eine Reduktion der von TH2-Zellen produzierten profibrotischen Zytokine nachgewiesen werden [51].

$CD8^+$ T-Zellen sind auch als zytotoxische T-Zellen bekannt und Part des adaptiven Immunsystens. Das CD8-Molekül befindet sich auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Zellen und interagiert mit dem MHC-I-Rezeptor, welcher sich auf allen kernhaltigen Körperzellen befindet. Über den MHC-I-Rezeptor werden Teile zelleigener Proteine an der Oberfläche der Zelle dargestellt. Sind diese pathologisch verändert, erkennt dies die passende zytotoxische T-Zelle und sorgt über verschiedene Wege zu einer Vernichtung der krankhaft veränderten Zellen. Dieser Mechanismus greift zum Beispiel bei parasiten- oder virusinfizierten Zellen, aber auch bei Tumorzellen [41]. Über die Rolle von $CD8^+$ T-Zellen bei der systemischen Sklerose ist nur wenig bekannt, da $CD4^+$ T-Zellen die prädominante Form von in SSc-Hautinfiltraten nachweisbaren T-Zellen sind und dementsprechend sich die meiste Forschung auf die Rolle von $CD4^+$ T-Zellen in der systemischen Sklerose konzentrieren [49, 52]. Im weiteren Verlauf fokussierten sich einige Studien auch auf die genauere Erforschung der Rolle von $CD8^+$ T-Zellen in der Pathogenese der SSc. In einer Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von SSc-Patienten konnte eine erhöhte Anzahl von $CD8^+$ T-Zellen im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Darüber hinaus exprimierten diese $CD8^+$ T-Zellen auch mehr IL-4 und IL-5, beides profibrotische Zytokine. Die Expression dieser Typ-2 Zytokine war hierbei auch mit einer Verschlechterung der Lungenfunktionskapazität der betroffenden Patienten korreliert [53]. In Untersuchungen von Lungengewebe von an systemischer Sklerose erkrankten Patienten zeigte sich außerdem in $CD8^+$ T-Zellen ein aktivierter profibrotischer Genotyp [54]. In peripheren zytotoxischen T-Zellen von SSc-Patienten konnte eine Überproduktion des profibrotischen Zytokins IL-13 nachgewiesen werden, sowohl im Vergleich mit gesunden Kontrollen als auch an RA (Rheumatoider Arthritis) erkrankten Patienten [55]. In der Pathogenese der systemischen Sklerose könnten $CD8^+$ T-Zellen autoimmune Prozesse durch die Produktion von immunomodulatorischen und profibrotischen Zytokinen beeinflussen [52].

CD68 ist ein Oberflächenmolekül, das sich auf **Makrophagen und Monozyten** befindet. Makrophagen sind auch als sogenannte „Fresszellen“ bekannt und gehören zu den Leukozyten. Sie stellen einen phylogenetisch sehr alten Teil der angeborenen Immunantwort dar und sind auch bei niedrig entwickelten Lebewesen vorhanden. Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten, die deren Vorläuferform im Knochenmark und im Blutkreislauf darstellen. Verlassen Monozyten die Blutgefäße und wandern in Gewebe ein, differenzieren sie sich zu ortsständigen Makrophagen. Dabei entstehen verschiedene Arten von Makrophagen, die jeweils für das Gewebe spezifisch sind: Zum Beispiel Alveolarmakrophagen in der Lunge, Kupffer-Zellen in der

Leber, Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem oder Histiozyten im Bindegewebe. Makrophagen können fusionieren und sogenannte mehrkernige Riesenzellen bilden. Hauptaufgabe der Makrophagen ist die Phagozytose von potenziellen Krankheitserregern, die durch Makrophagen über verschiedene Mechanismen erkannt werden. Anschließend werden die aufgenommenen Erreger intrazellulär verkleinert und neutralisiert. Anteile der aufgenommenen Erreger werden anschließend auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert, die somit auch als antigenpräsentierende Zelle fungieren und so zu einer Aktivierung von T-Zellen sorgen. Darüber hinaus sind Makrophagen auch in der Lage, verschiedene proinflammatorische Zytokine auszuschütten, die wiederum zu einer Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und zur Einleitung einer lokalen Entzündungsreaktion sorgen. Außerdem sind Makrophagen auch für das Beseitigen von apoptotischen körpereigenen Zellen verantwortlich. Makrophagen können sich in zwei verschiedene Arten von aktivierten Formen umwandeln. Diese Formen spiegeln die Subspezifizierung der T-Helferzellen in TH1- und TH2-Zellen wider. So ist die M1-Form, welche den klassischen Aktivierungsweg beschreibt und mit der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF-α und IL-1β einhergeht, mit proinflammatorischen Prozessen verbunden. Eine weitere Möglichkeit ist die Differenzierung zur M2-Form, die mit Vaskularisations- und Wundheilungsprozessen assoziiert ist, und scheinbar in die Pathogenese fibrotischer Erkrankungen über die Sekretion von profibrotischen Zytokinen wie IL-4, Il-13 und TGF-β involviert ist [56]. Neueren Forschungsergebnissen zufolge ist die Unterteilung in M1- und M2-Makrophagen eine starke Vereinfachung, da es anhand von Ursprung, Ontogenese, zellulären Aktivierungsmarkern und sezernierten Zyto- und Chemokinen noch vielfältige Einteilungsmöglichkeiten gibt, die jedoch noch Gegenstand der Forschung sind und sich bisher noch keine genauere Nomenklatur durchgesetzt hat [57]. Makrophagen spielen für die Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine Rolle. So sind sie an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt, indem sie Cholesterin und Triglyceride aufnehmen und sich dann selbst in Form von sogenannten Schaumzellen in die Wände der betroffenen Arterien einlagern. Auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen sind sie einbezogen, so zum Beispiel auch in die der rheumatoiden Arthritis (RA). Hier sind Makrophagen in die Entzündung der Gelenke involviert, indem sie einerseits andere Immunzellen aktivieren und andererseits Zytokine und matrixdegradierende Enzyme sezernieren [58]. Auch beim Sjögren-Syndrom, einer weiteren Autoimmunerkrankung, scheinen Makrophagen eine Rolle in der Pathogenese zu spielen: So zeigt sich auch hier eine Infiltration der lakrimalen Drüsen mit Makrophagen und eine Besserung der Symptomatik nach deren Hemmung [59]. Bei der systemischen Sklerose können Makrophagen in untersuchten

Hautinfiltraten nachgewiesen werden, in denen sie in signifikant höherer Anzahl vorkommen als bei gesunden Kontrollen [56]. Bereits in der Frühphase der Erkrankung lassen sich innerhalb der Entzündungszellinfiltrate der Haut vorwiegend Makrophagen nachweisen, die im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht sind. Im Gegensatz hierzu ist die Anzahl an T-Lymphozyten in inflammatorischen Hautinfiltraten zu Beginn nur leicht erhöht [60].
Zusammenfassend können sowohl T-Zellen als auch Makrophagen und Monozyten über die Sekretion profibrotischer Zytokine und über eine gegenseitige Aktivierung in die Pathogenese der systemischen Sklerose involviert sein. Das oder die hierfür auslösenden Agentien sind kontinuierlicher Gegenstand der Forschung.

1.3 Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF)

1.3.1 Definition, Epidemiologie und Ätiopathogenese

Die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) gehört zur Gruppe der idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP), die eine Untergruppe der interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) darstellt. Die IPF ist definiert als chronisch progredient verlaufende fibrosierende interstitielle Pneumonie unbekannter Ursache. Die Diagnose einer IPF kann nur gestellt werden, wenn andere interstitielle Pneumonien und interstitielle Lungenerkrankungen, die im Rahmen von systemischen Erkrankungen, Medikamenteneinnahme oder Umweltfaktoren auftreten, ausgeschlossen werden können [61, 62]. Die Einteilung der IIP gestaltet sich seit jeher schwierig, da pathophysiolgisch immer noch wenig über die Krankheitsentitäten bekannt ist und besonders die Ätiopathogenese weiterhin Gegenstand der Forschung ist. Im Jahr 2002 wurde von der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS) eine Richtlinie erarbeitet, die im Jahr 2013 aktualisiert wurde. Dabei beruht die Einteilung sowohl auf klinischen als auch radiologischen und histologischen Kriterien [63, 64]. Eine Übersicht zu der Einteilung der ILDs nach ATR/ERS ist in Abb. 1 dargestellt.

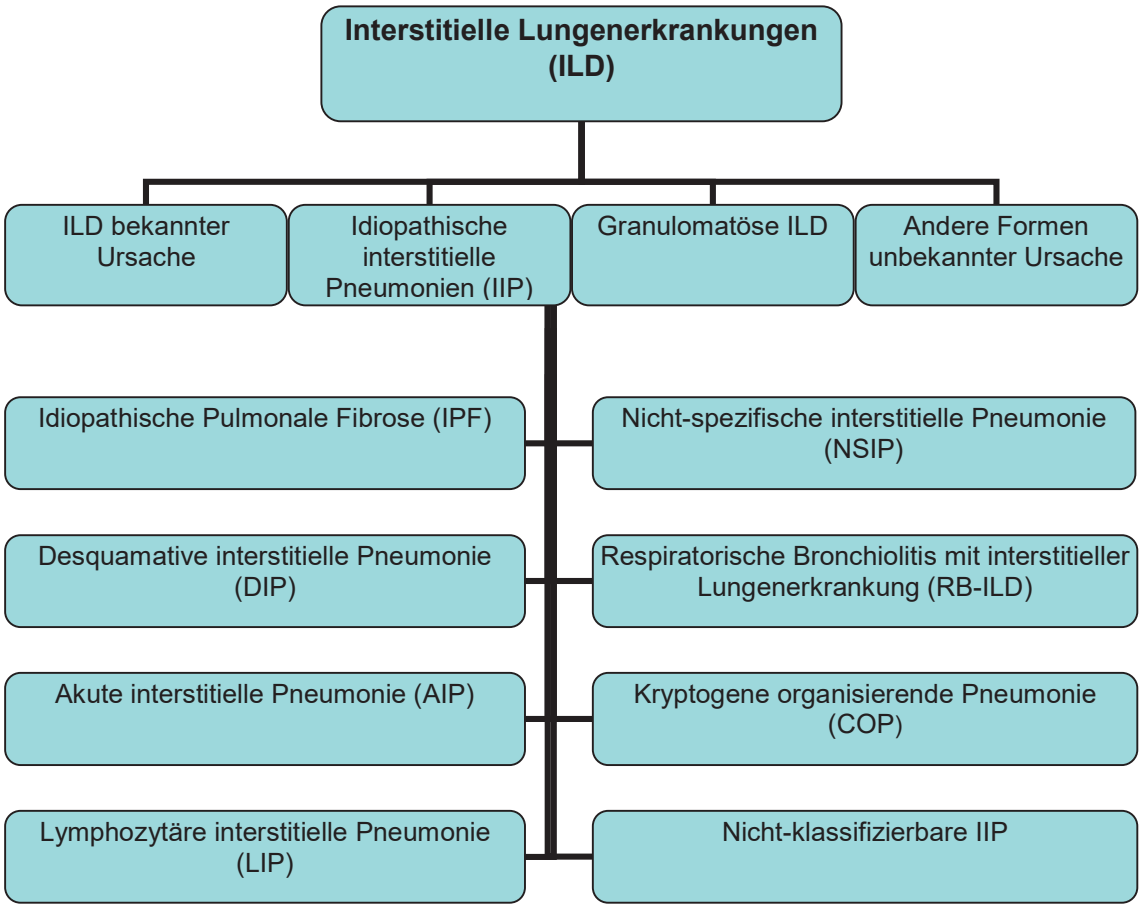


Abbildung 1: Einteilung der interstitiellen Lungenerkrankungen nach der ATR/ERS, AJRCCM, 2002

Die aktualisierte Klassifikation der IIPs von 2013 berücksichtigt dabei außerdem das Vorhandensein einer Raucheranamnese, die verschiedenen Verlaufsformen (akut vs. chronisch) und beschreibt als neue Entität die idiopathische pleuroparenchymale Fibroelastose [64]. Die aktuelle Klassifikation der IIPs ist in Tab. 2 dargestellt.

Häufige IIP	Fibrosierende IIP	• Idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) • Nicht-spezifische interstitielle Pneumonie (NSIP)
	Raucher-assoziierte IIP	• Respiratorische Bronchiolitis mit interstitieller Lungenerkrankung (RB-ILD) • Desquamative interstitielle Pneumonie (DIP)
	Akut/Subakute IIP	• Akute interstitielle Pneumonie (AIP) • Kryptogene organisierende Pneumonie (COP)
Seltene IIP		• Idiopathische pleuroparenchymale Fibroelastose (PPFE) • lymphozytäre interstitielle Pneumonie

Tabelle 2: Einteilung der idiopathischen interstitiellen Pneumonien nach der American Thoracic Society und European Respiratory Society 2013.

Die IPF ist die häufigste Form der IIPs. Dabei tritt sie vor allem zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf und ist bei Männern häufiger als bei Frauen. Bei der Mehrheit der Patienten liegt eine Raucheranamnese vor. Die Darstellung der Inzidenz und Prävalenz der IPF gestaltet sich dahingehend schwierig, als dass die aktuellen diagnostischen Kriterien der ATS erst seit dem Jahr 2002 bestehen und in vielen Studien verschiedene Krankheitskollektive miteingeschlossen wurden. Die Inzidenz für die IPF wird mit 7-11 pro 100.000 angegeben, die Prävalenz mit 13-20 pro 100.000 [65, 66]. Eine Manifestation der IPF vor dem 50. Lebensjahr ist selten und häufig mit einer noch subklinischen Kollagenose vergesellschaftet [61].

Die Ätiopathogenese der IPF ist per definitionem unklar und weiterhin Gegenstand der Forschung. Aktuell wird angenommen, dass es durch das Zusammenspiel einer genetischen Disposition und exogenen Noxen über Alveolarepithelschädigungen zunächst zu einer gesteigerten Alveolarzellapoptose mit konsekutiver Fibrosebildung kommt. Zu den Noxen gehören Zigarettenrauchen, vorausgegangene Virusinfekte und ein gastroösophagealer Reflux, der eventuell zu Mikroaspirationen führen kann. Genetische Mutationen wurden bei Patienten mit familiärer IPF im Gen für Surfactant Protein A und C sowie im Telomerasekomplex und im MUC5B-Promoter

nachgewiesen. Die familiär auftretende IPF macht mit ca. 5% jedoch nur einen sehr geringen Anteil aus. Sowohl den genetischen Mutationen als auch den exogenen Noxen wird sowohl alleine als auch in Kombination eine Schädigung des Alveolarepithels nachgesagt. Vermutet wird, dass durch diese Alveolarzellschädigung zunächst Apoptosevorgänge entstehen, es jedoch nicht zu einer physiologischen Regeneration kommt, sondern ein fehlgesteuerter Wundheilungsprozess initiiert wird. Dabei wandern Fibroblasten in die betroffenen Areale ein und sorgen über eine gesteigerte Produktion von Extrazellularmatrix für eine Fibrosierung [67, 68]. Durch die Fibrosierung entstehen immer dicker werdende Alveolarsepten und somit eine immer dicker werdende Blut-Luft-Schranke.

1.3.2 Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie

Die IPF ist eine Erkrankung der Lunge, die bei den Betroffenen initial zu Belastungsluftnot und trockenem Husten führt. Im weiteren Verlauf können klinische Zeichen der Hypoxämie beobachtet werden – dazu gehören Trommelschlegelfinger, Uhrglasnägel und später eine Akro- und Lippenzyanose. Im weiteren Verlauf kann eine Rechtsherzinsuffizienz („cor pulmonale“) beobachtet werden. Diese Symptome sind jedoch nicht spezifisch für die IPF, sondern können bei den meisten Lungenerkrankungen auftreten. Bei der klinischen Untersuchung findet sich typischerweise ein inspiratorisches bibasales Knisterrasseln (sogenannte Sklerophonie), das charakteristisch für interstielle Lungenerkrankungen ist und das bei Vorhandensein weitere diagnostische Maßnahmen nach sich ziehen sollte. Durch das Fortschreiten der Erkrankung verschlimmern sich die Symptome im Verlauf, wobei eine respiratorische Insuffizienz im Vordergrund steht, die im fortgeschrittenen Krankheitsstadium oft schon durch eine Sprech- oder Ruhedyspnoe gekennzeichnet ist. Die Prognose der IPF ist schlecht – durch die zunehmende Fibrosierung des Lungengewebes kommt es zu einer progredienten Verschlechterung des Gasaustausches. Jedoch können heterogene Verläufe beobachtet werden, mit Patienten, die lange Zeit auf einem stabilen Krankheitsniveau bleiben und solchen, bei denen es zu einer akuten Exazerbation kommt. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 3-5 Jahre und liegt damit unterhalb der vieler maligner Erkrankungen [67]. Bei dem klinischen Verdacht auf eine IPF sollte zunächst eine Lungenfunktionsuntersuchung durchgeführt werden, in der sich typischerweise eine restriktive Lungenfunktionsstörung mit herabgesetzter Vitalkapazität sowie eine Gasaustauschstörung mit verminderter Diffusionskapazität zeigt. Die

Lungenfunktionsprüfung kann helfen, den Schweregrad der IPF einzuschätzen, ist auch im späteren Verlauf wichtig zur Überwachung des Krankheitsverlaufes und hat dementsprechend auch eine prognostische Aussagekraft [68]. Laborchemisch kann in der arteriellen oder kapillären Blutgasanalyse eine respiratorische Insuffizienz beobachtet werden, in der sich ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck zeigt.

Die sichere **Diagnose** einer IPF kann nur dann gestellt werden, wenn andere interstitielle Lungenerkrankungen ausgeschlossen wurden. Zur Diagnosestellung einer IPF ist heutzutage keine zwingende Lungenbiopsie mehr nötig. Die IPF geht radiologisch und histopathologisch mit dem Muster einer sogenannten „usual interstitial pneumonia“ (UIP) einher. Dabei ist der Goldstandard zur radiologischen Diagnostik interstitieller Lungenerkrankungen die HR-CT (high resolution computed tomography), eine hochauflösende CT-Untersuchung, in der durch dünne Schichten und hohe räumliche Auflösung eine sehr gute Darstellung des Lungenparenchyms gelingt. Radiologisch geht das UIP-Muster mit einer subpleuralen und basalen Prädominanz, retikulären Veränderungen, Honigwaben mit oder ohne Traktionsbronchieektasen sowie dem Fehlen von Charakteristika, die mit einer UIP nicht vereinbar sind, einher. Dabei sind insbesondere die sogenannten Honigwaben, welche zystische Hohlräume im Lungenparenchym beschreiben, typisch für das Muster der UIP. Sollte die Diagnosestellung mittels HR-CT nicht sicher gelingen, sollte eine histopathologische Abklärung mittels Lungenbiopsie vorgenommen werden. Auch hier würde man bei der IPF das histologische Muster der UIP erwarten. Für diese typisch ist zuallererst das heterogene Erscheinungsmuster mit dem Nebeneinander von fibrotischen Herden, zystischen Hohlräumen sowie noch erhaltenem physiologischen Lungengewebe. Zu den histopathologischen UIP-Kriterien gehören eine deutliche Fibrose bzw. Architekturzerstörung des Lungengewebes, Honigwaben, Fibroblastenherde, ein fleckförmiger Befall durch die Fibroseherde sowie das Fehlen von Charakteristika, die gegen eine UIP oder für eine andere Diagnose sprechen würden [61, 63].

Die **Therapie** der IPF besteht aus medikamentösen und nicht-medikamentösen therapeutischen Maßnahmen. Dabei ist die medikamentöse Therapie weiterhin Gegenstand intensiver Forschung; eine Heilung ist zurzeit nicht möglich. Wie auch in der Klassifikation hat es zur Therapie der IPF in den vergangenen Jahren viele Neuerungen gegeben. Früher war man der Auffassung, dass interstitielle Lungenerkankungen, so auch die IPF, vor allem entzündlicher Pathogenese sind, und versuchte diese mit Kortikosteroiden und Immunsuppressiva wie z.B. Azathoprin und Cyclosporin zu behandeln. Für viele Krankheitsentitäten ist dieser Ansatz auch richtig,

z.B. bei der Sarkoidose. Darüber hinaus wurde N-Acetylcystein (NAC) eingesetzt, ein Derivat der körpereigenen Aminosäure Cystein, das eigentlich für seine mukolytischen Eigenschaften und Wirksamkeit als Paracetamol-Antidot bekannt ist, jedoch auch anti-oxidative Eigenschaften hat. Im Verlauf existierte dann zur Behandlung der IPF eine Triple-Therapie aus Kortikosteroiden, Azathioprin und NAC. In der groß angelegten PANTHER-Studie von Raghu et al. aus dem Jahr 2012 zeigte sich jedoch, dass diese Triple-Therapie zu einem verschlechterten Outcome geführt hat, so dass die Studie sogar abgebrochen werden musste [69]. Durch diese Studienergebnisse wurde die deutsche Leitlinie zur Behandlung der IPF modifiziert, indem aktuell eine negative Empfehlung für die Triple-Therapie mit Prednisolon, Azathioprin und NAC gilt. Auch gab es Ansätze, antifibrotisch und/oder immunomodulatorisch wirksame Substanzen wie IFN-y oder TNF-α-Antagonisten einzusetzen, die jedoch in klinischen Studien ohne Erfolg blieben. Seit einigen Jahren gibt es Studien zu dem Wirkstoff Pirfenidon, dem eine antioxidative, entzündungshemmende und antifibrotische Wirkweise nachgesagt wird. Der genaue Wirkmechanismus ist dabei noch unklar. In der ASCEND-Studie konnte die Grundlage für eine positive Therapieempfehlung mit Pirfenidon gelegt werden [70]. Hier ließen sich in zwei von drei Phase-III-Studien jeweils ein positives Outcome für eine Pirfenidontherapie nachweisen. Die Patienten hatten durch die Pirfenidontherapie eine signifikante Verbesserung der forcierten Vitalkapazität (FVC) in der Lungenfunktion sowie des 6-Minuten-Gehweges erreichen können. Neben Pirfenidon haben aktuelle Studien auch einen positiven Effekt von Nintedanib, einem Multi-Tyrosinkinaseinhibitoren, vermuten lassen [71]. Für beide Wirkstoffe sind klinische Studien in Planung bzw. etabliert.

Neben der pharmakologischen Therapie bestehen weitere Therapiemaßnahmen. Durch den verminderten Gastaustausch ist vorallem eine Sicherstellung der Oxygenierung notwendig, so dass Patienten einer Sauerstofflangzeittherapie zugeführt werden sollten, wenn diese erforderlich ist. Dabei besteht sowohl die Möglichkeit einer mobilen Sauerstoffversorgung, wenn diese z.B. nur unter körperlicher Belastung notwendig ist, sowie einer Sauerstoffheimtherapie, wenn bereits in Ruhe eine sauerstoffpflichtige Hypoxämie besteht. Weiterhin sollte bei kontinuierlicher Verschlechterung auch die Möglichkeit palliativer Maßnahmen in Betracht gezogen werden. Eine Lungentransplantation bleibt die einzige kurative Therapiemaßnahme, so dass bei geeigneten Patienten frühzeitig mit einer Listung begonnen werden sollte.

1.3.3 Vergleich zwischen IPF und SSc-ILD

Die IPF und die SSc-ILD gehören beide zu den interstitiellen Lungenerkrankungen und haben mitunter viele Gemeinsamkeiten. Beiden gemein ist ein fortschreitender fibrotischer Umbau des Lungenparenchyms aufgrund einer nur unvollständig verstandenen Pathogenese, welcher mit einer konsekutiven Reduktion der Lungenfunktion und damit mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. Die kausale Behandlung gestaltet sich jeweils schwierig, so dass ein besonderer Augenmerk auf die weiteren Erforschung der Pathogenese gelegt wird, wobei sowohl die Unterschiede als auch die Gemeinsamkeiten von hoher Relevanz sind, da sich daraus eventuell Hinweise für die Ätiopathogenese und damit für mögliche Therapieversuche ableiten.

Von der SSc-ILD sind, entsprechend der Epidemiologie der SSc, vor allem Frauen zwischen 30 und 55 Jahren [42], von der IPF Männer zwischen 60 und 70 Jahren betroffen. Bis zu 90% aller SSc-Patienten entwickeln eine Form der ILD [22]. Die Prävalenz der IPF steigt, entgegen der der SSc, mit dem Alter an. Gelegentlich ist die Manifestation einer ILD die Erstmanifestation der SSc. Bei beiden Entitäten werden Assoziationen mit externen Einflüssen beschrieben, so bei der SSc mit Silikaten und Vinylchlorid, bei der IPF mit Zigarettenrauchen [22, 61].

Radiologisch findet sich bei Patienten mit SSc-assoziierter ILD in der HRCT häufig das Bild einer NSIP (siehe Kap. 1.1.3), welche Milchglastrübungen, Mikronoduli und Honigwaben zeigt. Das radiologische Muster einer UIP wird nur unregelmäßig nachgewiesen [22]. Im Gegensatz zur SSc-assoziierten ILD bedarf die Diagnosestellung einer IPF dem radiologischen Nachweis eines UIP-Musters (siehe Kap. 1.3.2) in der HRCT, welches vorallem durch eine subpleurale und basale Prädominanz, retikuläre Veränderungen sowie Honigwaben mit oder ohne Traktionsbronchieektasen gekennzeichnet ist [61].

In einer Studie von Desai et al. [30] wurden radiologische Befunde von IPF und SSc-assoziierter ILD verglichen. Hier zeigte sich, dass Patienten mit IPF eine ausgeprägtere Fibrose hatten, jedoch weniger Milchglastrübungen. Dies geht einher mit den Unterscheidungskriterien einer UIP verglichen mit einer NSIP. Allerdings muss beachtet werden, dass die Diagnosekriterien zum Zeitpunkt der Studie nicht so exakt waren wie die heutigen, so dass die Aussagekraft eingeschränkt bleibt.

In histopathologischen Proben von Patienten mit SSc-assoziierter ILD zeigt sich häufig das Bild eines fibrotischen Umbaus, das zeitweise homogen verteilt ist. Zudem findet sich häufig nur ein mäßiger Anteil an inflammatorischen Zellinfiltraten, was konkordant mit dem Bild einer fibrotischen NSIP ist [31]. Auch zeigen wenige SSc-Patienten

(<10%) das Bild einer zellulären NSIP, in der statt eines fibrotischen Umbaus interstitielle lymphozytäre Infiltrate darstellbar sind. Einige SSc-Patienten (<30%) zeigen jedoch auch das Muster einer UIP. Auch kann bei der SSc-assoziierten ILD gelegentlich eine pleurale Beteiligung beobachtet werden [22].

Bei der IPF zeigt sich hingegen immer das Bild einer UIP (gewöhnlichen interstitiellen Pneumonie), die typischerweise gekennzeichnet ist von einem Nebeneinander von fibrotisch veränderten Arealen und physiologischem Lungenparenchym.

Der klinische Verlauf der beiden Entitäten ist teilweise verschieden: Bei der SSc-assoziierten ILD wird das mediane Überleben mit 5-8 Jahren angegeben, wohingegen das der IPF mit 2-3 Jahren deutlich darunter liegt. Bei der SSc-assoziierten ILD werden verschiedene Verläufe beschrieben, auch spontane Verbesserungen können beobachtet werden. Die IPF hingegen ist häufig durch eine stetige Verschlechterung gekennzeichnet. Zudem kommt es bei der IPF häufig zu akuten Exazerbationen, die durch eine plötzlich aufgetretene akute Verschlechterung der respiratorischen Situation gekennzeichnet sind [61].

Bei nahezu allen Patienten, die an einer SSc-assoziierten ILD leiden, können ANAs im Serum nachgewiesen werden. Teilweise können auch andere mit der SSc assoziierten Antikörper nachgewiesen werden, wie z.B. Anti-Scl 70 oder Anti-Th/To. Im Gegensatz dazu schließt ein Autoantikörpernachweis eine IPF in der Regel aus.

Sowohl bei der SSc-assoziierten ILD als auch bei der IPF wird das gleichzeitige Auftreten einer PAH beschrieben; bei beiden stehen chronische Mikroaspirationen eines gastroösophagealen Refluxes als auslösende bzw. die Krankheit aufrechterhaltende Noxe im Interessenfokus [72]. Bei der SSc-assoziierten ILD korreliert die Schwere des gastroösophagealen Reflux mit der Reduktion der Diffusionskapazität der Lunge sowie dem Ausmaß der radiologischen Fibrosezeichen [22]. Bei der IPF wird beschrieben, dass sich das Verwenden eines Protonenpumpeninhibitors positiv auf das Überleben und die radiologisch nachweisbaren Veränderungen auswirkt [73].

Bei beiden Entitäten sind ein Teil der Patienten von einer PAH betroffen. Bei der SSc wird dieser Anteil mit ca. 20% beschrieben, wohingegen bei der IPF bis zu 46% aller Patienten eine PAH entwickeln. Bei der SSc geht man davon aus, dass das Entwickeln einer PAH das Vorhandensein der Vaskulopathie widerspiegelt. Bei der IPF wertet man die PAH als sekundäre PAH auf Grund der Lungenerkrankung, allerdings wird auch diese Assoziation vermehrt in Frage gestellt [74].

Die Pathogenese sowohl der SSc-ILD als auch der IPF sind nur unzureichend verstanden. Verschiedene Prozesse initiieren und katalysieren den Fibroseprozess. Die auslösende Gewebeschädidigung und konsekutive Lungenfibrose entsteht nach

aktueller Lehrmeinung dadurch, dass bestimmte Zellen, die strukturell wichtig sind, geschädigt bzw. verletzt werden. Bei der SSc-ILD bezieht sich diese Schädigung vermutlich auf das Endothel, wohingegen bei der IPF die initiale Schädigung im Bereich des Alveolarepithels vermutet wird [22, 75]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Vorhandensein von inflammatorischen Prozessen: Bei der SSc wird angenommen, dass dem Fibroseprozess eine Entzündungsreaktion vorausgeht, wohingegen bei der IPF die Fibrosebildung nicht durch einen entzündliche Prozess getriggert wird, sondern vielmehr inflammatorische Stimuli für eine Aufrechterhaltung sorgen. Beiden gemein ist letztlich die Endstrecke des Fibrosemechanismus, der durch eine Fibroblastenaktivierung und das Akkumulieren von aktivierten Myofibroblasten mit konsekutiver überschießender Matrixproduktion gekennzeichnet ist [72]. Initial besteht bei beiden Entitäten eine Form der Epithel- oder Endothelverletzung, die zu verschiedenen Formen des Zelltodes führt und damit die profibrotische Kaskade triggert. Unklar ist jedoch, welches Ereignis die Endothel- bzw. Epithelverletzung auslöst. Hierfür werden aktuell sowohl endogene als auch exogene Auslöser diskutiert. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems, welches die Fibrosebildung über die Bildung inflammatorischer und profibrotischer Zytokine initiiert und katalysiert. Bei der SSc stehen Immunzellen schon seit langem im Fokus der Forschung. Für die IPF hingegen sind bisher keine Zusammenhänge mit einer immunologischen Dysregulation bekannt. Allerdings zeigen Tiermodelle, dass eine Immundysregulation im Bereich der regulatorischen T-Zellen zu einem Aufrechterhalten profibrotischer Prozesse führt [76]. Bei der SSc zeigt sich eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden TH17- und TH22-Zellen, welche beide mit autoimmunen Erkrankungen assoziiert sind [77]. Bei der IPF können diese nicht festgestellt werden. Allerdings können bei der IPF erhöhte IL-17-Spiegel nachgewiesen werden, welches profibrotische Prozesse auslöst bzw. unterstützt und im Tiermodell eine Lungenfibrose initiieren kann [72].

Sowohl bei der IPF als auch bei der SSc-ILD werden im Blut und in der Lunge aktivierte Makrophagen und Monozyten beschrieben [72].

Auch der positive Effekt von Cyclophosphamid und MMF (welche beide immunsuppressiv bzw. lymphozytenmodulierend wirken) auf die SSc-ILD impliziert eine Rolle des adaptiven Immunsystems [34]. Bei der IPF wird eine immunsuppressive Therapie hingegen aktuell nicht mehr empfohlen [61]. Vielmehr zeigt sich bei der IPF in einigen großen Studien sogar ein verschlechtertes Outcome durch den Einsatz von Azathioprin und Kortikosteroiden (siehe Kap. 1.3.2). Diese Ergebnisse lassen den Gedanken aufkommen, dass die SSc-ILD mehr als die IPF auf Grund eines autoimmunen Prozesses entsteht und sich in diesem Aspekt von der IPF unterscheidet

[78]. Bei der IPF hingegen zeigen neueste Studien eine Wirksamkeit von Pirfenidon, das antioxidativ, antifibrotisch und antiphlogistisch wirkt, sowie von Nintedanib, einem Tyrosinkinaseinhintor, der antiproliferativ und antiangiogenetisch wirkt (siehe dazu Kap. 1.3.2). Da diese Substanzen bis dato noch nicht bei der SSc-ILD getestet worden sind, bleibt abzuwarten, ob sie auch nicht hier zu einem klinischen Vorteil führen würden.
Zusammenfassend kann man sagen, dass die SSc-assoziierte ILD und die IPF zwei verschiedene Entitäten parenchymatöser Lungenerkrankungen sind, die jedoch viele Überlappungen bzw. Gemeinsamkeiten haben. Bei der SSc-ILD scheint insbesondere eine Immundysregulation im Vordergrund zu stehen, die konsekutiv zu einer Fibrosebildung führt, wohingegen bei der IPF weniger einer entzündliche Reaktion, als vielmehr die gesteigerte profibrotische Aktivität Ursache der Parenchymveränderung ist. Beide münden jedoch in eine profibrotische Spirale, die zu einer progredienten Lungenfibrose führt.

1.4 Adipokine und ihre Rolle bei verschiedenen Erkrankungen

Fettgewebe wurde lange Zeit nur als Energielieferant für den Körper betrachtet. Mit dem Fortschreiten der Wissenschaft ist jedoch mehr und mehr deutlich geworden, dass das Fettgewebe über die Synthese von Botenstoffen eine endokrinologische Funktion ausübt. Die vom Fettgewebe sezernierten sogenannten Adipokine sind bioaktive, hormonähnliche Substanzen, die sowohl metabolisch als auch immunologisch modulierend wirken können. Dem besonderen Interesse der Forschung gilt es dabei, einen Zusammenhang herzustellen zwischen Adipositas, Adipokinen und Erkankungen, die mit einem Zustand chronischer basaler Entzündung einhergehen. Hierzu gehören Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen. Durch die aktuellen Forschungsarbeiten konnte den Adipokinen auch eine Rolle in anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. den rheumatischen Erkrankungen zugeschrieben werden.
Zu der kontinuierlich größer werdenden Liste von Adipokinen gehören unter anderem Leptin, Apelin, Adipsin, Omentin, Adiponektin, Visfatin und Resistin.

1.4.1 Adiponektin

Adiponektin ist ein Protein, das zu den Adipokinen gehört und in verschiedenen Isoformen existiert. Es entfaltet seine Wirkung über Adiponektinrezeptoren, von denen verschiedene Typen bekannt sind, zurzeit sind AdipoR1 und AdipoR2 gesichert. Je nach Isoform und Rezeptortyp kann Adiponektin verschiedene Wirkungen in metabolischen und immunologischen Prozessen haben, die mitunter paradox sein können. Interessanterweise ist Adiponektin ein Protein, das über einen längeren Zeitraum in z.T. hoher Konzentration im menschlichen Körper nachgewiesen werden kann und somit sich die Frage stellt, ob es für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus von Bedeutung ist [79]. Als initial mit dem Fettgewebe assoziiertes Hormon fokussierte sich die Forschung zunächst auf die Rolle in metabolischen Prozessen. So konnte nachgewiesen werden, dass Adiponektin negativ mit dem BMI und der Körperfettmasse korreliert, also bei schlanken Personen in höherer Konzentration produziert wird als bei Adipösen. Der Adiponektinspiegel ist bei dem Vorhandensein eines Diabetes mellitus Typ 2 reduziert [80]. Dieser scheinbar protektive Effekt von Adiponektin wird bei einer Reihe von Erkrankungen beschrieben, insbesonderen in solchen, in denen vaskuläre Prozesse eine Rolle spielen. So korreliert ein erhöhter Adiponektinserumspiegel mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit, eine KHK zu entwickeln [81]. Adiponektin vermindert das Zellwachstum und verhindert sowohl die Monozytenadhäsion als auch die Sekretion von Adhäsionsmolekülen. Im Bereich des Metabolismus sorgt Adiponektin für eine verbesserte Insulinsensitivität und erhöht die Oxidation von Fettsäuren, woraus eine Reduktion von zirkulierenden Triglyceriden und ein niedrigeres Level intrazellulärer Fette resultiert. Inflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF-α mindern wiederum die Adiponektinsekretion. Adiponektin wird deshalb eine vasoprotektive und antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben [82, 83]. Ein erhöhter Adiponektinspiegel lässt sich bei Gesunden beim Fasten, bei Anorexia Nervosa sowie bei entzündlich und/oder autoimmunen Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 1 oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen [80]. Im Tiermodell zeigen Adiponektin-defiziente Mäuse eine Intimaproliferation mechanisch verletzter Gefäße sowie eine Insulinresistenz [84]. Im Gegensatz zu seiner Rolle in metabolischen und kardiovaskulären Krankheiten ist die Rolle von Adiponektin in rheumatischen Krankheiten bisher noch nicht hinreichend erforscht. In einer Studie zur rheumatoiden Arthritis (RA) zeigte sich, dass der Adiponektinspiegel in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu Arthrose und gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist [85]. Adiponektin wird hier insbesondere im sogenannten „Lining Layer“ und perivaskulär exprimiert.

Synoviale Fibroblasten reagieren nach Adiponektinstimulation mit Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und mit proangiogenetischen Faktoren wie VEGF. Außerdem induziert es auch eine gesteigerte Synthese von matrixdegradierenden Matrixmetalloproteinasen. Allerdings ist diese Reaktion nicht auf synoviale Fibroblasten begrenzt, da auch Endothelzellen, Chondrozyten und Lymphozyten diese Zytokine nach Adiponektinstimulation sezernieren. Der Adiponektinserumspiegel korreliert mit der Schwere der Erkrankung sowie dem Grad der radiologischen Gelenkzerstörung [86]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Adiponektin bei der RA lokal destruktive und proinflammatorische Eigenschaften zeigt. Dies ließ sich im Tiermodell jedoch nicht bestätigen, da sich hier bei der murinen Kollagen-induzierten Arthritis eine Besserung durch intraartikuläre Adiponektininjektion zeigte [87]. Beim systemischen Lupus Erythematodes (SLE), der wie die systemische Sklerose auch zu den Kollagenosen gehört und mit einer entzündlichen Veränderung innerer Organe sowie Hautveränderungen einhergeht, zeigt sich bei Patienten mit vorhandener Glomerulonephritis ein erhöhter Adiponektin-Plasmaspiegel [88]. Beim Sjögren-Syndrom, das auch zu den Kollagenosen gehört und durch Xeropthalmie und Xerostomie gekennzeichnet ist, lassen sich erhöhte Adiponektin-Serumspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen. Auch die glandulären Epithelzellen der betroffenen Drüsen zeigen eine erhöhte Adiponektinsekretion [80]. Bei der systemischen Sklerose zeigen sich in einer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen der Serumadiponektinspiegel bei Gesunden und Erkrankten. Jedoch lässt sich eine negative Korrelation von Adiponektinspiegel und Hautdicke nachweisen [89]. Auch bei anderen fibrotischen Erkrankungen wird Adiponektin eine Rolle zugeschrieben: Im Ratten-Tiermodell zur Leberfibrose kehrt Adiponektin die Aktivierung der für die Pathogenese wichtigen Sternzellen um [90]. Auch bei der Angiotensin (AT) – II induzierten kardialen Fibrose übt Adiponektin über die Hemmung des TGF-β-Signalweges protektive Effekte aus. Bei der pulmonalen Hypertonie, die neben der interstitiellen Lungenerkrankung auch im Rahmen einer Lungenbeteiligung bei der systemischen Sklerose auftreten kann, scheint Adiponektin ebenfalls eine Rolle in der vaskulären Homöostase und Entzündung zu spielen. Dabei sorgt Adiponektin für eine Hochregulierung von Prostacyclin sowie eine Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen. Im Tiermodell zeigen adiponektindefiziente Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität für das Auftreten einer pulmonalen Hypertonie [91]. Darüber hinaus wird hierbei auch das Auftreten perivaskulärer Entzündungszellinfiltrate beobachtet.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Adiponektin ein ambivalentes Adipokin ist, das insbesondere lokal unterschiedliche Effekte ausüben kann. Dabei kann es sowohl

proinflammatorisch wirken, aber auch protektive Effekte ausüben – insbesondere im Frühstadium mikrovaskulärer und arteriosklerotischer Veränderungen sowie bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen.

1.4.2 Resistin

Resistin ist ein cysteinreiches Protein, das wie Adiponektin zu den Adipokinen gehört. In Nagern – bei denen es entdeckt wurde – wird es von Adipozyten sezerniert, wohingegen es bei Primaten, Schweinen und Hunden auch von Immun- und Epithelzellen exprimiert wird, die sich sowohl im Fettgewebe als auch außerhalb dessen befinden können. Bei Menschen wird Resistin nur wenig im Fettgewebe sezerniert, sondern vor allem im Knochenmark, aber auch in der Plazenta, im Pankreas, in der Synovia und von Blutzellen [92]. Bei Mäusen sorgt es nach Injektion für eine Insulinresistenz und bekam daher den Namen Resistin. Wie auch Adiponektin spielt es bei metabolischen und immunologischen Prozessen eine Rolle. Aufgrund seiner Entdeckung im Zusammenhang mit der auftretenden Insulinresistenz bei Mäusen wurde Resistin zunächst als hormonelles Bindeglied zwischen Adipositas und dem Auftreten von Diabetes Mellitus Typ 2 postuliert. Im Stoffwechsel wirkt Resistin als Antagonist von Insulin und sorgt somit für eine erhöhte Blutglukosekonzentration. In weiteren Studien wird ein Zusammenhang von Adipositas bei Mäusen und dem Resistinspiegel beschrieben. Auch sorgt die Verabreichung von Resistin-Antikörpern für eine Verbesserung der Blutzuckerwerte im Tiermodell [93]. Neben seinen Effekten in der Glukosehomöostase sorgt Resistin auch für eine erhöhte Ansammlung von Cholesterol und Triglyceriden und begünstigt im Rahmen der Arteriosklerose die Bildung von sogenannten Schaumzellen [94]. In weiteren Studien zeigte sich, dass Resistin auch proinflammatorische Effekte im ganzen Organismus aufweist. So steigert es die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNFα, IL-6 und IL-12 in Makrophagen, aber auch im weißen Fettgewebe. Auch wird Resistin selbst in einem positiven Rückkopplungsmechanismus durch verschiedene proinflammatorische Zytokine induziert. Bei der Monozyten-Makrophagendifferenzierung ist Resistin hochreguliert [95, 96]. Darüber hinaus scheint Resistin auch eine Rolle bei der Endothelzellaktivierung im Rahmen inflammatorischer Prozesse zu spielen, da es zur Expression von Endothelin-1 sowie verschiedener Adhäsionsmoleküle führt [97]. Dadurch können vaskuläre Dysfunktionen enstehen, durch die die Assoziation mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen erklärt werden kann. Neben seiner Rolle bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Resistin auch in eine Vielzahl anderer Erkrankungen involviert ist. Über sein

proinflammatorisches und endothelzellaktivierendes Potenzial ist es auch in die Pathogenese der Arteriosklerose eingebunden. Resistinserumspiegel korrelieren dabei sowohl mit anderen Entzündungsmarkern als auch mit dem Grad der koronaren Gefäßverkalkung [98]. Im Rahmen verschiedener Studien zur Adipokinrolle in malignen Erkrankungen konnte beobachtet werden, dass Resistin sowohl bei Brustkrebspatientinnen als auch bei Lymphompatienten signifikant erhöht ist [99, 100]. In Untersuchungen zur Rolle von Adipokinen in Autoimmunkrankheiten konnte das proinflammatorische Potenzial von Resistin bestätigt werden. So ist es in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA erhöht [101], außerdem konnte im Tiermodell durch eine intraartikuläre Resistininjektion in vormals gesunde Gelenke eine RA-ähnliche Arthritis in Mäusen erzeugt werden [96]. In Synoviauntersuchungen bei RA-Patienten wird eine Kolokalisation von Resistin mit Makrophagen, B-Lymphozyten und Plasmazellen beschrieben [102]. Auch bei weiteren Autoimmunkrankheiten aus dem rheumatischen Formenkreis wie SLE und dem Sjögren Syndrom kann eine erhöhte Resistinserumkonzentration nachgewiesen werden [103, 104]. Ebenso wird es bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, die auch eine autoimmune Komponente aufweisen, gesteigert gebildet [105]. Auch konnte bei Patienten mit Morbus Basedow eine Korrelation der Schwere der endokrinen Orbitopathie mit dem Resistinserumspiegel hergestellt werden [106]. Zur Rolle von Resistin bei der systemischen Sklerose sind bisher nicht viele Studien durchgeführt worden. Masui et al. konnten beobachten, dass Resistinserumspiegel bei SSc-Patienten zum einen eine inverse Korrelation mit der GFR zeigen und zum anderen mit dem Vorhandensein einer pulmonalen Hypertonie korrelieren [107]. Zusammenfassend kann Resistin eine Rolle sowohl bei Adipositas-assoziierten metabolischen Erkrankungen als auch bei inflammatorischen Prozessen zugeschrieben werden.

1.4.3 Visfatin

Visfatin gehört ebenfalls zu den Adipokinen und ist ein Protein, das auch unter dem Namen PBEF bekannt ist. PBEF steht für *pre-B cell colony enhancing factor* und beschleunigt die Differenzierung von B-Vorläuferzellen [108]. Visfatin/PBEF wird zudem als Nampt (*Nicotinamid phosphoribosyl transferase*) bezeichnet, ein Enzym im NAD^+ Signalweg, das wichtige Funktionen im Zellmetabolismus ausübt. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung Visfatin für Visfatin/PBEF/Nampt verwendet. Der Name Visfatin entstand durch seine Detektion im viszeralen Fettgewebe [109]. Analog zu den bereits beschriebenen Adipokinen hat auch Visfatin regulatorische Effekte sowohl im Energiemetabolismus als auch in der Immunoregulation. Jedoch wird es, wie auch viele andere Adipokine, nicht exklusiv im Fettgewebe gebildet, sondern scheint in vielen Geweben und Zellarten vorhanden zu sein, beim Menschen unter anderem in Gehirn, Niere, Skelettmuskel, Leber, Herz sowie in verschiedenen Immunzellen [110, 111]. Dabei kann es sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen werden. Phylogenetisch scheint das Visfatin-Gen ein wichtiges Element zu sein, da es bei verschiedensten Lebewesen vorhanden ist. Darüber hinaus zeigte sich, dass ein homozygotes Knockout-Modell nicht mit dem Leben vereinbar ist und zu einem frühen Absterben der betroffenen Embryonen führt [109]. Visfatin bindet an den Insulinrezeptor und hat insulinmimetische Effekte: Es sorgt für ein Abfallen der Blutglucosekonzentration sowie für eine Verminderung der hepatischen Glukoneogenese [112]. Im Rahmen einer kompetitiven Inhibition konkurrieren Visfatin und Insulin jedoch nicht um den Insulinrezeptor. Die Rolle von Visfatin beim Diabetes mellitus ist noch nicht hinreichend erforscht. So gibt es verschiedene Studien, die teilweise widersprüchliche Ergebnisse liefern. Viele, jedoch nicht alle Studien, beschreiben einen erhöhten Visfatinserumspiegel bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 2 [113]. Neben seinem Einfluss auf metabolische Prozesse hat Visfatin auch immunregulierendes Potenzial. Es hat die Fähigkeit, humane Leukozyten zu aktivieren und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1ß, IL-6 und TNFα zu steigern. Außerdem sorgt es auch für eine gesteigerte Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen auf Leukozyten wie CD40, CD54 und CD80 [114]. Weiterhin schützt es neutrophile Granulozyten, aber auch Fibroblasten, vor der Apoptose (programmierter Zelltod), und hält damit entzündliche Prozesse wie z.B. in der Sepsis aufrecht [115]. Auch konnten erhöhte Visfatinserum- und BAL-Spiegel im Tiermodell und bei Patienten mit akutem Lungenversagen beobachtet werden [116]. Zudem wirkt es auch im Amnionepithel antiapoptotisch, hat in diesem Kontext aber einen protektiven Effekt [117]. Darüber hinaus scheint Visfatin auch matrixabbauendes

Potenzial zu haben: In Studien zur Arteriosklerose zeigte sich, dass einerseits Visfatin in arteriosklerotischen Plaques nachweisbar ist und MMPs in Endothelzellen induziert, die wiederum für eine Plaqueinstabilität und damit für das Voranschreiten der Arteriosklerose verantwortlich sind. Auch bei anderen arteriosklerotisch bedingten Krankheiten wie der KHK konnte in den betroffenen Gefäßabschnitten Visfatin nachgewiesen werden. Visfatin wird in den betroffenen Gefäßen im Bereich instabiler Plaques und assoziiert mit lipidhaltigen Makrophagen exprimiert [118]. Bei der RA zeigt sich ebenfalls eine lokale Visfatinexpression in der Synovialflüssigkeit und im Synovialgewebe selbst. Dabei wird Visfatin vorallem im „lining layer“, in Lymphozytenaggregaten und innerhalb von interstitiellen Gefäßen nachgewiesen [119]. Auch bei weiteren entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa zeigt sich ein erhöhter Visfatinspiegel [114]. In einer Studie zur Rolle von Visfatin bei der systemischen Sklerose konnte zunächst kein Unterschied im Visfatinserumspiegel zwischen dSSc, lSSc und gesunden Kontrollen dargestellt werden. Allerdings weisen Patienten mit ausgeprägter dSSc und langer Krankheitsdauer höhere Visfatinspiegel als die anderen Gruppen auf. Zudem konnte in vitro ein zuvor induzierter profibrotischer Phänotyp in SSc-Hautfibroblasten durch Visfatin umgekehrt werden [120]. Zusammenfassend ist Visfatin ein Adipokin, das proinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften hat, dessen Rolle in verschiedenen entzündlichen und metabolischen Erkrankungen jedoch noch festgelegt werden muss.

1.5 Fragestellung und Ziele

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die organspezifische Expression verschiedener Immunzellen in Magen- und Lungengeweben von SSc-Patienten mit der Adipokinexpression in den Geweben zu vergleichen.

Der erste Teil der Arbeit analysierte hierbei die Präsenz und Dichte an CD4-, CD8- und CD68-positiven Immunzellen in der Magenwand von Patienten mit systemischer Sklerose mit gastrointestinaler Beteiligung. Als Vergleichsgruppe diente ein Patientenkollektiv, welches an einer Gastritis litt, jedoch nicht an einer SSc bzw. einer anderen Erkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis. Da die oben genannten Immunzellen in die Pathogenese der SSc mitinvolviert sind, sollte daneben der Vergleich mit anderen entzündlichen Erkrankungen spezifische Muster dieser Zellen bei der SSc untersuchen und die anatomischen Kompartimente der individuellen Zellinfiltrationen herausarbeiten.

Der zweite Teil der Arbeit hatte die organspezifische Expression der Adipokine Adiponektin, Visfatin und Resistin als zentralen Fokus. Zunächst sollte anhand des gleichen Patientenkollektivs die Verteilung der Adipokinexpression in der Magenwand erfolgen. In Anbetracht dessen, dass Adipokine bei verschiedenen anderen Erkrankungen sowohl proinflammatorische als auch immunmodulierende Eigenschaften zugeschrieben werden, war auch hier von Interesse, ob sich ein Unterschied zwischen dem SSc- und dem Gastritiskollektiv zeigen würde und diese Adipokinexpression mit der Präsenz bestimmter Immunzellen assoziiert ist.

Der dritte Teil der Arbeit untersuchte den Vergleich der Adipokinexpression im Lungengewebe zwischen SSc-, IPF- und gesundem Kontrollkollektiv. Hier war die Hauptfragestellung, ob sich unterschiedliche Adipokinexpressionen in den fibrotischen Geweben von SSc und IPF im Vergleich mit dem gesunden Kontrollkollektiv zeigen würden. Analog zu der Adipokinexpression im Magengewebe war auch hier von Interesse, ob eine Zuordnung zu einzelnen anatomischen Kompartimenten darstellbar wäre. Übergreifend sollte die Kompartment-spezifische Untersuchung der Adipokine im gastrointestinalen Gewebe sowie in der Lunge von Patienten mit SSc im Vergleich zu Kontrollkollektiven zeigen, ob SSc-spezifische Expressionsmuster der Adipokine identifiziert werden können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Stoffbezeichnung	Bezugsquelle
Aquatex®	Merck, Damstadt
Kryoröhrchen, 2ml	Greiner Bio, Limburg
Cytospinfilter	Thermo, Dreieich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN Biotech, Aidenbach
Dulbecco´s PBS (*phosphate buffered saline*)	PAA Laboratories, Cölbe
Entellan	VWR, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Flüssiger Stickstoff	MMS, Frankfurt
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H2O2)	Air Liquide, Böhlen
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HEPES Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	Omira, Ravensburg
OCT Tissue-Tek	Sakura Finetek Germany, Heppenheim
Peroxidase-Substrate-Kit AEC	Axxora Deutschland, Lörrach
Reaktionsgefäße	Greiner Bio, Limburg
Super Frost Plus Objektträger®	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin	PAA Laboratories, Cölbe

Xylol	Roth, Karlsruhe

Weitere allgemein im Labor verwendete Chemikalien und Materialien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe, oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen.

2.1.2 Gewebematerial

Die histologischen Magenproben wurden an dem Universitätsklinikum Gießen, dem Universitätsklinikum Regensburg sowie an der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim entnommen. Insgesamt wurden die Proben von 9 SSc-Patienten und 11 bzw. 12 Kontrollpatienten verwendet. In der Kontrollgruppe waren 11 Proben für die Adipokinfärbungen und 12 Proben für die Immunzellfärbungen verfügbar. Alle Proben stammten aus den Jahren 2007 bis 2009. Ein entsprechendes Ethikvotum der Universitäten Gießen und Regensburg lag vor. Alle Patienten hatten ihre schriftliche Einwilligung in die Verwendung ihrer Gewebeproben gegeben. In beiden Kollektiven bestand eine gastrointestinale Symptomatik, auf Grund derer die Patienten einer diagnostischen Gastroskopie zugeführt wurden. Bei der SSc-Gruppe wurde auf Grund der geringen Patientenzahl nicht zwischen diffuser und limitierter Form unterschieden, sondern beide Entitäten gleichermaßen eingeschlossen. In die Kontrollgruppe wurden Patienten eingeschlossen, die an einer Gastritis litten, die nicht im Rahmen einer Kollagenose aufgetreten war. In der durchgeführten Gastroskopie wurden den Patienten Proben aus dem Magenantrum und -corpus entnommen, so dass pro Patient in der Regel zwei verschiedene Proben aus zwei verschiedenen anatomischen Bereichen vorlagen. Die Tiefe der Probenentnahme beschränkte sich auf die Mukosa und ggf. Submukosa; tiefere Bereiche waren einer Zangenbiopsie auf Grund der Perforationsgefahr nicht zugänglich. Nach der Entnahme wurden die Gewebeproben in OCT TissueTek Einfriermedium eingebettet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Lungenproben wurden an dem Universitätsklinikum Gießen entnommen. Insgesamt wurden Gewebe von 8 IPF- (Idiopathische Pulmonale Fibrose), 2 SSc- und 8 bzw. 7 Donorpatienten zur Verfügung gestellt. Für die Adiponektinfärbungen lagen acht Donorgewebe vor, für die Resistin- und Visfatinfärbungen lagen sieben Donorgewebe vor. Die Donorgewebe stammten von lungengesunden Patienten, deren Lungen für Transplantationen vorgesehen waren. Die SSc-Gewebe stammten von Patienten im Rahmen einer Lungentransplantation. Das Gewebe der IPF-Patienten stammte aus Lungenbiopsien, die zur Diagnosesicherung durchgeführt wurden. Alle Lungenproben wurden nach der Entnahme in Paraffin eingebettet.

2.1.3 Antikörper

Zur Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen wurden 7 verschiedene Primärantikörper und 2 verschiedene Sekundärantikörper eingesetzt (siehe Tab. 3 und 4). Für die Isotypkontrollen wurden – je nach Spezifität – IgG-Ziege, IgG-Kaninchen oder IgG-Maus eingesetzt.

Tabelle 3: Für die Immunhistochemie verwendete Primärantikörper

Spezifität	*Antikörper*	*Verdünnung*	*Bezugsquelle*
CD4	Human Anti-Maus	1:100	Dako Deutschland, Hamburg
CD8	Human Anti-Maus	1:100	Dako Deutschland, Hamburg
CD68	Human Anti-Maus	1:50	Dako Deutschland, Hamburg
Adiponektin	Human Anti-Ziege	1:100	R&D, Wiesbaden
Visfatin	Human Anti-Kaninchen	1:50	Bethyl, Montgomery/USA
Resistin	Human Anti-Maus	1:100	R&D, Wiesbaden
SPC	Human Anti-Kaninchen	1:100	Chemicon, Hofheim

Tabelle 4: Für die Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörpersysteme

Bezeichnung	*Spezifität*	*Hersteller*
Histofine Simple Stain MAX PO (G)	Anti-Ziege	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
Histofine Simple Stain MAX PO (Multi)	Anti-Maus und Anti-Kaninchen	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan

2.1.4 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
Mikroskopsystem Leica DM RBE Bildaufnahmegerät: Leica DC 200 Software: IM 1000	Leica, Wetzlar
Mikrotom CM 3050	Leica, Wetzlar
Leitz 1516 Rotationsmikrotom	Leica Microsystems, Nussloch
Fujitsu Lifebook AH 531	Fujitsu, Japan
Photoscape	Softonic, Barcelona, Spain
MiraxViewer	Carl Zeiss Jena

2.2 Histologische Methoden

Die nachfolgend aufgeführten histologischen Methoden beschreiben etablierte Vorgehensweisen, die dieser Arbeit vorausgingen. Die Routinefärbungen wurden freundlicherweise von Dr. Marvin Peters und Sabrina Brückmann durchgeführt. Die Etablierung der verschiedenen Scores, die Kompartmentanalyse, Korrelationen und die anschließende Auswertung des histologischen Materials wurden von der Promovendin vorgenommen.

2.2.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die in OCT Gefriermedium eingebetteten Magengewebeproben wurden mit einem Gefriermikrotom geschnitten. Dabei wurden die Proben auf eine Temperatur von -15 bis -20°C gekühlt, um dann 5 µm dicke Gewebeschnitte anzufertigen, die anschließend auf Objektträger aufgebracht wurden. Danach erfolgte nach einer kurzen Antrocknung bei Raumtemperatur die Fixierung des Gewebeschnittes in Azeton für zehn Minuten. Nach Abdampfen des Acetons konnten die Schnitte entweder sofort im Rahmen einer Hämatoxylin-Eosin (HE)- bzw. immunhistochemischen Färbung weiterverwendet werden oder es erfolgte eine weitere Lagerung bei -20°C.

2.2.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Lungenproben wurden nach der Entnahme schnellstmöglich aufgearbeitet. Zunächst erfolgte eine schrittweise Dehydrierung des Gewebes durch eine aufsteigende Ethanolreihe. Anschließend wurde das Gewebe in einer entsprechenden Gießform mit Paraffin übergossen, die Aushärtung erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurden die Paraffinblöcke für 10 Minuten bei -20°C gekühlt und dann an einem Rotationsmikrotom 5 µm dicke Gewebeschnitte erstellt. Zum Strecken wurden die Paraffinschnitte in ein 40°C warmes Wasserbad überführt und anschließend auf Objektträger gezogen.

2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Gefrierschnitte der Magenproben wurden zur besseren histologischen Beurteilung mit HE gefärbt. Dies geschah entweder direkt nach Herstellung der in Aceton fixierten Gewebeschnitte oder nach ca. 20-minütigem Auftauen der bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte. Zunächst erfolgte eine zehnminütige Inkubation in 0,1%iger Hämatoxylin-Lösung, die zu einer blauen Anfärbung der basophilen Bestandteile der Zellen, zu welchen die Zellkerne gehören, führt. Dann wurde der Schnitt in Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation in 0,1%iger Eosinlösung, die azidophile Gewebebestandteile, insbesondere die Plasmaproteine, rötlich anfärbt. Nach erneuter Spülung in Wasser zum Abwaschen des überschüssigen Farbstoffs wurde eine aufsteigende Ethanolreihe zur Entwässerung der Proben durchgeführt. Es erfolgte dabei nacheinander jeweils eine ca. 5-minütige Inkubation in 50%-, 70%-, 96%- bzw. 100%iger Ethanollösung. Anschließend wurden die Gewebeschnitte drei Mal für fünf Minuten in Xylol geklärt, um nachfolgend in Entellan® Eindeckmedium konserviert werden zu können.

2.2.4 Immunhistochemie

Das **Prinzip der Immunhistochemie** wird eingesetzt zum Nachweis von Proteinen oder anderen Strukturen, die mit markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass bestimmte Epitope von spezifischen Antikörpern erkannt werden und eine Bindung eingehen. Über verschiedene Detektionssysteme können solche Bindungen sichtbar gemacht werden. Dabei unterscheidet man einerseits die direkte Immunhistochemie, bei der ein Enzym direkt an den Antikörper gebunden wird und über ein Substrat sichtbar gemacht wird, und andererseits die indirekte Immunhistochemie, bei der zunächst ein spezifischer Primärantikörper an das

Antigen bindet und anschließend von einem weiteren Antikörper gebunden wird, der mit einem Enzym konjugiert ist und ebenfalls durch ein Substrat sichtbar gemacht wird. Letztere existiert sowohl als Zwei- als auch als Drei-Schritt-Methode. Der Vorteil der indirekten Immunhistochemie besteht darin, dass über den zweiten Antikörper eine Signalverstärkung erreicht werden kann, welche insbesondere bei einer geringen Epitopanzahl sinnvoll ist. Für die hiesige Arbeit wurde eine Zwei-Schritt-Methode mittels Histofine® verwendet.

Für die **Immunhistochemie der Gefrierschnitte** wurden die Schnitte entweder direkt nach ihrer Herstellung verwendet oder aber bei Raumtemperatur aufgetaut. Im Anschluss erfolgte eine Wässerung für 5 Minuten in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung). Danach wurde die endogene Peroxidasektivität geblockt, indem die Schnitte 30 Minuten in 0,3% Methanol in Wasserstoffperoxid inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte wieder für 5 Minuten in PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Objektträger je nach Färbeprotokoll für eine Stunde in 5%iger Milchpulverlösung oder in 10%igem Pferdeserum inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS kam das Histofine-System zum Einsatz, welches einen Sekundärantikörper beinhaltet, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Die Gewebschnitte wurden für 30 Minuten in der Antikörperlösung belassen und dann erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Zum Sichtbarmachen der gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurde nachfolgend Chromogen (AEC) hinzugegeben, welches eine Enzymreaktion mit der Meerettichperoxidase induziert. Die Farbreaktion konnte mikroskopisch nach kurzer Zeit detektiert werden. Anschließend erfolgte eine Abstoppung der Enzym-Substrat-Reaktion durch Waschen in PBS. Schließlich wurden die Schnitte kurz in Raumluft getrocknet, um sie dann in Aquatex® Eindeckmedium konservieren zu können.

Für die **Immunhistochemie der Paraffinschnitte** mussten diese zunächst entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst drei Mal für fünf Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend wurde eine aufsteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%) durchgeführt und die Gewebe danach rehydriert. Zur Demaskierung der Epitope wurde eine enzymatische Demaskierung mit Proteinase-K durchgeführt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte erneut in PBS gewaschen. Nun wurde, analog zur Immunhistochemie der Gefrierschnitte, die endogene Peroxidaseaktivität geblockt, indem die Schnitte mittels 30-minütiger Inkubation in 0,3% Methanol in Wasserstoffperoxid inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in PBS gewaschen. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Objektträger je nach Färbeprotokoll

für eine Stunde in 5%iger Milchpulverlösung oder in 10%igem Pferdeserum inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS kam wiederum das Histofine-System zum Einsatz (siehe oben).
Falls eine Kerngegenfärbung durchgeführt wurde, erfolgte eine 5-10-minütige Inkubation mit Hämalaun und nachfolgendem Waschen in H_2O. Schließlich wurden die Objektträger kurz in Raumluft getrocknet, um sie dann in Aquatex Eindeckmedium konservieren zu können.
Als Isotypkontrollen dienten je nach verwendetem Antikörper IgG-Seren von Maus, Kaninchen oder Ziege. Außerdem wurde jeweils eine Negativkontrolle durchgeführt, in der eine Inkubation ohne Primärantikörper, sondern nur mit Sekundärantikörper durchgeführt wurde.

2.3 Auswertung

2.3.1 Auswahl der Software

Zur Auswertung der fotografierten histologischen Magenschnitte wurde das Bildbearbeitungsprogramm „PhotoScape“™ gewählt. Wichtig war eine qualitativ hochwertige Darstellung der histologischen Proben. Die Software ermöglichte eine starke Vergrößerung einzelner Bildabschnitte zur Kompartimentanalyse. Weiterhin konnten mehrere Bilder auf einer Seite kombiniert werden; auch ein solches Kombinationsbild konnte verkleinert oder vergrößert dargestellt werden. Dies ermöglichte einen besseren direkten Vergleich von Färbung und Negativkontrolle, insbesondere wenn die Färbung nicht allzu intensiv war. Darüber hinaus ermöglichte das Programm das Setzen von Feldern in einzelne Bildbereiche, deren Größe gleich und somit nachvollziehbar blieb und eine quantitative Auswertung ermöglichte. Weiterhin war es möglich, die Bilder u.a. in ihrer Helligkeit, Sättigung und Schärfe zu verändern. Dies wurde jedoch nur für die anschließende Darstellung in der Dissertation verwendet, nicht zur Auswertung der histologischen Proben. Für die Auswertung wurden die unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Dokumentationsbilder der Färbungen verwendet.
Zur Auswertung der eingescannten Lungenparaffinschnitte wurde das Programm „MiraxViewer“™ gewählt, welches extra für das vorhandene Dateiformat von Carl Zeiss Jena zur Verfügung gestellt wird und eine qualitativ sehr hochwertige Darstellung der eingescannten Gewebeschnitte ermöglichte. Der Scan erfolgte aufgrund der Größe der

Schnitte, die ansonsten nicht als Gesamtbild über das Mikroskop darstellbar gewesen wären. Die Paraffinschnitte konnten analog zur Betrachtung am Mikroskop in ihrer Vergrößerung eingestellt werden – von einer Übersichtsansicht bis hin zur 40-fachen Vergrößerung. In jeder Einstellung war es möglich, einen qualitativ hochwertigen Screenshot des Bildschirmfensters anzufertigen. Weiterhin konnten verschiedene Schnitte nebeneinander gelegt werden, um zum Beispiel die immunhistochemische Adipokinfärbung mit der Surfactant-Protein-C-Färbung zu vergleichen oder zwei verschiedene Schnitte hinsichtlich ihrer Färbeintensität zu beurteilen. Darüber hinaus konnte durch die Benutzung einer Größenleiste die tatsächliche Größe der betrachteten Objekte immer nachvollzogen und dokumentiert werden.

2.3.2 Auswertung der Magenproben

Die histologische Auswertung der Magenproben erfolgte nach Anleitung zweier histologisch erfahrener Mediziner bzw. Biologen. Zur Objektivierung der Scores wurden die Magenproben sowohl von der SSc- als auch der Kontrollgruppe verschlüsselt und anschließend randomisiert. Somit konnte die verblindete Promovendin nicht wissen, zu welcher Gruppe die jeweils untersuchte Probe gehörte. Dabei wurde das gesamte Datenkollektiv einer Versuchsreihe am Stück ausgewertet, um eine möglichst gleiche Beurteilung der einzelnen Proben zu erhalten. Die Gewebsschnitte wurden in 50-facher Vergrößerung fotografiert. Die fotografierten Proben wurden zur Auswertung weder in ihrer Farbintensität, Schärfe noch in ihrer Belichtung verändert.
Die Auswertung der Färbungen für die Zellmarker CD4, CD8 und CD68 erfolgte quantitativ. Um eine repräsentative Zellzahl pro Probe zu erfassen, wurden jeweils drei verschiedene Felder einer definierten Größe pro Probe gezählt. Da alle anatomischen Bereiche gleichermaßen erfasst werden sollten, wurde ein Feld in die Submukosa gesetzt und zwei weitere in die Mukosa, wobei eins davon in ein – wenn vorhanden – zellreiches Gebiet bzw. entzündliches Infiltrat gesetzt wurde (siehe Abb.2). Falls in dem Präparat keine Submukosa enthalten war, wurde das Feld in ein lumenfernes Gebiet gesetzt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert aus den drei ausgezählten Feldern errechnet. Die Feldgröße wurde auf 300x200 dpi festgelegt, was 200x135 µm entspricht. Bei einigen Proben konnten auf Grund ihrer Größe nur zwei statt drei Felder gesetzt werden, deren Mittelwert dann genauso in die Berechnung einging. Anschließend wurden die Proben auf das Vorhandensein von Infiltraten untersucht, um zu beurteilen, ob diese eine falsch hohe Zellzahl verursacht haben könnten.

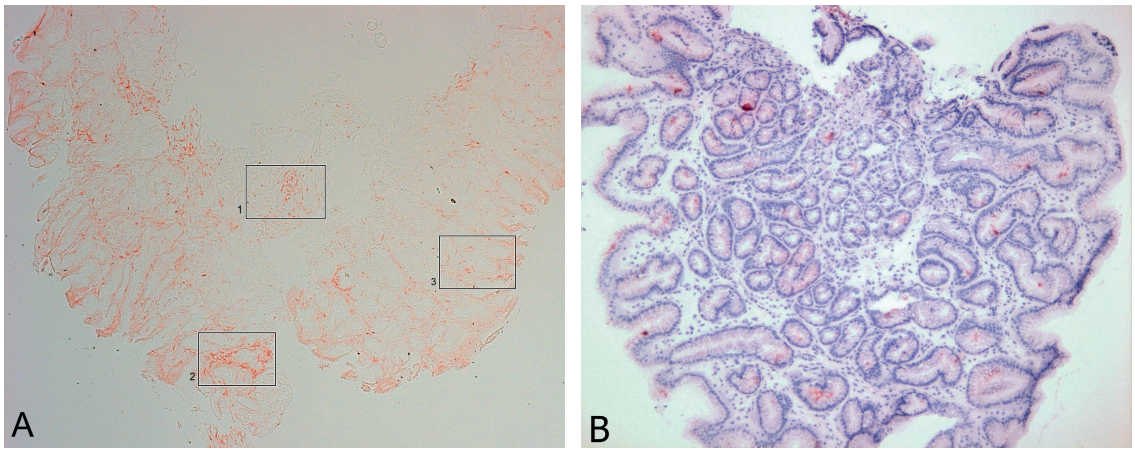


Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung der Zellzahlerfassung CD4-positiver Zellen. Links (A) ist die immunhistochemische Färbung CD4-positiver Zellen abgebildet. Zur quantitativen Auswertung wurden pro Gewebe drei Felder einer definierten Größe in bestimmte anatomische Areale gesetzt: Ein Feld in die Submukosa (Feld 1), ein Feld in ein – wenn vorhanden – zellreiches Gebiet der Mukosa (Feld 2) und ein weiteres Feld in die Mukosa (Feld 3). Zur besseren Übersicht ist die zugehörige HE-Färbung rechts dargestellt (B).

Die Auswertung der Färbungen für die Adipokine Resistin, Visfatin und Adiponektin erfolgte qualitativ. Zunächst wurde unter Miteinbeziehung der Negativkontrolle entschieden, ob eine positive Färbung und damit eine Zielantigenexpression vorlag oder nicht. Dabei wurde bei fehlender Färbung der Score „0“ vergeben, bei einer Färbung der Score „1“. Anschließend wurden die einzelnen anatomisch-morphologischen Bereiche hinsichtlich ihres Färbeverhaltens gesondert beurteilt. Hierbei wurden definierte Areale ausgewertet, das Drüsenepithel, die Lamina propria und die Basallamina. Außerdem erfolgte eine Auswertung hinsichtlich der (In-)homogenität der Färbung. Analog der generellen Beurteilung der Färbung wurde auch hier entweder der Score 0 für Nichtanfärbung und der Score 1 für Färbung gegeben. Beispielhaft ist beides in Abbildung 3 dargestellt. Da pro Patient meist zwei verschiedene Proben ausgewertet wurden und am Ende ein Score pro Patient vorhanden sein sollte, wurde ein positiver Score auch beim Vorhandensein von nur einer positiven Färbung vergeben.

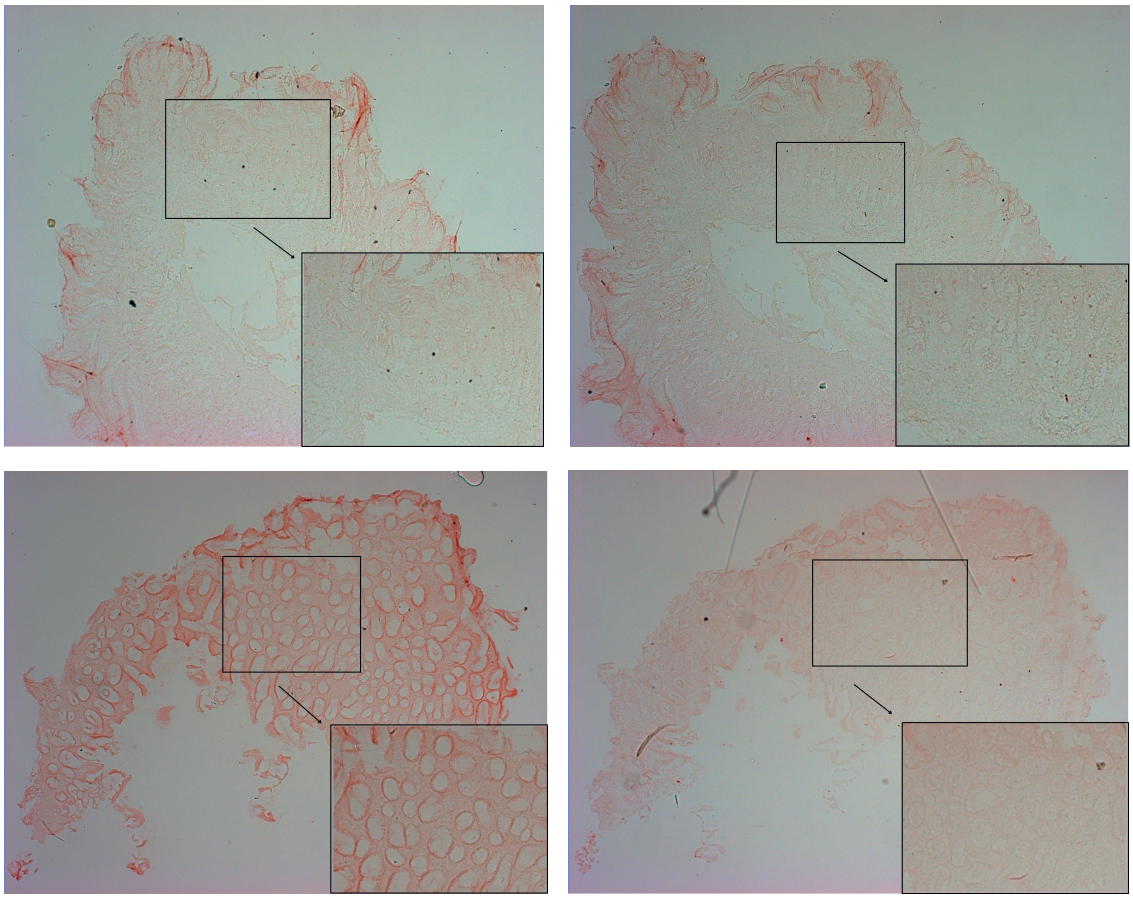


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung immunhistochemischer Resistinfärbungen. Links ist jeweils die Resistinfärbung von zwei verschiedenen Patienten abgebildet, rechts dazu die Negativkontrolle. Die obere Abbildung, bei der kein Unterschied zwischen der Resistinfärbung und der Negativkontrolle ausgemacht werden kann, dient als Beispiel für den Score 0 (keine Färbung). Das untere Gewebe, das deutlich mehr Signal aufweist als die Isotypkontrolle, erhielt den Score 1 (Färbung).

2.3.3 Auswertung der Lungenproben

Die Auswertung der Lungengewebe erfolgte unter Anleitung zweier erfahrener Biologen bzw. Mediziner. Pro Patient wurden immunhistochemische Färbungen zu Adiponektin, Resistin, Visfatin und Surfactant-Protein C vorgenommen. Zu jeder immunhistochemischen Färbung wurde zudem eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Analog zu den Magenschnitten wurden auch hier alle Proben einer immunhistochemische Färbung in Serie ausgewertet. Die verschiedenen Kollektive wurden randomisiert betrachtet. Die Auswertung des Färbeverhaltens der einzelnen Adipokine erfolgte semiquantitativ nach folgendem Schema (siehe Tabelle 6). Die Surfactantfärbung wurde nicht gesondert ausgewertet, sondern diente gemeinsam mit der Kernfärbung der besseren anatomisch-morphologischen Zuordnung.

Tabelle 6: Scoring der immunhistochemischen Lungenfärbungen

Score 0	keine Färbung
Score 1	wenige Bereiche oder einzelne Zellen gefärbt
Score 2	mittelstarke Färbung, die mindestens die Hälfte der Probe betrifft
Score 3	der Großteil der Probe ist mittel bis stark gefärbt

Dabei wurde jeweils die Adipokinfärbung gemeinsam bzw. im Vergleich mit den Schnitten verglichen, bei denen zusätzlich eine Kernfärbung erfolgte und anschließend bewertet. Zunächst erfolgte ein generelles Scoring des gesamten Präparates; anschließend wurden einzelne Bereiche gesondert ausgewertet. Dies betraf die Gefäßwände größerer Gefäße, das Bronchialepithel mit ggf. Kinozilien sowie die Alveolarsepten bzw. im Falle eines fibrotischen Umbaus das Lungenparenchym. Weiterhin wurden die Proben auf das Vorhandensein von Entzündungszellinfiltraten untersucht, die in der jeweiligen immunhistochemischen Färbung ein positives Signal zeigten. Die beurteilten anatomischen Lungenkompartimente sind beispielhaft anhand der Surfactant-Färbung in Abb. 4 dargestellt.

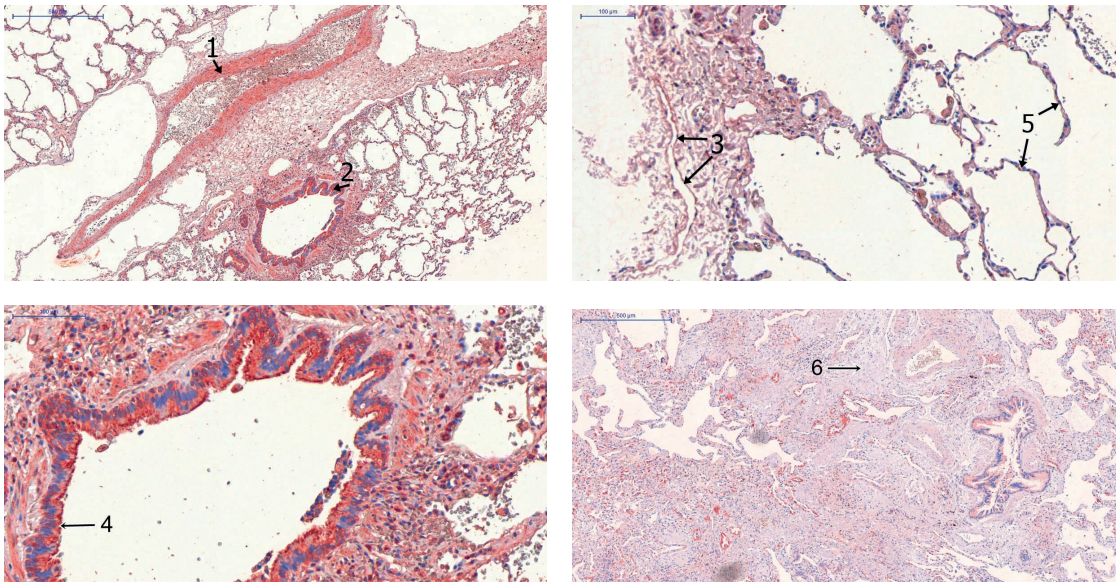


Abbildung 4: Darstellung der anatomischen Lungenkompartimente anhand der Surfactant-Färbung. In den immunhistochemischen Adipokinfärbungen wurden einzelne Bereiche hinsichtlich ihres Färbeverhaltens bewertet: Die Gefäßwand größerer (1) und kleinerer (3) Gefäße, das Bronchialepithel (2) einschließlich der Kinozilien (4), die Alveolarsepten der gesunden Lunge (5) bzw. im Falle eines fibrotischen Umbaus die fibrotischen Bereiche (6).

2.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms GraphPad Prism Version 6.0. Für jedes Datenkollektiv wurde zunächst eine deskriptive Statistik erstellt, die eine Übersicht über Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und die Verteilung verschafft. Anschließend wurde jedes Datenkollektiv hinsichtlich seiner Normalverteilung getestet. Diese war jedoch auf Grund des zum Teil kleinen Stichprobenumfangs in den meisten Fällen nicht gegeben, so dass auf verschiedene nicht-parametrische Tests zurückgegriffen werden musste. Zur statistischen Auswertung der quantitativen sowie semiquantitativen Ergebnisse (Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für CD4, CD8 und CD68 der Magenschnitte sowie der immunhistochemischen Adipokinfärbungen der Lungenschnitte) wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, für den eine Normalverteilung der Daten keine zwingende Voraussetzung ist. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Zur Auswertung der qualitativen Ergebnisse (Adipokinfärbungen der Magengewebe) wurde der Fisher's exact Test verwendet und eine Kontigenztabelle erstellt. Auch hier wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Auf eine Korrektur für multiples Testen wurde bei kleiner Stichprobengröße und überschaubarer Anzahl an Testparametern verzichtet, um ein zu konservatives Procedere zu vermeiden.
Für beide Analysen wurden jeweils mit Hilfe des Progamms graphische Darstellungen erstellt. Zur Darstellung der Zellzahlen für die Immunzellmarker CD4, CD8 und CD68 wurden Boxplot-Diagramme dargestellt, da hier eine gute Übersicht der Werte gegeben ist. Es wurden sowohl Medianwerte, Interquartilabstände als auch Ausreißer über die Fühler dargestellt, so dass die Verteilung immer nachvollziehbar blieb. Zur Darstellung der Ergebnisse der semiquantitativen Lungenprobenauswertung wurden Streudiagramme verwendet, um die Verteilung bei geringer Stichprobengröße zu illustrieren. Zur Darstellung der nominalskalierten Daten (Adipokinfärbungen) wurden Balkendiagramme verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswertung der Magenproben

In der vorliegenden Arbeit wurden Magenproben von 9 SSc-Patienten und 11 bzw. 12 Kontrollpatienten ausgewertet. In das Kollektiv der Kontrollgruppe wurden verschiedene Gastritisformen mit eingeschlossen. Beide Patientengruppen wurden auf Grund einer klinischen Symptomatik, z.B. die einer Gastritis oder einer Malabsorption, einer Gastroskopie zugeführt. Dabei wurden bei der Gastroskopie Gewebeproben aus dem Magenantrum und dem Magencorpus entnommen, so dass pro Patient in der Regel zwei Proben aus unterschiedlichen Regionen ausgewertet wurden. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Immunzellmarker CD4, CD8 und CD68 erfolgte quantitativ, indem pro Probe drei Felder ausgewertet wurden. Die immunhistochemischen Färbungen der Adipokine Resistin, Visfatin und Adiponektin erfolgte qualitativ unter Berücksichtigung der einzelnen anatomischen Kompartimente.

3.1.1 CD4-positive Zellen

CD4 ist ein Glykoprotein, das sich an der Zelloberfläche von T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen befindet. In der betroffenen Haut von Patienten mit SSc wurde die erhöhte Präsenz von $CD4^+$ T-Zellen beschrieben. In der hiesigen Arbeit war gefragt, ob sich ein Unterschied in der Anzahl CD4-positiver Zellen in der Magenwand der beiden Patientenkollektive bei vorhandener gastrointestinaler Symptomatik zeigen würde. Es erfolgte eine quantitative Auswertung von jeweils drei gleich großen Feldern pro Gewebeschnitt (siehe Kap. 2.3.2). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der SSc- und der Kontrollgruppe (siehe Tab. 7 und Abb. 5). Der Großteil aller Proben zeigte in beiden Gruppen mäßig viele, diffus verteilte CD4-positive Zellen. Diese ließen sich sowohl in der Lamina propria der Mukosa als auch – wenn in der Gewebeprobe vorhanden – in der Submukosa nachweisen (siehe Abb. 6). Der Mittelwert der ausgewerteten Felder lag bei 22,1 Zellen pro Feld in der SSc-Gruppe respektive bei 23,8 Zellen in der Kontrollgruppe (siehe Tab. 7). Auch der Vergleich zwischen Mukosa- und Submukosainfiltration zeigte sowohl innerhalb als auch zwischen den beiden Kollektiven keinen signifikanten Unterschied. Weiterhin wurden alle Proben dahingehend bewertet, ob ein Infiltrat mit CD4-positiven Zellen vorlag oder nicht, da deren quantitativer Einschluss eventuell zu falsch hohen Zellzahlen führen

könnte. Es zeigten 11% der SSc-Patienten entzündliche Infiltrate im Vergleich zu 25% der Kontrollpatienten, auch hier besteht kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 7: Anzahl CD4-positiver Zellen in der Magenwand. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der SSc- und Kontrollgruppe.

	SSc	Kontrolle	p-Wert
durchschnittliche Zellzahl (pro Feld)	22,1 (+/- 21,9)	23,8 (+/- 11,6)	p = 0,201
Zellzahl Mukosa (pro Feld)	25,0 (+/- 28,3)	26,5 (+/- 13,6)	p = 0,110
Zellzahl Submukosa (pro Feld)	19,3 (+/- 16,1)	22,7 (+/- 15,4)	p = 0,760
Vorhandensein CD4-positiver Zellinfiltrate	1/9 (11%)	3/12 (25%)	p = 0,603

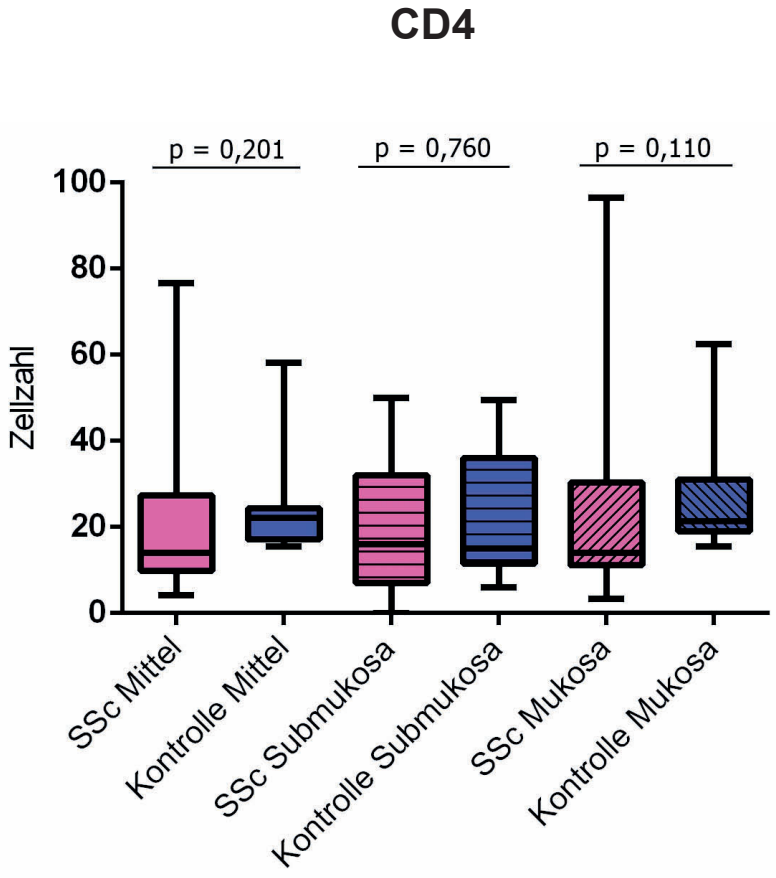


Abbildung 5: Anzahl CD4-positiver Zellen in der Magenwand. Dargestellt sind die Mediane, die Minimal- und Maximalwerte als Fühler, die Interquartilabstände als Boxen sowie das jeweilige Signifikanzniveau. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zahl der CD4-positiven Zellen zwischen SSc- und Kontrollgruppe. Beide Kollektive wiesen eine entzündliche Zellinfiltration auf, die sich sowohl in der Submukosa als auch der Mukosa fand.

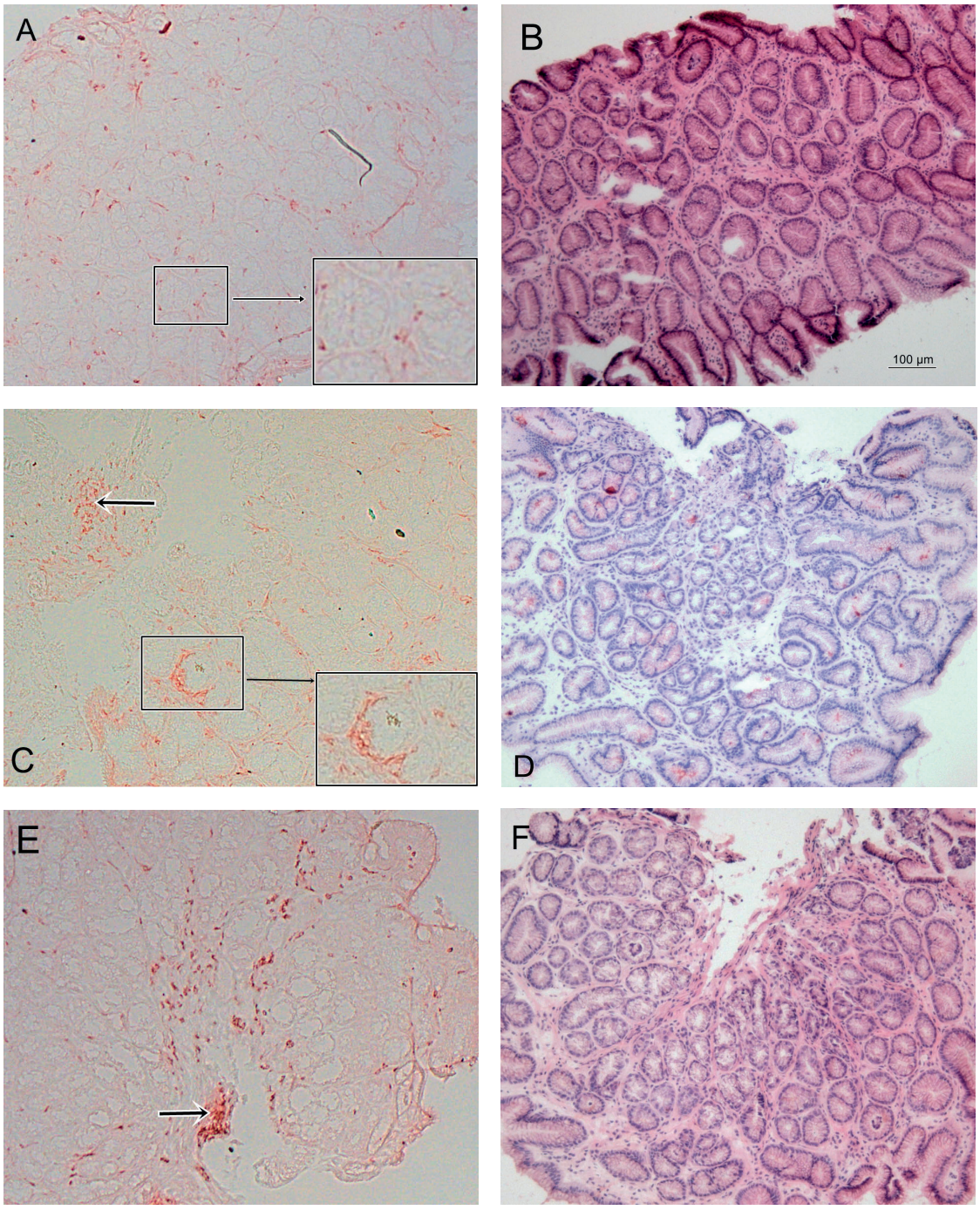


Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung der CD4-positiven Zellen in der Magenwand. Die CD4-positiven Zellen färben sich immunhistochemisch rot an (A, C und E). Sowohl die Kontrollgruppe (A, B) als auch die SSc-Gruppe (C, D) zeigte eine mäßige Ansammlung CD4-positiver Zellen in der Lamina propria und auch in der Submukosa (C, Pfeil). In beiden Kollektiven zeigten sich nur selten dichte entzündliche Infiltrate wie in einem Beispiel der Kontrollgruppe dargestellt (E, Pfeil). Zur besseren Zuordnung sind die jeweiligen HE-Schnitte derselben Gewebe dargestellt (B, D und F).

3.1.2 CD8-positive Zellen

CD8 ist ein Glykoprotein, das sich an der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Zellen befindet. In den immunhistochemischen Färbungen der Magenschnitte zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl CD8-positiver Zellen zwischen SSc- und Kontrollgruppe (siehe Tab. 8 und Abb. 7). Dabei fanden sich in beiden Gruppen insgesamt weniger CD8-positive Zellen als CD4-positive Zellen. Der Großteil der Proben zeigte einzelne CD8-positive Zellen, die sich vornehmlich in der Lamina propria der Mukosa, aber auch – wenn in der Gewebeprobe vorhanden – in der Submukosa befanden (siehe Abb.8). Dichte entzündliche Infiltrate CD8-positiver Zellen konnten in beiden Gruppen nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Anzahl CD8-positiver Zellen in der Magenwand

	SSc	Kontrolle	p-Wert
Durchschnittliche Zellzahl (pro Feld)	15,3 (+/- 6,7)	15,3 (+/- 13,8)	p = 0,644
Zellzahl Mukosa (pro Feld)	16,0 (+/- 5,8)	17,7 (+/- 13,9)	p = 0,594
Zellzahl Submukosa (pro Feld)	20,5 (+/- 11,1)	11,0 (+/- 10,6)	p = 0,060

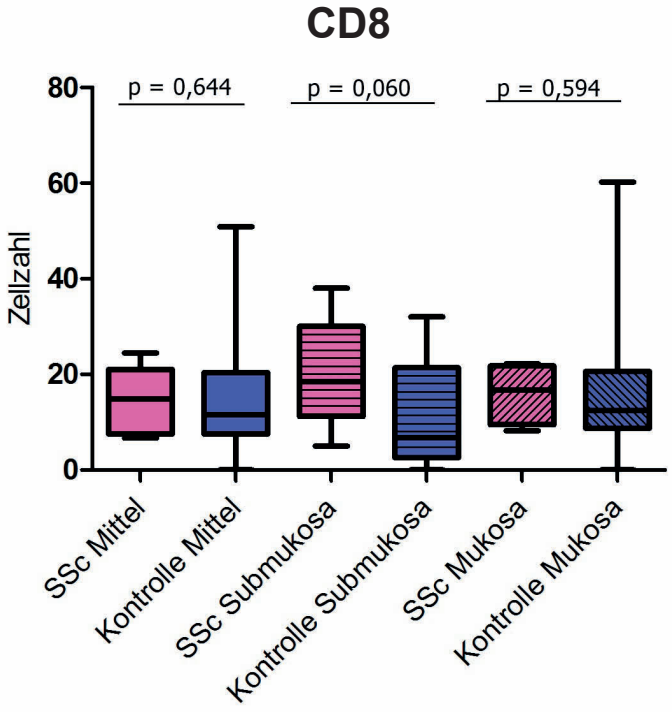


Abbildung 7: Anzahl CD8-positiver Zellen in der Magenwand. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl CD8-positiver Zellen zwischen SSc- und Kontrollgruppe. In beiden Kollektiven fand sich eine Infiltration sowohl der Mukosa- als auch der Submukosaschicht.

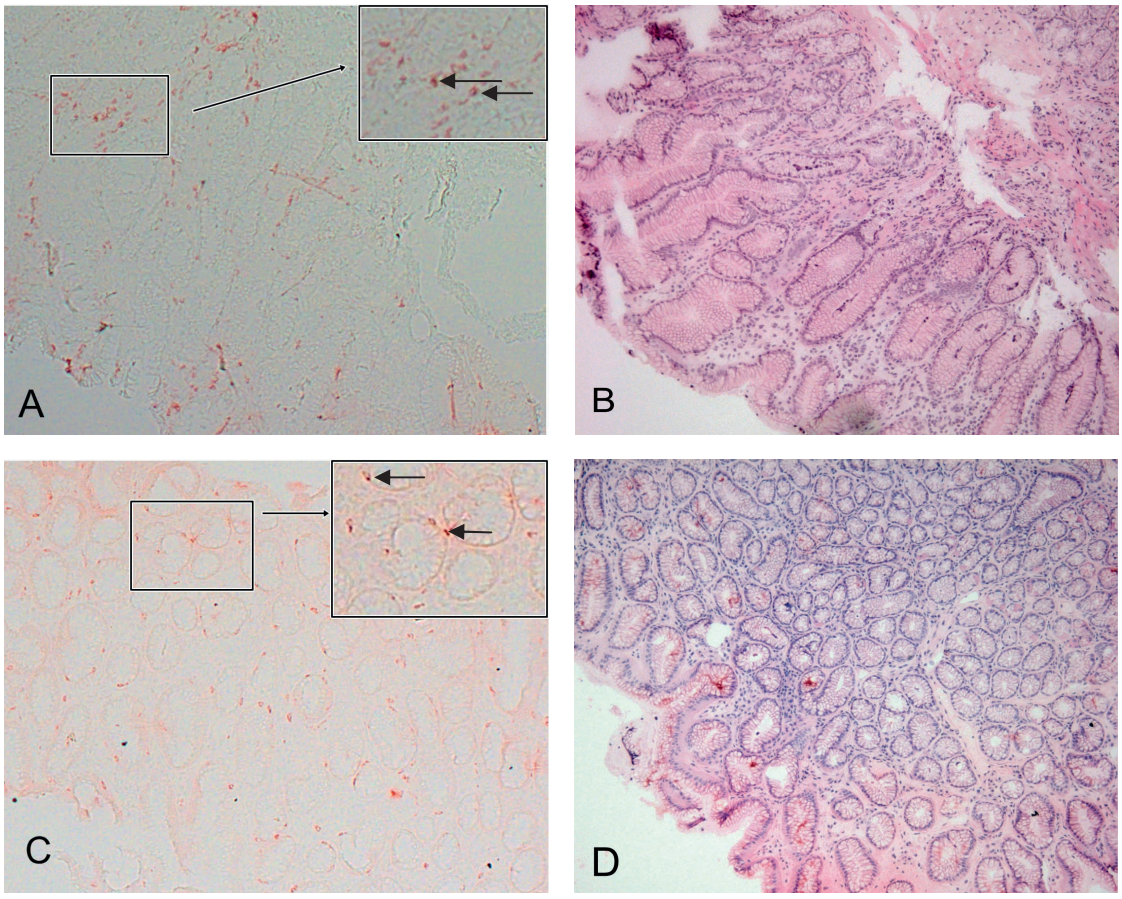


Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung CD8-positiver Zellen in der Magenwand. Die CD8-positiven Zellen färben sich immunhistochemisch rot an (A, C; Kasten). Sowohl in der Kontrollgruppe (A, B) als auch in der SSc-Gruppe (C, D) fanden sich wenige CD8-positive Zellen in der Lamina propria. Einzelne CD8-positive Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil markiert. Zur Übersicht sind HE-Färbungen der entsprechenden Gewebe dargestellt (B, D).

3.1.3 CD68-positive Zellen

CD68 ist ein Transmembranprotein, welches sich an der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten befindet. Die Anzahl CD68-positiver Immunzellen zwischen der SSc- und der Kontrollgruppe wurde verglichen. Dabei zeigte sich, dass im Kollektiv der an SSc erkrankten Patienten eine höhere Anzahl CD68-positiver Zellen nachzuweisen war als im Kollektiv der an Gastritis erkrankten Patienten (siehe Tab.9 und Abb.9). Dabei ließ sich jedoch nur bei den Mittelwerten eine signifikante Zellzahlerhöhung aufzeigen; die Ergebnisse der in der Mukosa- und Submukosa vorhandenen CD68-positiven Zellen lagen im Vergleich an der Grenze zum Signifikanzniveau (p-Wert Mukosa 0,051, p-Wert Submukosa 0,053). Während in der SSc-Gruppe die meisten Patienten eine Infiltration CD68-positiver Zellen vorzuweisen hatten, zeigte sich in vielen Fällen der

Kontrollgruppe eine geringe oder keine Zellinfiltration (siehe Abb. 10). Die CD68-positiven Zellen ließen sich auch hier in der Lamina propria der Mukosa oder, wenn im Gewebe vorhanden, auch in der Submukosa finden. Dabei zeigten sich keine dichten entzündlichen Infiltrate.

Tabelle 9: Anzahl CD68-positiver Zellen in der Magenwand

	SSc	Kontrolle	p-Wert
durchschnittliche Zellzahl (pro Feld)	13,3 (+/- 6,6)	6.8 (+/- 6,5)	p = 0,036*
Zellzahl Mukosa (pro Feld)	12,4 (+/- 8,6)	4,7 (+/- 6,7)	p = 0,051
Zellzahl Submukosa (pro Feld)	13,6 (+/- 6,4)	7,9 (+/- 6,8)	p = 0,053

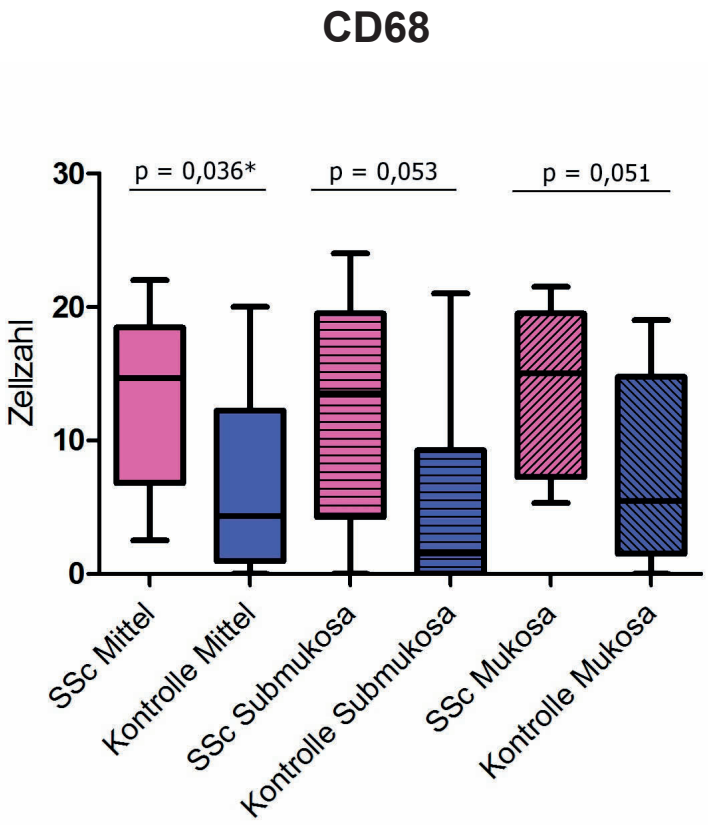


Abbildung 9: Anzahl CD68-positiver Zellen in der Magenwand. Beim Vergleich der Mittelwerte zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an CD68-positiven Zellen in der SSc-Gruppe, die im Schnitt eine doppelt so hohe Zellzahl CD68-positiver Zellen aufwies als die Kontrollgruppe. Die Mittelwerte für Mukosa und Submukosa erreichen die Signifikanz nicht.

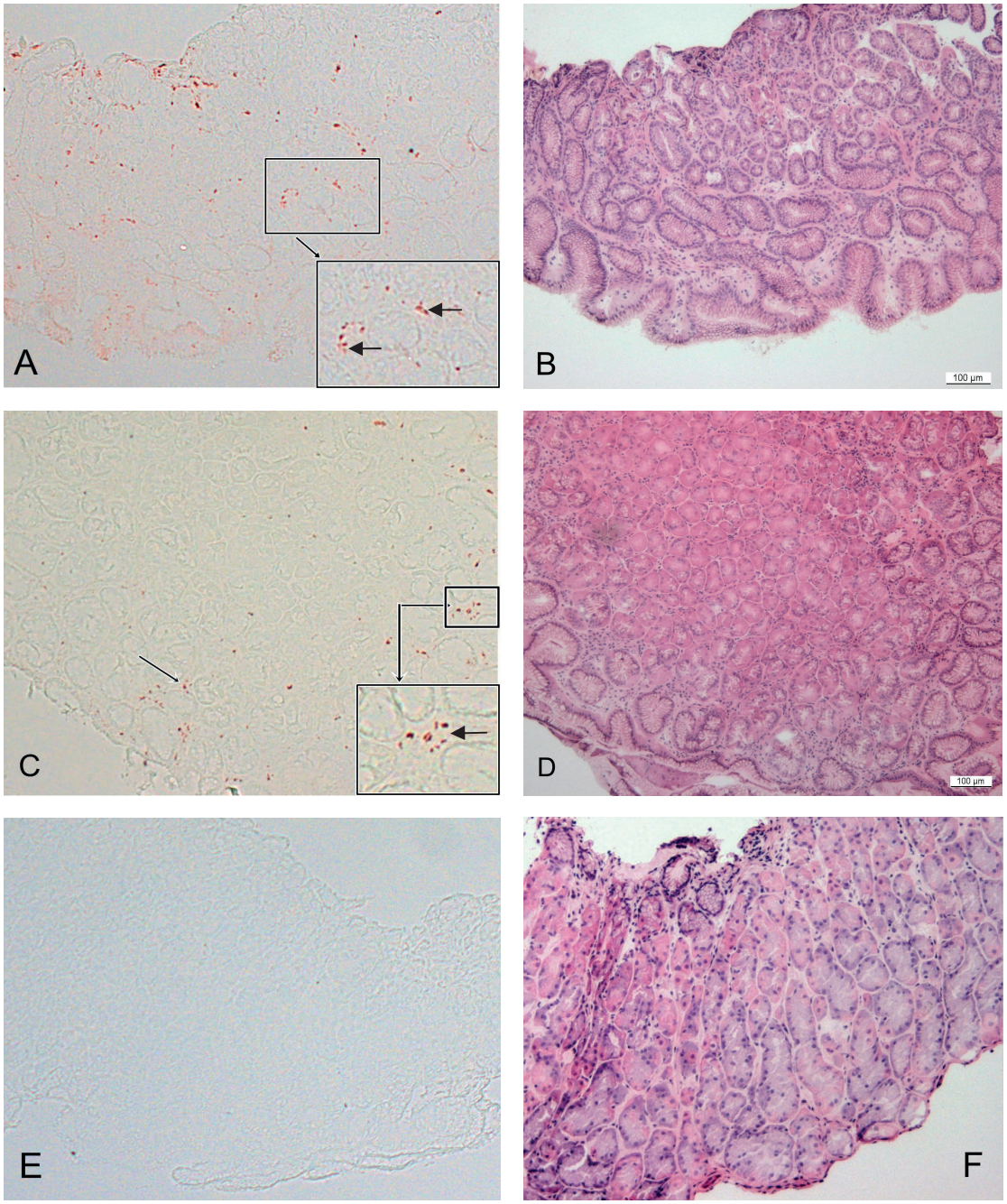


Abbildung 10: Immunhistochemische Darstellung CD68-positiver Zellen in der Magenwand.

Sowohl in der SSc-Gruppe (A,B) als auch in der Kontrollgruppe (C,D) zeigten sich CD68-positive Zellen. In vielen Proben der Kontrollgruppe ließen sich jedoch wenige oder gar keine CD68-positive Zellen nachweisen (E, F). Einzelne CD68-positive Zellen sind beispielhaft mit einem Pfeil markiert. Insgesamt zeigte sich in der SSc-Gruppe eine im Schnitt höhere Zellzahl CD68-positiver Zellen. Zur besseren Übersicht sind die jeweiligen HE-Färbungen (B,D,F) der jeweiligen Gewebe mit dargestellt.

3.1.4 Resistin

Analog zur Untersuchung der Immunzellmarker war Ziel der Untersuchung zu zeigen, ob ein Unterschied in der Resistinexpression zwischen SSc- und Kontrollgruppe besteht. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven nachweisen. Die Mehrzahl der Patienten beider Gruppen zeigte eine Resistinexpression, jedoch gab es auch in beiden Vergleichsgruppen Beispiele ohne Färbung. Bei Betrachtung der einzelnen anatomischen Kompartimente stellte sich die Resistinexpression in beiden Patientenkollektiven heterogen dar: Es ließ sich eine Färbung von Mukosaepithel, der Basallamina und der Lamina propria nachweisen. Jedoch waren nicht bei allen Gewebeschnitten alle anatomischen Kompartimente gleichermaßen gefärbt (s. Tab. 10 und Abb. 11), so dass in manchen Gewebeschnitten nur die Lamina propria und die Basallamina positiv gefärbt waren, in anderen jedoch auch die Mukosadrüsen. Einzelne Patienten aus beiden Gruppen zeigten eine inhomogene Färbung, bei der sich nur einige Bereiche des Präparates anfärbten. Die heterogene Färbung der Resistinschnitte ließ sich in beiden Patientenkollektiven gleichermaßen beobachten, ohne dass sich dabei ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der verschiedenen Färbemuster nachweisen ließ (s. Abb. 12).

Tabelle 10: Expression von Resistin in der Magenwand

	SSc	Kontrolle	p-Wert
Generelle Resistinexpression	6/9 (67%)	6/11 (55%)	p = 0,670
Lamina propria	4/9 (44%)	3/11 (27%)	p = 0,642
Drüsenepithel	5/9 (56%)	5/11 (45%)	p = 1,000
Basallamina	5/9 (56%)	3/11 (27%)	p = 0,362
Inhomogenität der Färbung	2/9 (22%)	4/11 (36%)	p = 0,643

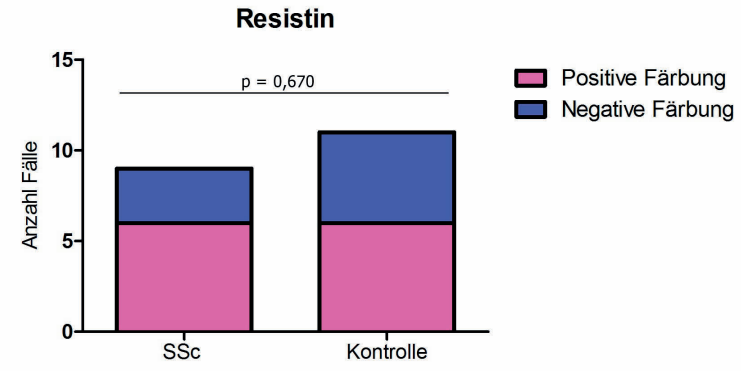


Abbildung 11: Expression von Resistin in der Magenwand. Es zeigt sich, dass 67% aller SSc-Patienten und 55% aller Kontrollpatienten Resistin in der Magenwand exprimierten. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

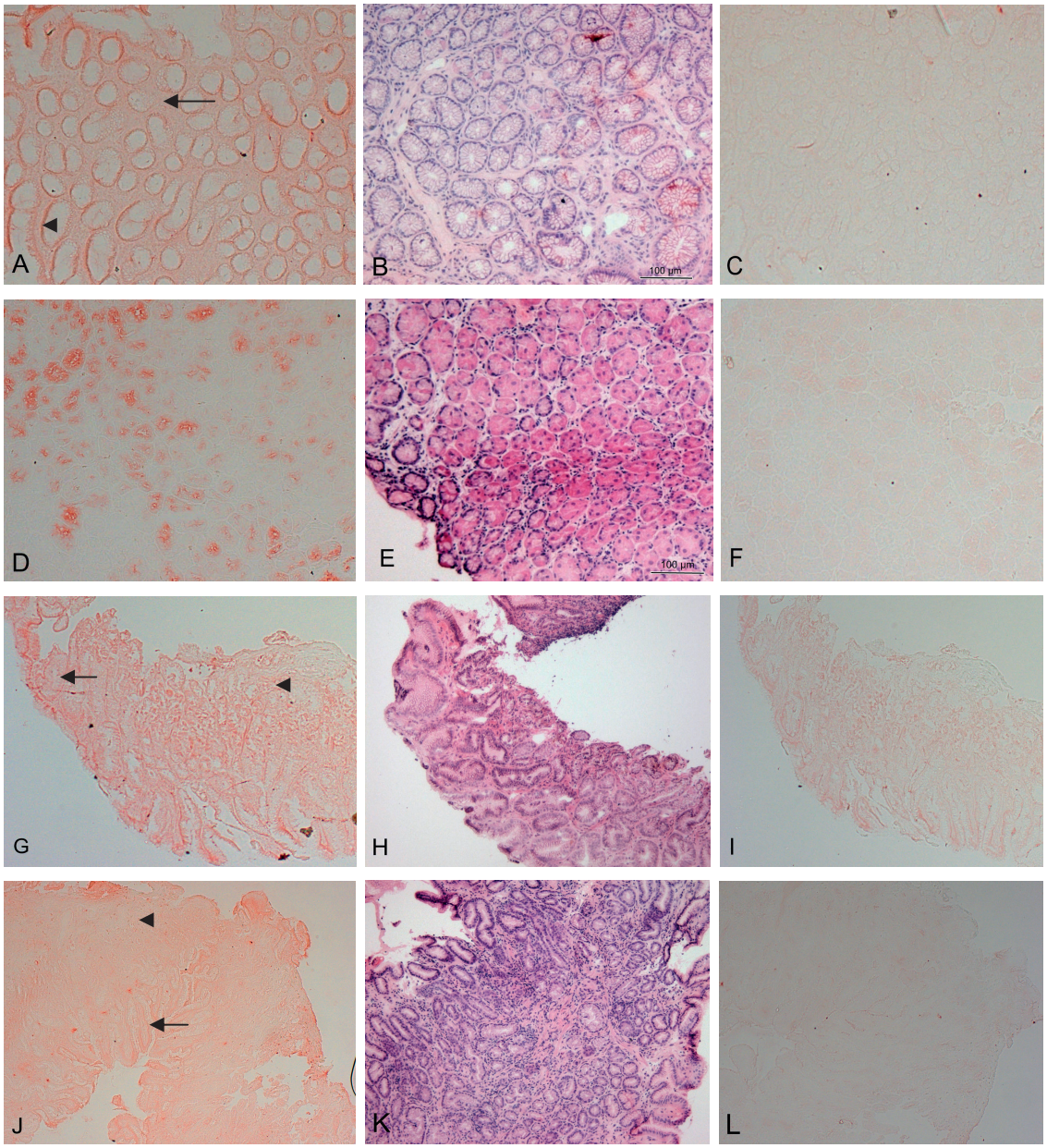


Abbildung 12: Immunhistochemische Darstellung der Expression von Resistin in der Magenwand. Gezeigt sind Resistinfärbung (A,D,G und J), Negativkontrolle (C,F,I und L) sowie die entsprechende HE-Aufnahme (B, E, H und K) am Beispiel von vier Geweben. Es fanden sich unterschiedliche Anfärbemuster: A (SSc) zeigte eine Resistinexpression vorwiegend in der Lamina propria (Pfeil) und der Basallamina (Pfeilkopf); bei D (Kontrolle) färbte sich das Drüsenepithel inhomogen an. G (SSc) und J (Kontrolle) zeigten eine Färbung, die neben Lamina propria (Pfeilkopf) und Basallamina auch die Mukosadrüsen (Pfeil) betraf. Die verschiedenen Färbemuster ließen sich in beiden Gruppen beobachten.

Nach Auswertung der Resistinexpression in den Magengeweben wurde diese mit der Expression der Immunzellmarker verglichen, um eine eventuelle Kolokalisation nachweisen zu können. Beim Vergleich der Resistinfärbungen mit den immunhistochemischen Färbungen der CD4-positiven Zellen zeigte sich eine höhere Zellzahl in Geweben, die kein Resistin exprimierten. Bei Betrachtung der beiden

Kollektive für sich ließ sich nachweisen, dass in der Kontrollgruppe keine Korrelation von CD4-positiven Zellen zur Resistinexpression bestand. In der SSc-Gruppe zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Zellzahl in Resistin-negativen Geweben (siehe Tab. 11 und Abb. 13). Beim Vergleich der Anzahl CD8-positiver Zellen in Resistin-positiven und -negativen Geweben zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Betrachtet man die Kontrollgruppe für sich, zeigten sich in Resistin-positiven Gewebeschnitten doppelt so viele CD8-positive Zellen als in Geweben, die kein Resistin exprimierten. Hierbei wurde die Signifikanz jedoch nicht erreicht. Bei der Korrelation der Resistinfärbungen mit der Anzahl CD68-positiver Zellen ließ sich kein signifikanter Zusammenhang nachweisen.

Tabelle 11: Korrelation von Immunzellmarkern zur Expression von Resistin in der Magenwand

	Resistin-positiv	Resistin-negativ	p-Wert
Anzahl $CD4^+$-Zellen (Median)	12,3	24,0	0,024*
SSc (Median)	12,3	27,4	0,004**
Kontrolle (Median)	21,7	23,7	0,846
Anzahl $CD8^+$-Zellen (Median)	12,7	10,0	0,481
SSc (Median)	12,5	19,55	0,212
Kontrolle (Median)	16,0	7,4	0,086
Anzahl $CD68^+$-Zellen (Median)	4,3	10,7	0,595
SSc (Median)	14,7	16,9	0,652
Kontrolle (Median)	1,0	9,3	0,436

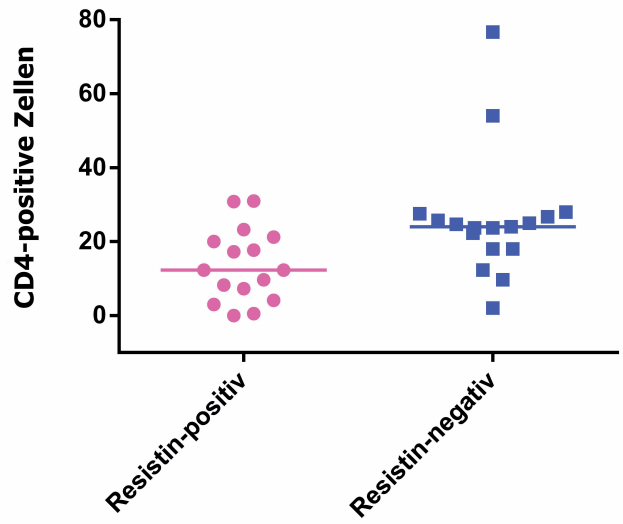


Abbildung 13: Anzahl CD4-positiver Zellen in Resistin-positiven und Resistin-negativen Magenschnitten. Dargestellt sind die Anzahl CD4-positiver Zellen pro Gewebe als Punkte sowie die Mediane als Linien. Es zeigt sich, dass Resistin-negative Magengewebe eine im Schnitt höhere Zellzahl aufwiesen. Der Unterschied ist signifikant (p=0,024).

3.1.5 Visfatin

Visfatin nimmt sowohl immunologische als auch metabolische Funktionen wahr. Die untersuchten immunhistochemischen Färbungen wiesen in beiden Patientenkollektiven meist eine Visfatinexpression auf. In der SSc-Gruppe zeigte sich bei allen 9 Patienten eine positive Visfatinfärbung; in der Kontrollgruppe ließ sich diese in 10 von 11 Fällen nachweisen (s. Abb. 14). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven (p=1,000). Bei der Betrachtung der einzelnen anatomischen Kompartimente zeigten sich, ähnlich der Resistinexpression, verschiedene Färbemuster. Wenige Schnitte in beiden Gruppen zeigten eine inhomogene Färbung (33% in der SSc-Gruppe und 27% in der Kontrollgruppe). Weiterhin ließ sich in beiden Patientenkollektiven eine Visfatinexpression der Lamina propria, des Drüsenepithels sowie der Basallamina nachweisen (s. Tab.12 und Abb. 15). Diese konnte sowohl nur einen der genannten anatomischen Bereiche betreffen oder aber häufiger, mehrere gleichzeitig. Dabei färbten sich die einzelnen anatomischen Kompartimente der Magengewebe der beiden Gruppen gleichermaßen häufig an (s. Tab. 12).

Tabelle 12: Expression von Visfatin in der Magenwand

	SSc	Kontrolle	p-Wert
Generelle Visfatinexpression	9/9 (100%)	10/11 (91%)	p = 1,000
Lamina propria	7/9 (78%)	6/11 (55%)	p = 0,374
Drüsenepithel	6/9 (67%)	6/11 (55%)	p = 0,670
Basallamina	9/9 (100%)	7/11 (64%)	p = 0,094
Inhomogenität der Färbung	3/9 (33%)	3/11 (27%)	p = 1,000

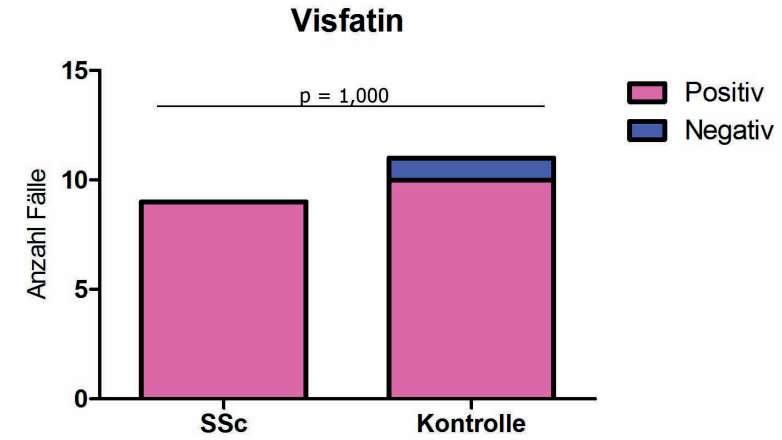


Abbildung 14: Expression von Visfatin in der Magenwand. Es zeigt sich, dass in beiden Patientenkollektiven häufig Visfatin exprimiert wurde: In der SSc-Gruppe ließ sich bei allen Patienten eine Visfatinexpression nachweisen, in der Kontrollgruppe war die Färbung in 10 von 11 Fällen positiv.

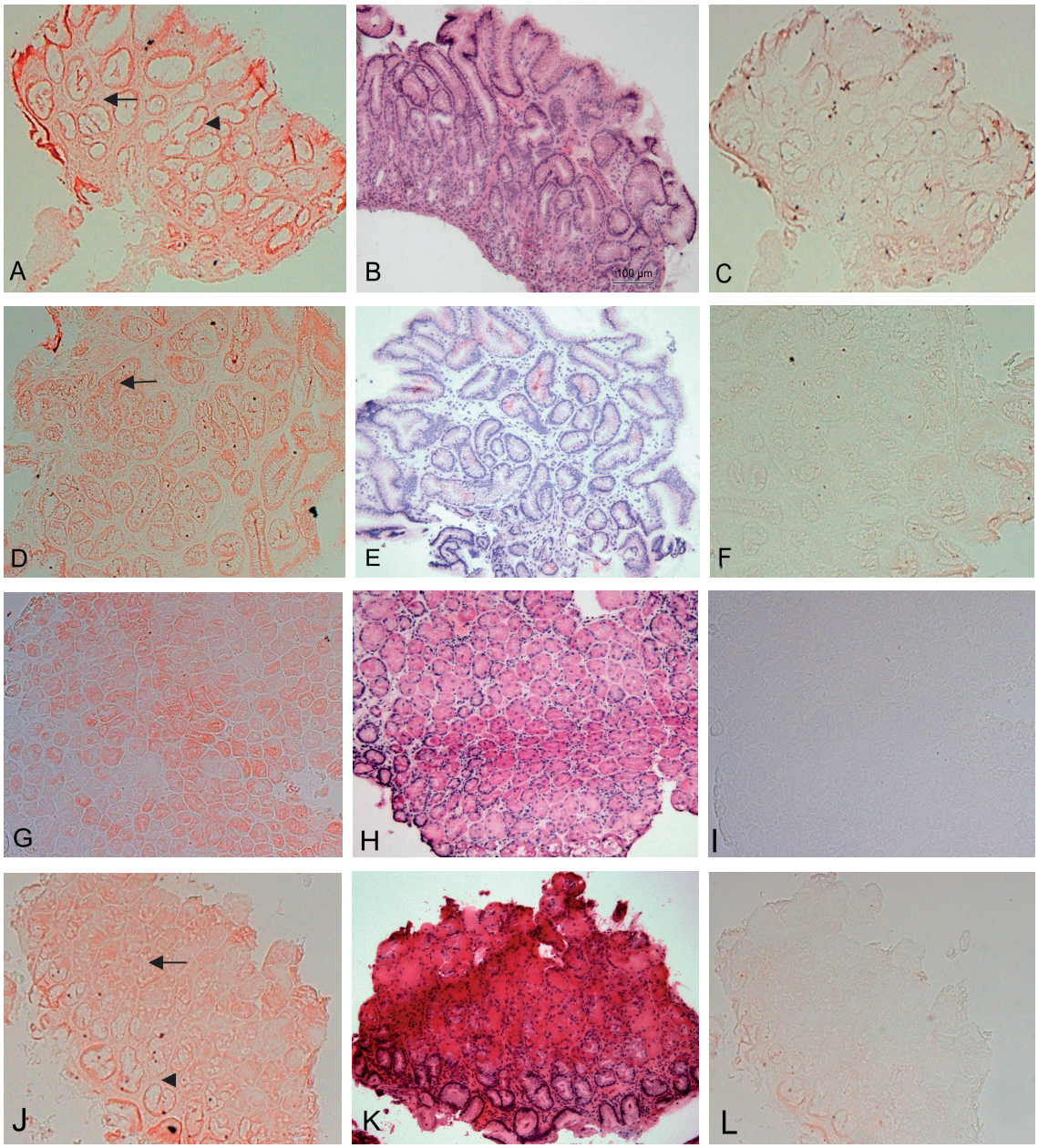


Abbildung 15: **Immunhistochemische Darstellung der Expression von Visfatin in der Magenwand**. Gezeigt sind Visfatinfärbung (A,D,G und J), Negativkontrolle (C,F,I und L) sowie die entsprechende HE-Aufnahme (B,E,H und K) am Beispiel von vier verschiedenen Geweben. Es fanden sich verschiedene Färbemuster: A (Kontrolle) zeigte eine Visfatinexpression vorwiegend in der Lamina propria (Pfeil) und der Basallamina (Pfeilkopf); bei D (SSc) färbte sich vor allem die Basallamina bzw. das basale Drüsenepithel (Pfeil). Bei G (Kontrolle) zeigte sich eine inhomogene Färbung der Mukosadrüsen; bei J (SSc) hingegen färbten sich sowohl die bindegewebigen Anteile in der Lamina propria (Pfeilkopf) als auch die Mukosadrüsen (Pfeil) an. Die verschiedenen Färbemuster ließen sich in beiden Gruppen gleichermaßen beobachten.

Nach Auswertung der Visfatinexpression in den Magenschnitten wurde diese mit der Expression der Immunzellmarker verglichen, um eine eventuelle Kolokalisation nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass sich die Zellzahlen von CD4- und CD8-

positiven T-Zellen sowie CD68-positiven Immunzellen in Visfatin-positiven und Visfatin-negativen nicht signifikant unterschieden (s. Tab.13). Weiterhin war von Interesse, ob eine Kolokalisation der verschiedenen Adipokine bestand. Beim Vergleich der immunhistochemischen Resistin- und Visfatinfärbungen zeigte sich, dass 86% aller Resistin-positiven Gewebe auch Visfatin exprimierten und 67% aller Resistin-negativen Gewebe ebenfalls Visfatin-positiv waren (p=0,390). Auch der Vergleich beider Patientenkollektive für sich ergab ähnliche Ergebnisse: Resistin-positive Gewebe exprimierten zu 88% (Kontrolle) bzw. 86% (SSc) auch Visfatin; Resistin-negative Gewebe zeigten in beiden Gruppen in 67% aller Fälle eine Visfatinexpression (s. Tab. 14).

Tabelle 13: Korrelation der Immunzellmarker CD4, CD8 und CD68 zur Expression von Visfatin

	Visfatin-positiv	Visfatin-negativ	p-Wert
Anzahl $CD4^+$-Zellen (Median)	19,0	18,5	0,965
SSc (Median)	17,7	12,3**	--**
Kontrolle (Median)	23,3	24,7	0,660
Anzahl $CD8^+$-Zellen (Median)	12,6	12,7	0,227
SSc (Median)	16,0	26,0	0,659
Kontrolle (Median)	11,0	11,7	0,574
Anzahl $CD68^+$-Zellen (Median)	5,5	14,0	0,104
SSc (Median)	16,0	23,7	0,118
Kontrolle (Median)	4,9	12,4	0,299

**: Da nur ein Gewebe in der SSc-Gruppe existiert, das Visfatin-negativ und zugleich für CD4 gefärbt wurde, gelingt hier keine statistische Testung. Statt des Medians ist hier die für dieses Gewebe ausgewertete Zellzahl angegeben.

Tabelle 14: Korrelation von Visfatin- und Resistinexpression der Magenschnitte

	Visfatin-positiv	Visfatin-negativ	p-Wert
Resistin-positiv	86%	14%	0,390
Resistin-negativ	67%	33%	
Resistin-positiv			
SSc	86%	14%	1,000
Kontrolle	88%	12%	
Resistin-negativ			
SSc	67%	33%	1,000
Kontrolle	67%	33%	

3.1.6 Adiponektin

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Adipokinen Resistin und Visfatin stellten sich die Adiponektinfärbungen des Magengewebes im Vergleich zwischen SSc- und Kontrollkollektiv unterschiedlich dar. Adiponektin wurde in den ausgewerteten immunhistochemischen Gewebeschnitten im Bereich kleiner Gefäße der Submukosa und Lamina propria exprimiert. Darüber hinaus zeigten einzelne Zellen in der Lamina propria der Mukosa eine Adiponektinexpression. Diffuse Färbungen der Mukosadrüsen, der Lamina propria oder der Submukosa ließen sich nicht finden. Hinsichtlich der Adiponektinexpression zeigte sich ein signifikanter Unterschied (p=0,049*) zwischen SSc- und Kontrollgruppe (siehe Abb.16). In der Kontrollgruppe zeigte sich in 10 von 11 Fällen eine Adiponektinexpression, die insbesondere perivaskulär und/oder in Zellen der Lamina propria lokalisiert war. Hingegen ließ sich in der SSc-Gruppe in der Mehrheit der Proben keine Adiponektinexpression nachweisen (siehe Abb. 17). 4 von 9 SSc-Patienten zeigten eine Adiponektinfärbung im Bereich kleinerer Gefäße in der Lamina propria und der Submukosa, jedoch konnten im Gegensatz zur Kontrollgruppe keine Adiponektin-positiven Zellen abseits der Gefäße nachgewiesen werden. Betrachtet man alle ausgewerteten Magenproben, waren in der Kontrollgruppe 75% aller Proben Adiponektin-positiv, wohingegen in der SSc-Gruppe nur 20% aller Proben Adiponektin exprimierten.

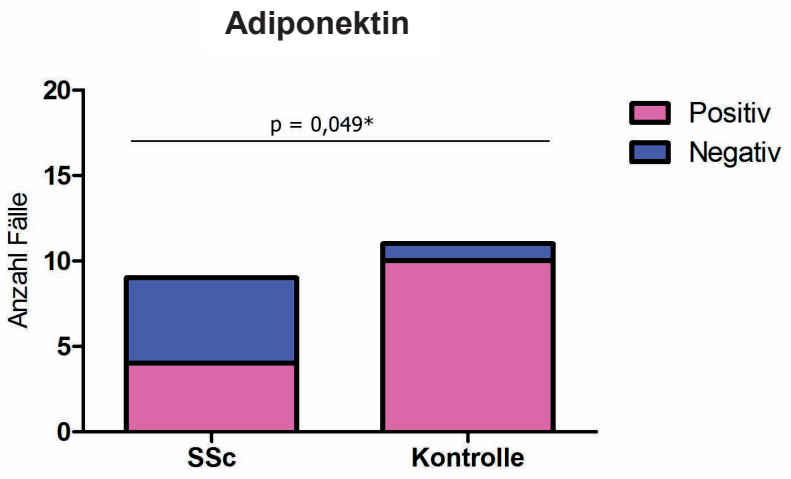


Abbildung 16: Expression von Adiponektin in der Magenwand. Dargestellt ist die Adiponektinexpression im SSc- und im Kontrollkollektiv. Es zeigt sich, dass in der Kontrollgruppe 10 von 11 Patienten Adiponektin exprimierten, wohingegen dies nur in 4 von 9 SSc-Patienten der Fall war. Der Unterschied der beiden Kollektive ist signifikant (p=0,049*).

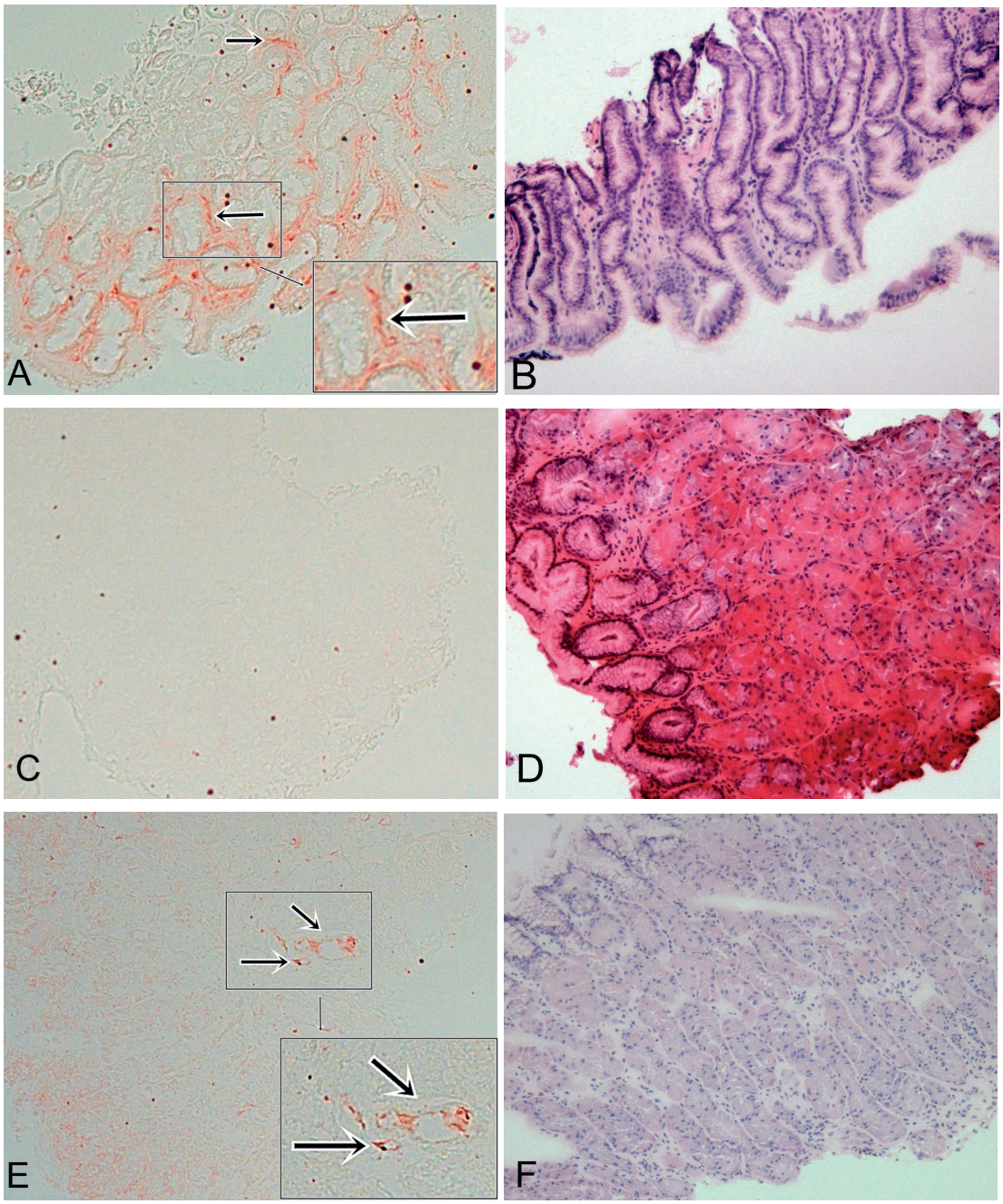


Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung der Expression von Adiponektin im Magen. Dargestellt sind Adiponektinfärbung (A,C,E) und die zugehörigen HE-Färbungen (B,D,F). In der Kontrollgruppe (A,B) zeigte sich eine deutliche Adiponektinexpression: Im Bereich der Lamina propria ließ sich die rote Färbung zellassoziiert erkennen (A, Pfeile und Kasten). Im SSc-Kollektiv (C,D,E,F) stellten sich die meisten Gewebe komplett ohne Färbung dar (C). In wenigen Schnitten konnte eine Adiponektinexpression im Bereich kleiner Gefäße nachgewiesen werden (E, Pfeile und Kasten). Eine Adiponektinexpression, die über den Gefäßbereich hinausgeht, ließ sich nicht zeigen.

Nach Auswertung der Adiponektinexpression der Magenschnitte wurde diese mit der Expression der Immunzellmarker CD4, CD8 und CD68 verglichen, um eine eventuelle Kolokalisation nachweisen zu können. Es zeigte sich, dass Adiponektin-positive Gewebe eine signifikant höhere Anzahl CD4-positiver Zellen aufwiesen (s. Tab. 15 und

Abb. 18). Beim Vergleich zwischen Kontroll- und SSc-Kollektiv fand sich in der Kontrollgruppe ebenso eine signifikant höhere Anzahl an CD4-positiven Zellen in Adiponektin-positiven Geweben. In der SSc-Gruppe fanden sich auch mehr CD4-positive Zellen in Adiponektin-positiven Geweben, jedoch ist war der Unterschied nicht signifikant (s. Tab. 15). Beim Vergleich der Adiponektinfärbungen mit der Anzahl CD8-positiver Zellen fanden sich in Adiponektin-positiven und Adiponektin-negativen Geweben ähnliche Zellzahlen in beiden Kollektiven. Betrachtete man die Anzahl CD68-positiver Immunzellen, fanden sich sowohl zusammengenommen als auch in beiden Patientenkollektiven für sich mehr Zellen in Adiponektin-negativen Geweben. Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nur nachweisen, wenn beide Kollektive gemeinsam betrachtet wurden (s. Tab. 15 und Abb. 19).

Anschließend wurde die Adiponektinexpression mit der Expression von Resistin und Visfatin verglichen. Insgesamt 47% aller Resistin-positiven Gewebe und 60% aller Resistin-negativen Gewebe exprimieren Adiponektin (s. Tab. 16). In der SSc-Gruppe war dieser Anteil zugunsten der Adiponektin-negativen Gewebe verschoben; in der Kontrollgruppe hingegen zugunsten der Gewebe, die Adiponektin exprimierten. Beim Vergleich der Adiponektin- mit den Visfatinfärbungen zeigte sich ein ähnliches Muster: 52% aller Visfatin-positiven Gewebe und 57% aller Visfatin-negativen Gewebe exprimierten Adiponektin. Betrachtete man beide Patientenkollektive für sich, fanden sich für die Visfatin-positiven Gewebeschnitte ähnliche Ergebnisse sowohl in der SSc- als auch in der Kontrollgruppe (s. Tab. 17). Für die Visfatin-negativen Gewebe ergab sich eine Diskrepanz zwischen SSc- und Kontrollgruppe: In der Kontrollgruppe zeigten alle Visfatin-negativen Gewebe eine Adiponektinexpresson, wohingegen in der SSc-Gruppe alle Visfatin-negativen Gewebe auch Adiponektin-negativ waren.

Tabelle 15: Korrelation von den Immunzellmarkern CD4, CD8 und CD68 zur Expression von Adiponektin in der Magenwand.

	Adiponektin-positiv	**Adiponektin-negativ**	**p-Wert**
Anzahl $CD4^+$ Zellen (Median)	24,4	12,3	0,008**
SSc (Median)	22,0	15,0	0,543
Kontrolle (Median)	24,4	9,7	0,019*
Anzahl $CD8^+$ Zellen (Median)	12,8	11,3	0,698
SSc (Median)	12,5	17,3	0,531
Kontrolle (Median)	12,0	11,3	0,765
Anzahl $CD68^+$ Zellen (Median)	3,4	14,4	0,026*
SSc (Median)	5,0	17,0	0,251
Kontrolle (Median)	3,3	9,3	0,189

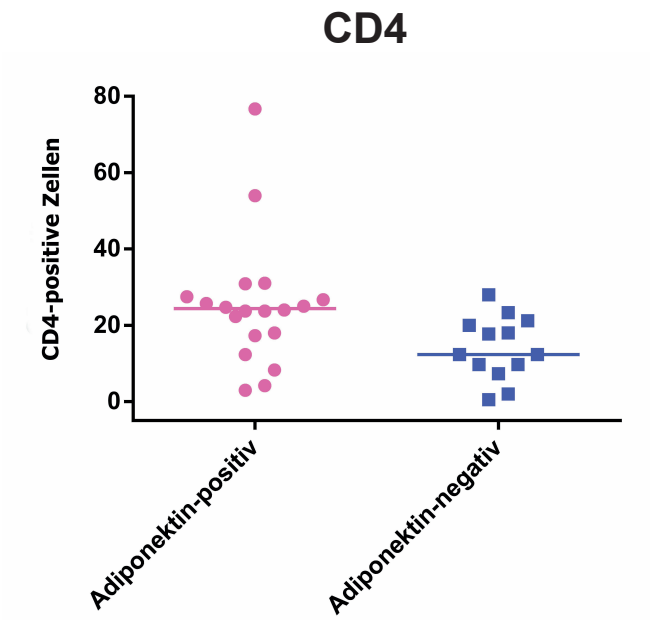


Abbildung 18: Anzahl CD4-positiver Zellen in Adiponektin-positiven und Adiponektin-negativen Magenschnitten. Dargestellt sind die Anzahl CD4-positiver Zellen pro Gewebe als Punkte sowie die Mediane als Linien. Es zeigt sich, dass Adiponektin-positive Magengewebe eine im Schnitt höhere Zellzahl aufwiesen. Der Unterschied ist signifikant (p=0,008**).

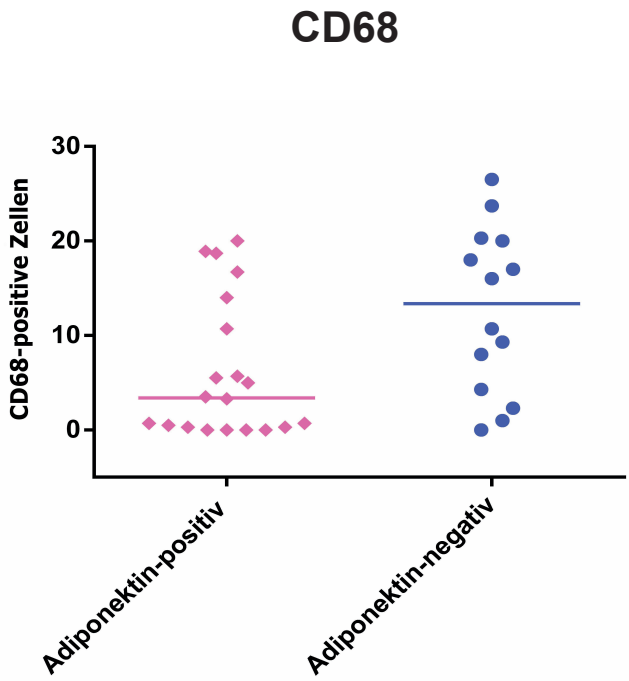


Abbildung 19: Anzahl CD68-positiver Immunzellen in Adiponektin-positiven und Adiponektin-negativen Magenschnitten. Dargestellt sind die Anzahl CD68-positiver Zellen pro Gewebe als Punkte sowie die Mediane als Linien. Es zeigt sich, dass Adiponektin-negative Magengewebe eine im Schnitt höhere Zellzahl aufwiesen. Der Unterschied ist signifikant (p=0,026*).

Tabelle 16: Korrelation von Adiponektin- und Resistinexpression in der Magenwand

	Adiponektin-positiv	Adiponektin-negativ	p-Wert
Resistin-positiv	47%	53%	0,715
Resistin-negativ	60%	40%	
Resistin-positiv			
SSc	25%	75%	0,315
Kontrolle	62%	38%	
Resistin-negativ			
SSc	33%	67%	0,118
Kontrolle	80%	20%	

Tabelle 17: Korrelation von Adiponektin- und Visfatinexpression in der Magenwand

	Adiponektin-positiv	Adiponektin-negativ	p-Wert
Visfatin-positiv	52%	48%	1,000
Visfatin-negativ	57%	43%	
Visfatin-positiv			
SSc	45%	55%	0,682
Kontrolle	62%	38%	
Visfatin-negativ			
SSc	0%	100%	0,029*
Kontrolle	100%	0%	

3.2 Auswertung der Lungenproben

Analog zur Adipokinexpression im Magengewebe erfolgte die Auswertung immunhistochemischer Adipokinfärbungen im Lungengewebe. Dazu wurden Gewebeproben von 8 bzw. 7 gesunden Donorpatienten, 8 Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose (IPF) sowie von 2 SSc-Patienten mit fortgeschrittener Lungenbeteiligung untersucht. Dabei wurden Paraffinschnitte verwendet, an denen immunhistochemische Färbungen der Adipokine Visfatin, Resistin und Adiponektin sowie zu Surfactant-Protein C durchgeführt wurden. Die Gewebeschnitte wurden für die im Folgenden dargestellte Auswertung durch die Promovendin zur Verfügung gestellt. Anschließend erfolgte eine semiquantitative Auswertung.

3.2.1 Adiponektin

Die Adiponektinexpression im Lungengewebe stellte sich in ihrem Muster ähnlich wie die des Magengewebes dar. Adiponektin wurde im Bereich kleiner und großer Gefäße exprimiert. Dabei fanden sich positive Adiponektinfärbungen in der Media größerer Gefäße, aber auch im Bereich des Endothels dünnwandiger Gefäße. Zudem fand sich endoluminal regelmäßig ein Adiponektinsignal. Im Bereich des Bronchialepithels ließ sich ein schwaches Adiponektinsignal nachweisen, das vor allem im Bereich der Kinozilien lokalisiert war. Im Lungenparenchym zeigte sich eine zellassoziierte Adiponektinexpression, die sich in den verschiedenen Patientenkollektiven unterschiedlich stark darstellte. Dabei zeigten die Donorgewebe eine starke Adiponektinexpression, wohingegen die fibrotischen Gewebe der SSc- und IPF-Gruppen eine schwache Adiponektinexpression zeigten. Die Scores der generellen Adiponektinexpression sowie der einzelnen anatomischen Kompartimente sind in Tabelle 18 gelistet, die generelle Adiponektinexpression ist in Abb. 20 veranschaulicht.

Tabelle 18: Expression von Adiponektin im Lungengewebe unter Berücksichtigung der anatomischen Bereiche. Aufgeführt sind jeweils Median und Mittelwert mit Standardfehler im Rahmen des semiquantitativen Scorings (Score 0 = keine Färbung bis Score 3 = starke Färbung). [1] Aufgrund der geringen Stichprobengröße in der SSc-Gruppe bezieht sich der p-Wert auf die statistische Auswertung zwischen Donor- und IPF-Kollektiv.

		Donor	IPF	SSc	p-Wert[1]
generelle Adiponektinexpression	Median	3,0	1,0	--	< 0,0001 ***
	Mittelwert (+/- SEM)	2,75 (+/- 0,16)	1,10 (+/- 0,1)	1,0 (+/- 0,0)	
Adiponektinexpression Gefäße	Median	2,5	2,0	--	0,059
	Mittelwert (+/- SEM)	2,38 (+/- 0,26)	1,75 (+/- 0,16)	1,5 (+/- 0,0)	
Adiponektinexpression endoluminal	Median	2,5	2,0	--	> 0,999
	Mittelwert (+/- SEM)	2,5 (+/- 0,22)	2,43 (+/- 0,20)	2,5 (+/- 0,0)	
Adiponektinexpression Parenchym	Median	3,0	1,0	--	< 0,0001 ***
	Mittelwert (+/- SEM)	2,75 (+/- 0,16)	1,0 (+/- 0,19)	1,0 (+/- 0,0)	
Adiponektinexpression Bronchialepithel	Median	0,5	1,0	--	> 0,999
	Mittelwert (+/- SEM)	0,5 (+/- 0,19)	0,63 (+/- 0,18)	1,0 (+/- 0,0)	

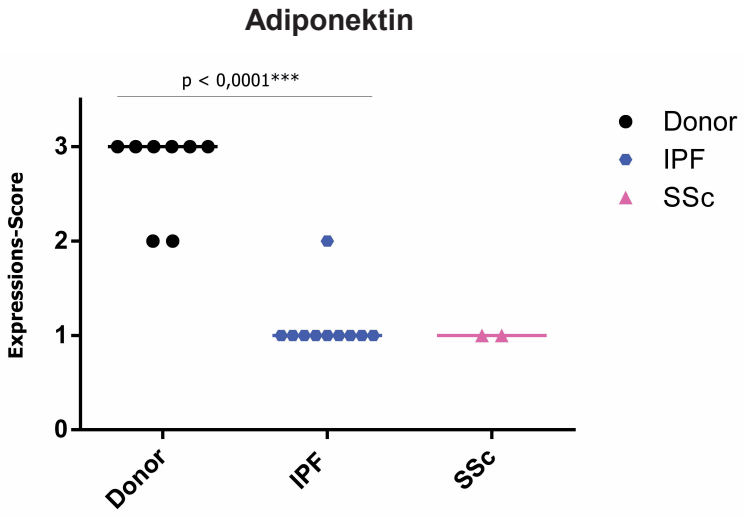


Abbildung 20: Expression von Adiponektin im Lungengewebe. Abgebildet ist die Verteilung der jeweils erhaltenen semiquantitativen Scores als einzelne Punkte sowie der Median als Linie. Das gesunde Donorgewebe zeigte eine starke Adiponektinexpression (Median Score 3), wohingegen die IPF- und SSc-Gewebe nur eine schwache Adiponektinexpression aufwiesen (Median Score 1). Der Unterschied zwischen Donor- und IPF-Gruppe ist signifikant (p < 0,0001***).

Bei der Auswertung der generellen Adiponektinexpression zeigte sich ein Unterschied zwischen Donorgruppe auf der einen Seite und IPF- und SSc-Gruppe auf der anderen Seite: Alle Gewebe der gesunden Donorgruppe zeigten eine deutliche Adiponektinexpression (Median Score 3), wohingegen die IPF- und SSc-Gruppen nur eine schwache oder keine Adiponektinexpression zeigten (IPF Median Score 1). In den Geweben zeigte sich, dass das Donorgewebe (Abb.21 A und B) trotz geringerer Gewebemasse auf Grund der fehlenden Fibrose ein stärkeres Adiponektinsignal aufwies als die fibrotischen Gewebe der IPF- und SSc-Kollektive (Abb.21 C,D und E,F).

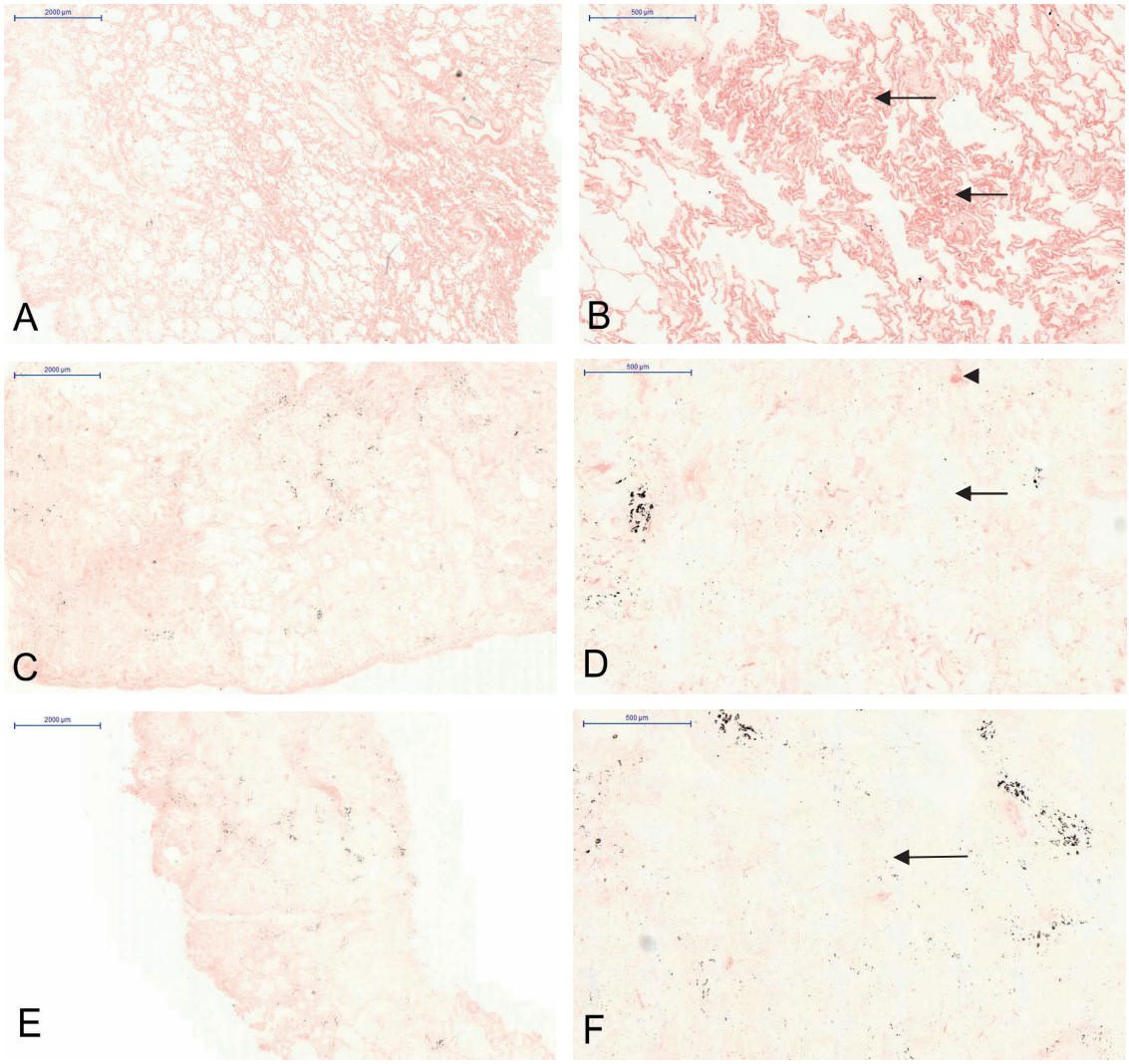


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung der Expression von Adiponektin im Lungengewebe. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von gesundem Donorgewebe (A,B) sowie von IPF-Gewebe (C,D) und SSc-Gewebe (E,F). Links ist jeweils eine Übersichtsaufnahme dargestellt, rechts ein vergrößerter Abschnitt dieser Aufnahme. In der Lunge des Donorgewebes zeigte sich eine starke Adiponektinexpression (s. Pfeile). Im Gegensatz dazu wiesen die fibrotischen Lungengewebe von IPF- und SSc-Patienten nur eine sehr schwache Adiponektinexpression auf (fibrotische Bereiche sind beispielhaft mit einem Pfeil markiert), die sich häufig nur endoluminal (s. Pfeilkopf) fand.

Als nächstes erfolgte die Auswertung der einzelnen anatomisch-morphologischen Bereiche. Zuerst wurden die Lungengefäße beurteilt, wobei sowohl größere Gefäße mit prominenter fibromuskulärer Wandschicht (s. Abb. 23) als auch sehr kleine und dünne Gefäße, die hauptsächlich aus Endothel bestanden (s. Abb. 24), in die Bewertung eingingen. Adiponektin wurde, wie auch im Magengewebe, im Bereich der Gefäße exprimiert. Hierbei ließen sich positive Adiponektinsignale sowohl im Bereich der Gefäßmedia als auch im Bereich des Endothels nachweisen. Dabei fand sich in allen drei Patientenkollektiven ein Adiponektinsignal, das im Schnitt in der Donorgruppe am höchsten war (Mittelwert 2,38), gefolgt von der IPF-Gruppe (Mittelwert 1,75) und der SSc-Gruppe (Mittelwert 1,5). Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht (p = 0,059), (siehe Abb.22).

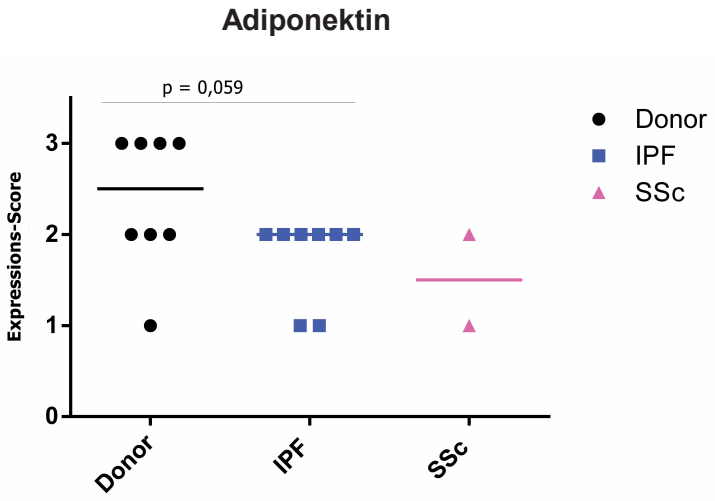


Abbildung 22: Expression von Adiponektin in den Lungengefäßen. Abgebildet ist die Verteilung der jeweils erhaltenen semiquantitativen Scores als einzelne Punkte sowie der Median als Linie. Sowohl Donor- als auch IPF- und SSc-Kollektiv exprimierten Adiponektin im Bereich der Lungengefäße. Dabei war der Score in der Donorgruppe am höchsten (Median 2,5), gefolgt von der IPF-Gruppe (Median 2) und der SSc-Gruppe (Median 1,5). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde jedoch nicht erreicht (p = 0,059).

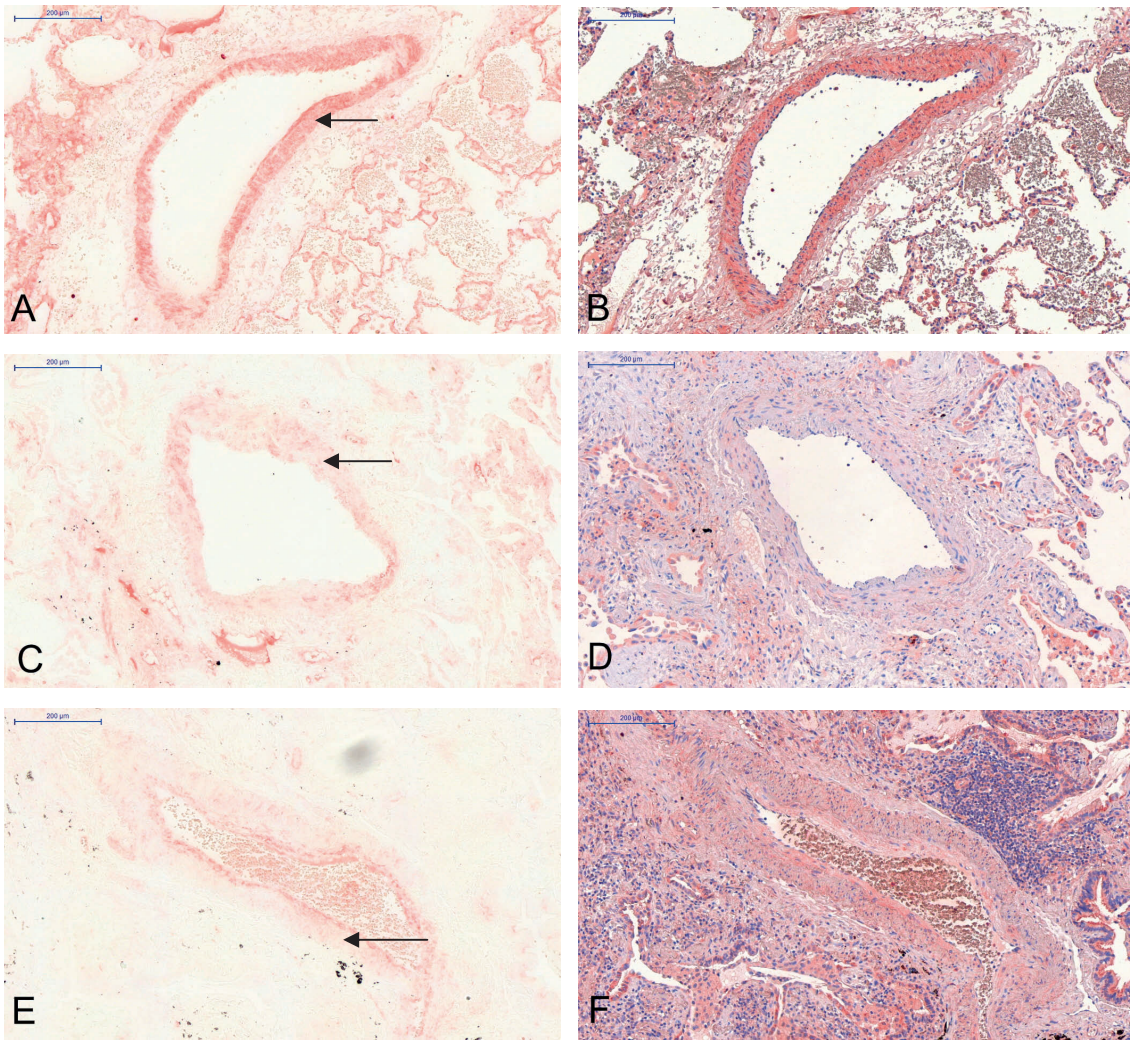


Abbildung 23: Expression von Adiponektin in der Gefäßwand größerer Lungengefäße. Dargestellt sind die immunhistochemische Adiponektinfärbungen (A,C,E) sowie die entsprechenden Surfactant Protein-C Färbungen mit Hämatoxylin-Kernfärbung (B,D,F) zur anatomischen Zuordnung. Sowohl in der Donorgruppe (A,B) als auch in dem IPF- (B,D) und SSc-Kollektiv (E,F) ließ sich eine Adiponektinexpression im Bereich der Gefäßwand größerer Gefäße nachweisen. Die Gefäßwand ist jeweils mit einem Pfeil markiert. Dabei war der Score in der Donorgruppe im Schnitt höher.

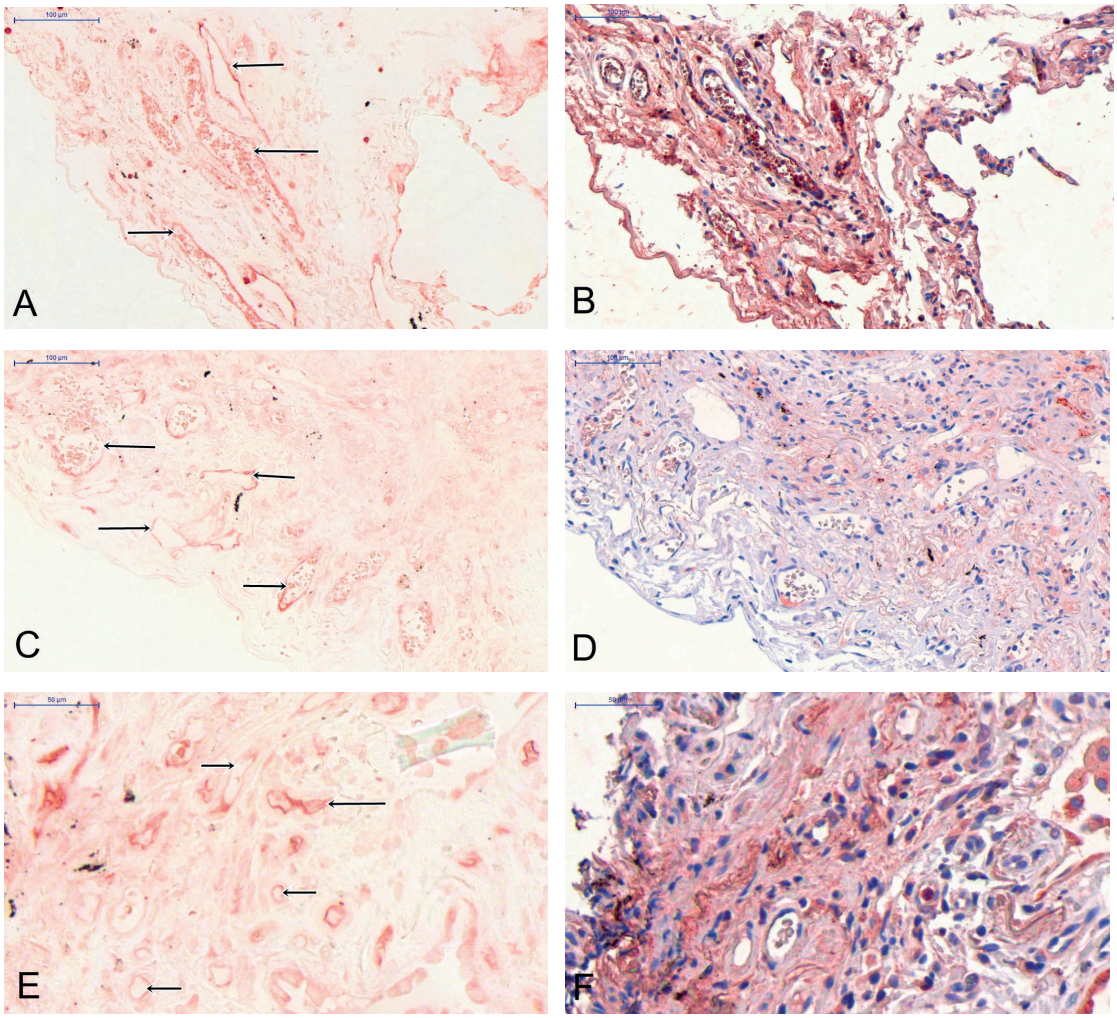


Abbildung 24: Expression von Adiponektin in kleinen Lungengefäßen mit dünner Gefäßwand. Gezeigt sind immunhistochemische Adiponektinfärbungen (A,C,E) sowie die entsprechenden Surfactant Protein-C Färbungen mit Hämatoxylin-Kernfärbung zur anatomischen Zuordnung. Kleine Gefäße, die Adiponektin exprimieren, sind mit einem Pfeil markiert. Sowohl in der Donorgruppe (A,B) als auch in dem IPF- (B,D) und SSc-Kollektiv (E,F) ließ sich eine Adiponektinexpression im Bereich kleinerer Gefäße nachweisen. Dabei war der Score in der Donorgruppe im Schnitt höher.

Weiterhin wurde das Bronchialepithel hinsichtlich der Adiponektinexpression begutachtet. Dabei zeigten sowohl gesundes Donorgewebe als auch die Lungengewebe von IPF- und SSc-Patienten keine oder eine nur schwache Adiponektinexpression im Bronchialepithel (s. Abb. 25). Dabei fand sich das Adiponektinsignal in den dem Bronchialepithel aufsitzenden Kinozilien (Flimmerhärchen) vermehrt im Vergleich zu den Epithelzellen selbst. Zwischen dem Donor- und IPF-Kollektiv bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (s. Tab. 18). Als Kontrast zu dem nur wenig gefärbten Bronchialepithel stellte sich im gesunden Gewebe (s. Abb. 25 A) das umgebende Parenchym in Form von Lungensepten adiponektinreich dar.

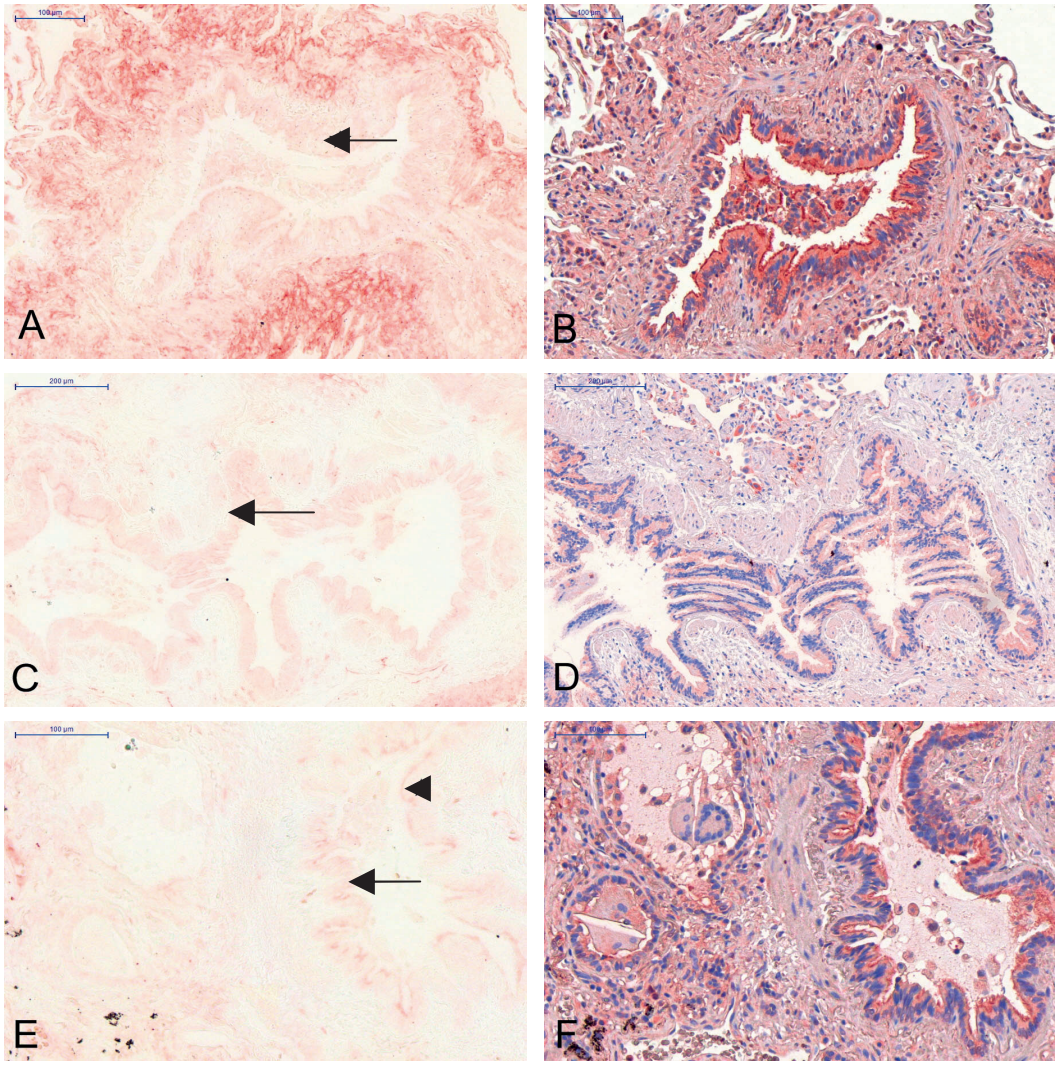


Abbildung 25: Expression von Adiponektin im Bronchialepithel. Gezeigt sind immunhistochemische Adiponektinfärbungen (A,C,E) sowie die entsprechenden Surfactant Protein-C Färbungen mit Hämatoxylin-Kernfärbung (B,D,F) zur anatomischen Zuordnung. Das Bronchialepithel ist in den Abbildungen A,C,E der Adiponektinfärbungen mit einem Pfeil markiert. Sowohl in der Donorgruppe (A,B) als auch in der IPF- (C,D) und der SSc-Gruppe (E,F) zeigte sich lediglich eine geringe Adiponektinexpression. Diese fand sich häufig nur im Bereich der Kinozilien (Pfeilkopf in E).

Weiterhin erfolgte eine Bewertung des Lungenparenchyms. Dieses stellte sich im gesunden Gewebe als dünne Septen dar (s. A und B in Abb. 26); im fibrotischen Gewebe waren die Lungensepten verdickt bzw. nicht mehr als solche erkennbar (s. C-F in Abb. 26). Es zeigte sich, dass das gesunde Donorgewebe ein deutlich stärkeres Adiponektinsignal aufwies als die fibrotischen Gewebe. Der Unterschied zwischen Donor- und IPF-Kollektiv war statistisch signifikant ($p < 0,0001$).

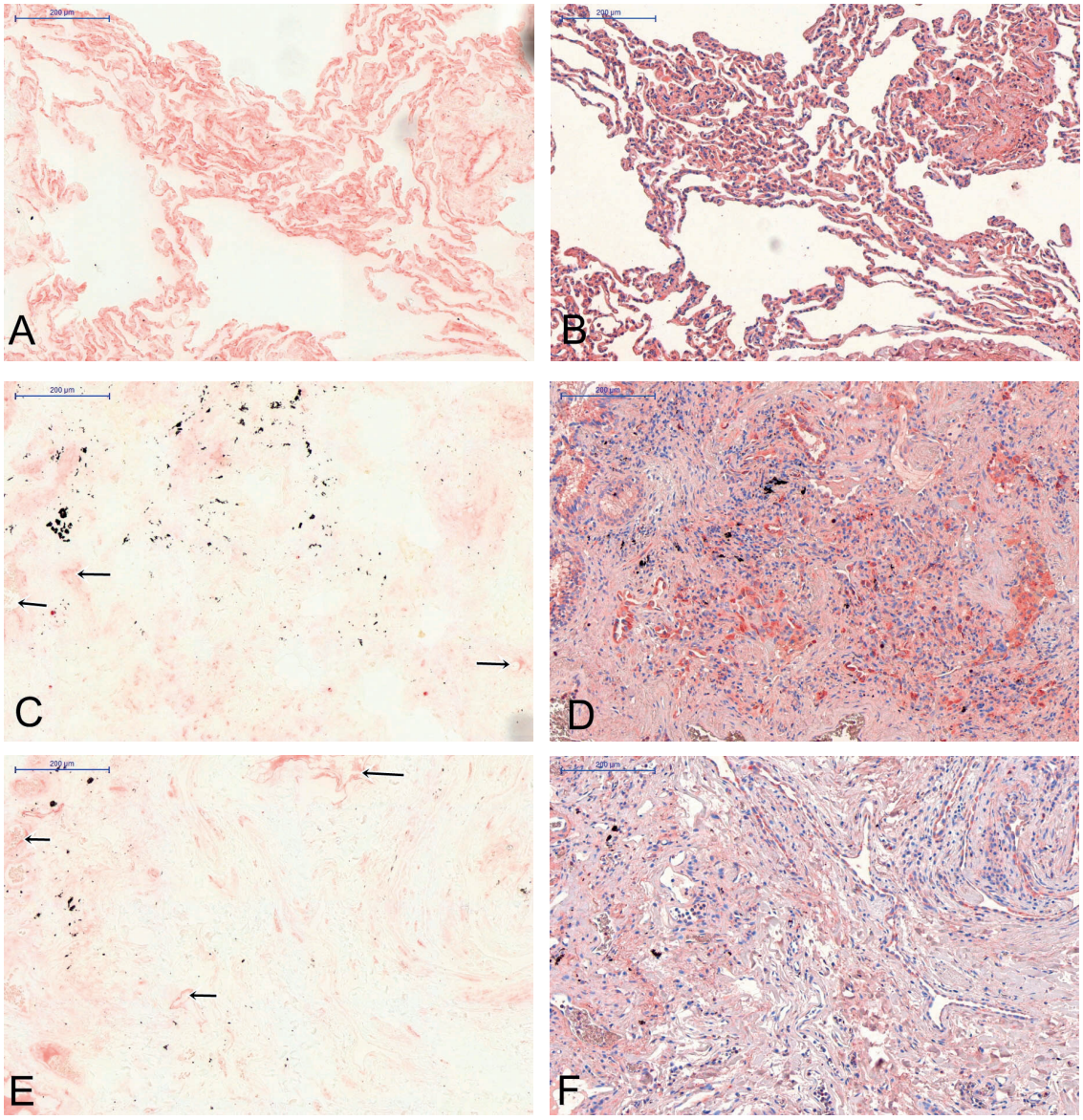


Abbildung 26: Expression von Adiponektin im Parenchym gesunder und fibrotischer Lungen. Gezeigt sind immunhistochemische Adiponektinfärbungen (A,C,E) sowie die entsprechenden Surfactant Protein-C Färbungen mit Hämatoxylin-Kernfärbung (B,D,F) zur anatomischen Zuordnung. Das gesunde Parenchym der Donorgruppe (A,B) wies eine starke Adiponektinexpression auf, die sich nicht nur im Bereich der Gefäße, sondern auch regelmäßig in den Lungensepten darstellte. Im Gegensatz dazu wiesen die fibrotischen Lungen aus dem IPF- (C,D) und SSc-Kollektiv (E,F) eine nur schwache Adiponektinexpression auf. Das Adiponektinsignal im fibrotischen Gewebe fand sich vorwiegend im Bereich der Gefäße (siehe Pfeile in C und E).

3.2.2 Resistin

Die immunhistochemischen Resistinfärbungen des Lungengewebes stellten sich im Gegensatz zu denen der Magenwand anders dar. Ein Resistinsignal ließ sich in der Lunge vorwiegend zellassoziiert nachweisen, wobei die Zellkerne die höchste Signalintensität aufwiesen. Dabei ließen sich verschiedene Resistin-positive Zellgruppen finden: Immunzellen wie Granulozyten oder Lymphozyten exprimierten Resistin und konnten sowohl innerhalb der angeschnittenen Gefäße als auch im Bereich des Lungenparenchyms selbst oder innerhalb lymphozytärer Infiltrate gefunden werden. Darüber hinaus zeigte sich in Bronchialepithelzellen und auch im Alveolarepithel ein positives Resistinsignal. In der Gefäßwand größerer Lungengefäße ließen sich vereinzelt Resistin-positive Zellen nachweisen. Weiterhin ließen sich in den Geweben verschiedene Signalintensitäten beobachten: Einige Zellkerne färbten sich sehr stark an, wohingegen andere ein mittelstarkes Signal aufwiesen. Wie bei den Adiponektinfärbungen wurden verschiedene anatomische Kompartimente hinsichtlich ihrer Resistinexpression bewertet: Das Bronchialepithel, die Gefäßwand sowie das Lungenparenchym. Weiterhin erfolgte eine Beurteilung hinsichtlich der Anzahl Resistin-positiver Immunzellinfiltrate. Die Resultate der semiquantitativen Auswertung sind in Tab. 19 aufgeführt sowie in den Abb. 27-29 dargestellt. Zuerst wurden die Gewebe hinsichtlich ihrer allgemeinen Resistinexpression bewertet. Dabei fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen fibrotischen und gesunden Lungenproben. Alle Gewebe zeigten eine meist mittelstarke Resistinexpression. Dabei waren die Mittelwerte von SSc- und Donorgruppe (2,5 bzw. 2,43) etwas höher als in der IPF-Gruppe (1,88).

Tabelle 19: Expression von Resistin im Lungengewebe unter Berücksichtigung der anatomischen Bereiche. Aufgeführt sind jeweils Median und Mittelwert mit Standardfehler im Rahmen des semiquantitativen Scorings (Score 0 = keine Färbung bis Score 3 = starke Färbung). [1] Aufgrund der geringen Stichprobengröße in der SSc-Gruppe bezieht sich der p-Wert auf die statistische Signifikanz zwischen Donor- und IPF-Kollektiv.

		Donor	IPF	SSc	p-Wert[1]
generelle Resistinexpression	Median Mittelwert (+/- SEM)	2,0 2,43 (+/- 0,20)	2,0 1,88 (+/- 0,13)	-- 2,5 (+/- 0,0)	0,051
Resistinexpression Bronchialepithel	Median Mittelwert (+/- SEM)	2,5 2,38 (+/- 0,26)	2,0 2,25 (+/- 0,25)	-- 2,5 (+/- 0,0)	0,886
Resistinexpression Gefäßwand	Median Mittelwert (+/- SEM)	1,0 1,38 (+/- 0,18)	1,0 0,88 (+/- 0,13)	-- 1,0 (+/- 0,0)	0,123
Resistinexpression Parenchym	Median Mittelwert (+/- SEM)	2,5 2,34 (+/- 0,26)	1,5 1,63 (+/- 0,26)	-- 2,0 (+/- 0,0)	0,123
Vorhandensein Resistin-positiver Infiltrate	Anzahl (in %)	1 von 7 (14%)	6 von 8 (75%)	2 von 2 (100%)	0,019*

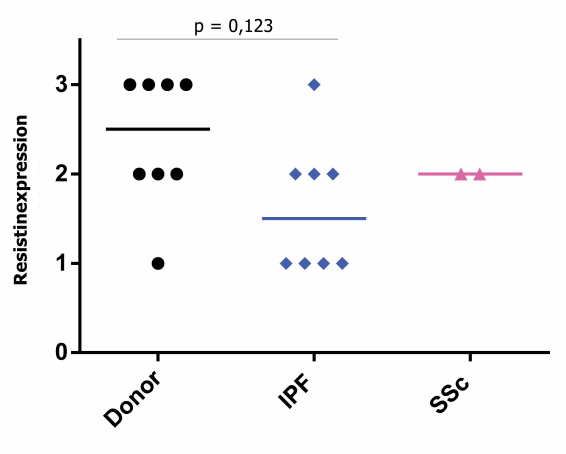


Abbildung 27: **Expression von Resistin im Lungenparenchym.** Abgebildet ist die Verteilung der semiquantitativen Scores als einzelne Punkte sowie der Median als Linie. Dabei war der Score in der Donorgruppe am höchsten (Median 2,5), gefolgt von der SSc-Gruppe (Median 2) und der IPF-Gruppe (Median 1,5). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde jedoch nicht erreicht (p = 0,123).

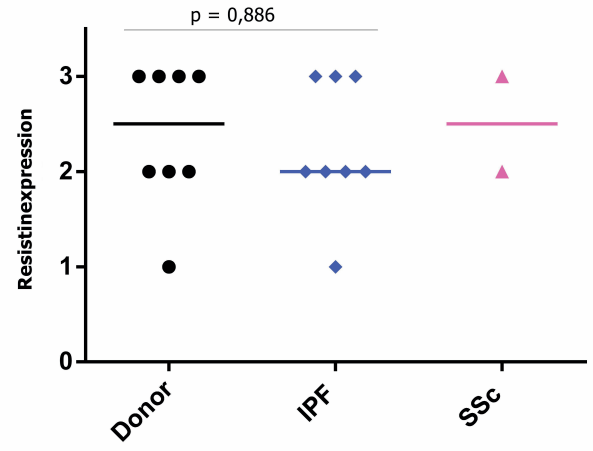


Abbildung 28: **Expression von Resistin im Bronchialepithel**. Abgebildet ist die Verteilung der semiquantitativen Scores als einzelne Punkte sowie der Median als Linie. Alle drei Kollektive zeigten eine mittelstarke bis starke Resistin-expression im Bronchialepithel. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen IPF- und Donorgruppe (p = 0,886).

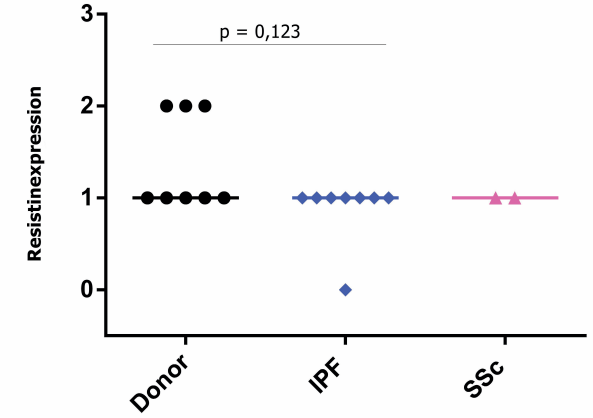


Abbildung 29: **Expression von Resistin in der Gefäßwand**. Abgebildet ist die Verteilung der semiquantitativen Scores als einzelne Punkte sowie der Median als Linie. Alle drei Kollektive zeigten ein geringes bis höchstens mittelstarkes Resistinsignal im Bereich der Gefäßwand. Dabei war der Mittelwert in der Donorgruppe am höchsten, eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht (p = 0,123).

Die Resistinexpression im Lungenparenchym stellte sich zellassoziiert dar: Das Donorgewebe zeigte im Schnitt eine etwas stärkere Resistinexpression als SSc- und IPF-Gewebe, eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht (s. Tab. 19). Die Mittelwerte lagen bei 2,34 im Donorkollektiv und bei 2,0 im SSc- bzw. bei 1,63 im IPF-Kollektiv. Im gesunden Lungenparenchym stellte sich die Resistinexpression regelmäßig und zellassoziiert dar. Im fibrotischen Parenchym gab es einerseits bindegewebige Bereiche mit nur sehr wenigen Resistin-positiven Zellen, andererseits ließen sich sowohl im IPF- als auch im SSc-Kollektiv Resistin-positive Immunzellinfiltrate nachweisen, die in der Donorgruppe bis auf eine Ausnahme nicht nachweisbar waren (s. Abb 30).

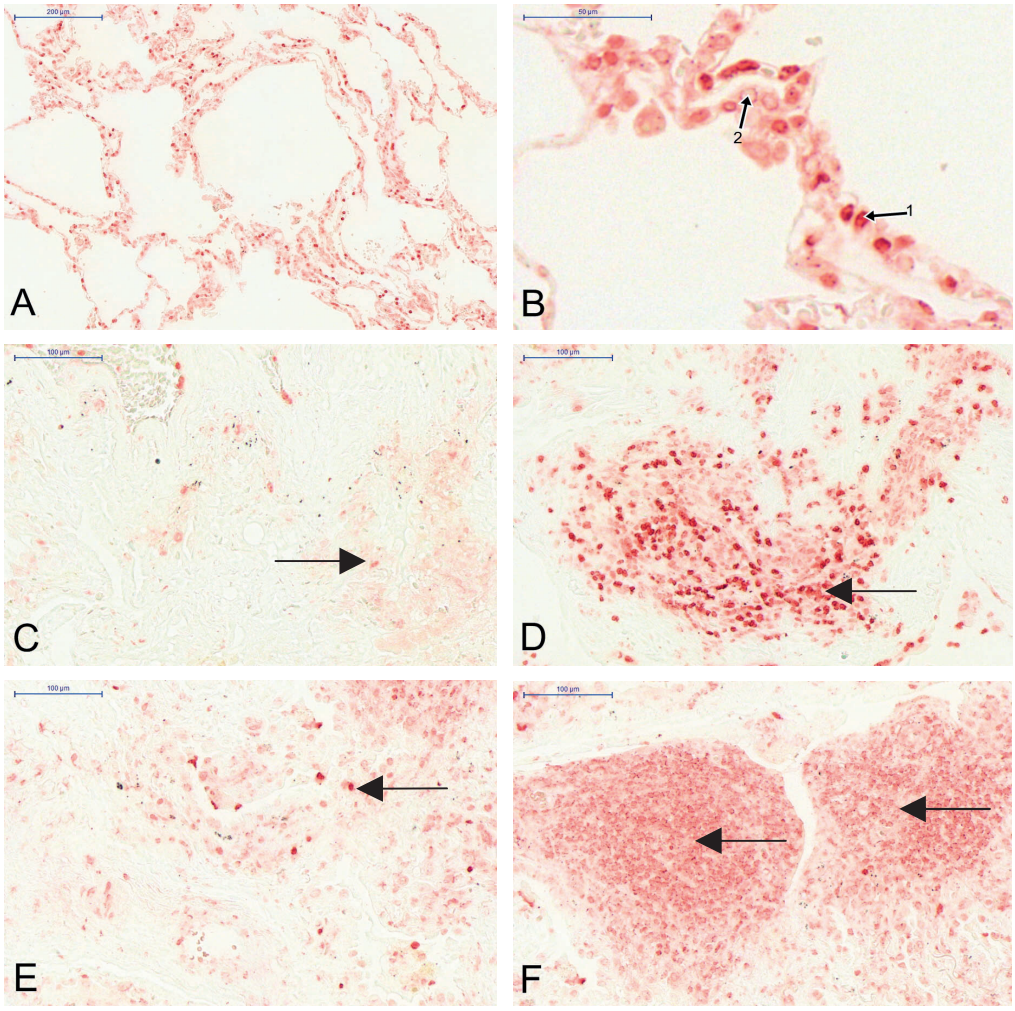


Abbildung 30: Expression von Resistin in gesunden und fibrotischen Lungen. Gezeigt sind immunhistochemische Resistinfärbungen von Donorgewebe (A,B) sowie IPF- (C,D) und SSc-Gewebe (E,F). Das gesunde Parenchym der Donorgruppe (A: Übersicht, B: Vergrößerung) wies eine regelmäßige, zellassoziierte Resistinexpression auf. Dabei ließen sich sowohl Zellen mit starkem Resistinsignal (s. Pfeil 1) als auch solche mit weniger starkem Resistinsignal (s. Pfeil 2) nachweisen. Im Gegensatz dazu wiesen die fibrotischen Lungen aus dem IPF- (C,D) und SSc-Kollektiv (E,F) eine unregelmäßige Färbung auf: Fibrotische Areale (C und E) zeigten nur wenige Resistin-postive Zellen (beispielhaft mit Pfeilen markiert). In den fibrotischen Geweben (D und F) zeigten sich jedoch auch Infiltrate mit Resistin-positiven Zellen (siehe Pfeile).

Epitheliale Zellen des Bronchialsystems zeigten in allen Geweben ein regelmäßig vorhandenes, mittleres bis starkes Resistinsignal. Dabei war der Mittelwert in der SSc-Gruppe (2,5) am höchsten, gefolgt von Donor- (2,38) und IPF-Gruppe (2,25). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen IPF- und Donorgruppe ($p = 0,886$) (siehe Abb. 28). Die Zellen des Bronchialepithels selbst zeigten eine Resistinexpression, die sich vorwiegend im Zellkern befand (s. Abb. 31).

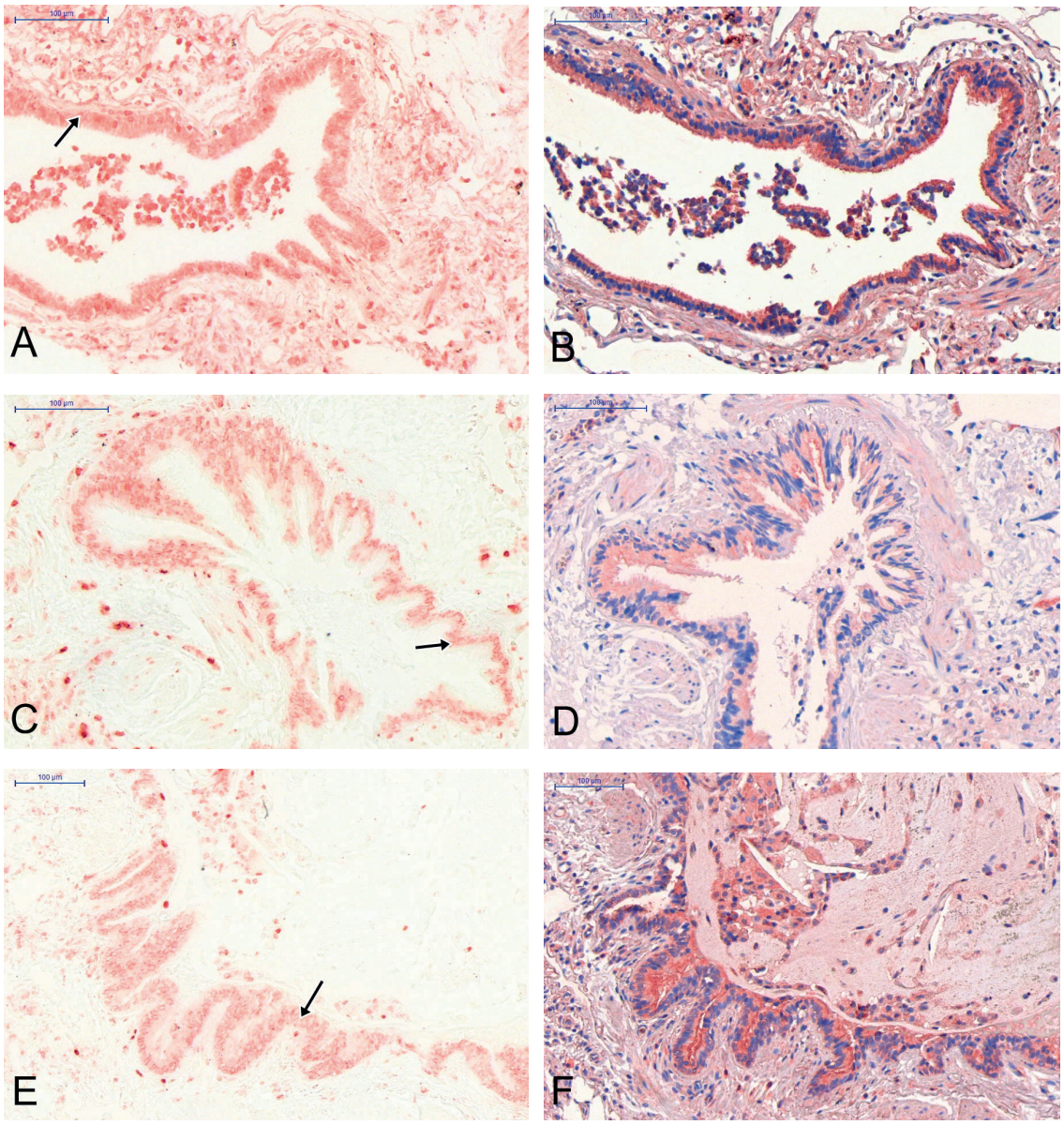


Abbildung 31: Expression von Resistin im Bronchialepithel. Gezeigt sind immunhistochemische Resistinfärbungen (A,C,E) sowie die entsprechenden Surfactant Protein-C Färbungen mit Hämatoxylin-Kernfärbung (B,D,F) zur anatomischen Zuordnung. Das Bronchialepithel in den Resistinfärbungen ist jeweils mit einem Pfeil markiert. Sowohl Donorgewebe (A und B) als auch IPF- (C und D) und SSc-Gewebe (E und F) zeigten eine regelmäßige, mittlere bis starke Resistinexpression.

In den Gefäßwänden größerer Lungengefäße ließen sich in allen drei Patientenkollektiven Resistin-positive Zellen nachweisen. Die Färbung stellte sich als schwach bis mittelstark dar und war auch in Zellkernen lokalisiert. Diese stellten sich oftmals spindelförmig dar (siehe Bild B in Abb. 32). Dabei war der Mittelwert in der Donorgruppe am höchsten (1,38), gefolgt von SSc- (1,0) und IPF-Gruppe (0,88). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (p = 0,123).

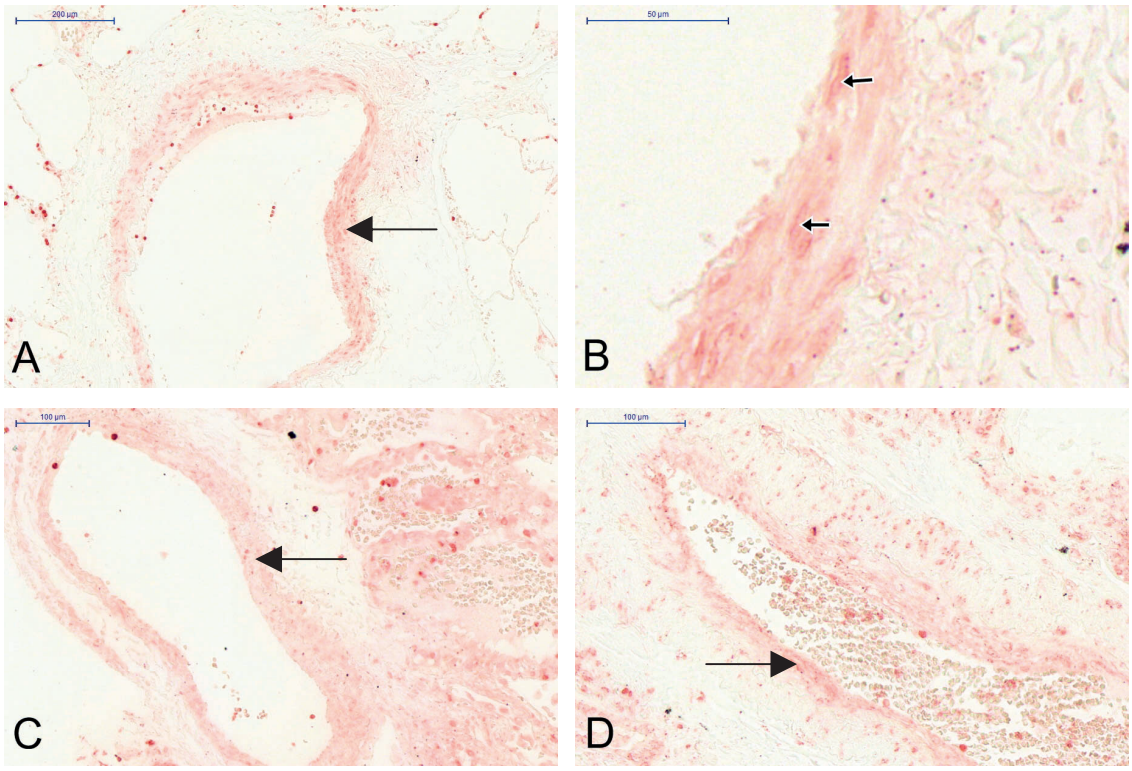


Abbildung 32: Expression von Resistin in der Gefäßwand größerer Lungengefäße. Gezeigt sind immunhistochemische Resistinfärbungen von Donor- und IPF- und SSc-Kollektiv. In (B) wurden die angefärbten Zellkerne mit kleinen Pfeilen markiert, in (A), (C) und (D) wurden die Gefäßwände mit einem großen Pfeil markiert. Sowohl Donorgewebe (A und B) als auch IPF- (C) und SSc-Kollektiv (D) zeigten eine regelmäßige, schwache bis mittlere Resistinexpression.

3.2.3 Visfatin

Die immunhistochemischen Visfatinfärbungen des Lungengewebes stellten sich ähnlich den Resistinfärbungen dar. Visfatin ließ sich zellassoziiert nachweisen, war jedoch nicht auf den Zellkern beschränkt, sondern fand sich bei einigen Zellen auch im Zytoplasma. Es ließen sich in allen Patientenkollektiven Visfatin-positive Zellen nachweisen. Dabei zeigten die epithelialen Zellen des Bronchialsystems ein starkes Visfatinsignal, welches sich in seiner stärksten Ausprägung im Bereich der Flimmerhärchen (Kinozilien) befand. Weiterhin färbten sich Immunzellen wie Leukozyten Visfatin-positiv an. Diese ließen sich sowohl innerhalb der angeschnittenen Gefäße finden, als auch vereinzelt im Bereich des Lungenparenchyms oder, wenn vorhanden, in Entzündungszellinfiltraten. Im Bereich der Gefäßwand ließ sich in allen Kollektiven ein nur schwaches Visfatinsignal nachweisen. Die Resultate der semiquantitativen Auswertung sind in der unten stehenden Tab. 20 dargestellt. Zunächst wurden die Gewebe hinsichtlich ihrer allgemeinen Visfatinexpression bewertet. Dabei fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen fibrotischen und gesunden Lungenproben. Alle Gewebe zeigten eine mittelstarke (Score 2) oder starke (Score 3) Visfatinexpression. Dabei lagen die Mittelwerte bei 2,38 (IPF-Gruppe), 2,14 (Donorgruppe) bzw. 2,0 (SSc-Gruppe).

Tabelle 20: Expression von Visfatin im Lungengewebe unter Berücksichtigung der einzelnen anatomischen Bereiche. Aufgeführt sind jeweils Median und Mittelwert mit Standardfehler im Rahmen des semiquantitativen Scorings (Score 0 = keine Färbung bis Score 3 = starke Färbung). [1]Aufgrund der geringen Stichprobengröße in der SSc-Gruppe bezieht sich der p-Wert auf die statistische Signifikanz zwischen Donor- und IPF-Kollektiv.

		Donor	IPF	SSc	p-Wert[1]
generelle Visfatinexpression	Median	2,0	2,0	--	0,569
	Mittelwert (+/- SEM)	2,14 (+/- 0,20)	2,38 (+/- 0,13)	2,0 (+/- 0,0)	
Visfatinexpression Bronchialepithel	Median	2,5	2,0	--	0,569
	Mittelwert (+/- SEM)	2,38 (+/- 0,14)	2,25 (+/- 0,18)	2,5 (+/- 0,0)	
Visfatinexpression Gefäßwand	Median	1,0	1,0	--	> 0.999
	Mittelwert (+/- SEM)	1,0 (+/- 0,0)	1,0 (+/- 0,0	1,0 (+/- 0,0)	
Visfatinexpression Parenchym	Median	2,0	2,0	--	0,569
	Mittelwert (+/- SEM)	2,14 (+/- 0,14)	2,38 (+/- 0,18)	2,0 (+/- 0,0)	
Vorhandensein Visfatin-positiver Infiltrate	Anzahl (in %)	0 von 7 (0%)	8 von 8 (100%)	2 von 2 (100%)	0,019*

Im Lungenparenchym zeigten alle Gewebe eine mittelstarke bis starke Visfatinexpression. Dabei färbten sich im Donorgewebe regelmäßig einzelne Immun- und Epithelzellen positiv an. In den fibrotischen Geweben von IPF- und SSc-Kollektiv zeigte sich eine inhomogene Verteilung des Visfatinsignals: Bindegewebig umgebaute Bereiche wiesen nur vereinzelt Visfatin-exprimierende Zellen auf und zeigten insgesamt ein schwaches Signal, zusätzlich gab es auch Entzündungszellinfiltrate, die ein starkes Visfatinsignal aufwiesen (s. Abb. 33). Bei der Auswertung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Donor- und IPF-Kollektiv (p = 0,569) (s. Abb.34).

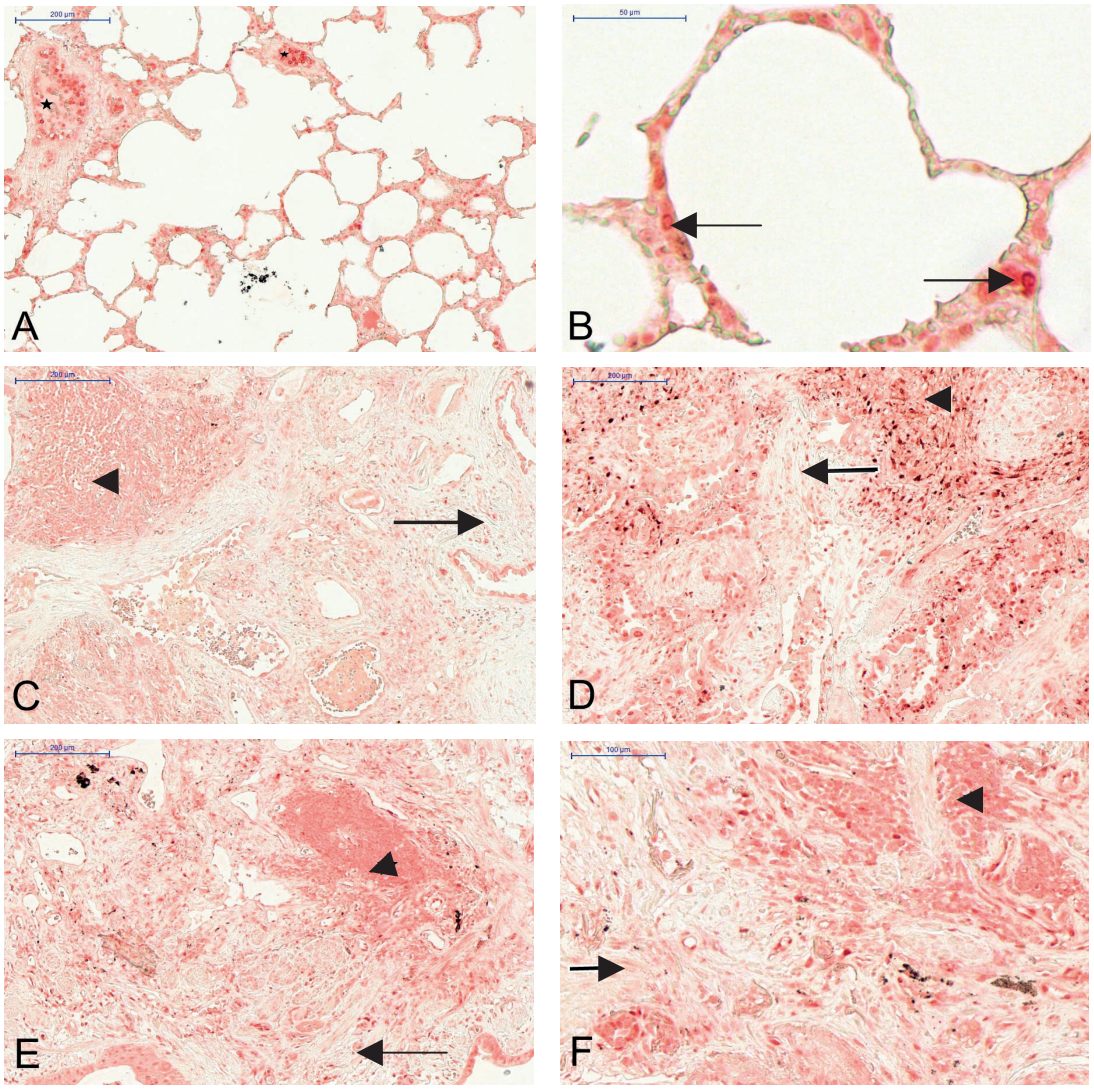


Abbildung 33: Expression von Visfatin in gesunden und fibrotischen Lungen. Gezeigt sind immunhistochemische Visfatinfärbungen von Donor- (A,B) sowie IPF- (C,D) und SSc-Gewebe (E,F). Das gesunde Parenchym der Donorgruppe (A: Übersicht, B: Vergrößerung) wies eine regelmäßige Visfatinexpression auf. Immunzellen färbten sich stark Visfatin-positiv an (Gefäße in Bild A sind mit einem Stern, Visfatin-positive Zellen in Bild B beispielhaft mit einem Pfeil markiert). Im Gegensatz dazu wiesen die fibrotischen Gewebe aus dem IPF- (C,D) und SSc-Kollektiv (E,F) eine unregelmäßige Färbung auf: Bindegewebige Areale (siehe Pfeile in C,D,E und F) zeigten nur wenige Visfatin-postive Zellen. In den gleichen Geweben zeigten sich jedoch auch Infiltrate Visfatin-positiver Zellen (Pfeilköpfe in C,D,E und F).

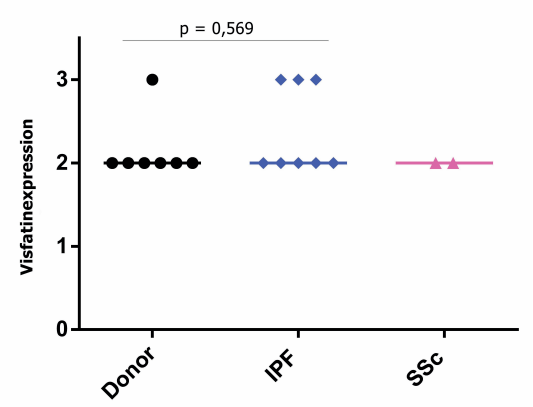


Abbildung 34: Expression von Visfatin im Lungengewebe. Abgebildet ist die Verteilung der semiquantitativen Scores als einzelne Punkte sowie der Median als Linie. Alle Kollektive zeigten eine mittelstarke oder starke Visfatinexpression. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen IPF- und Donorgruppe nachweisen (p = 0,569).

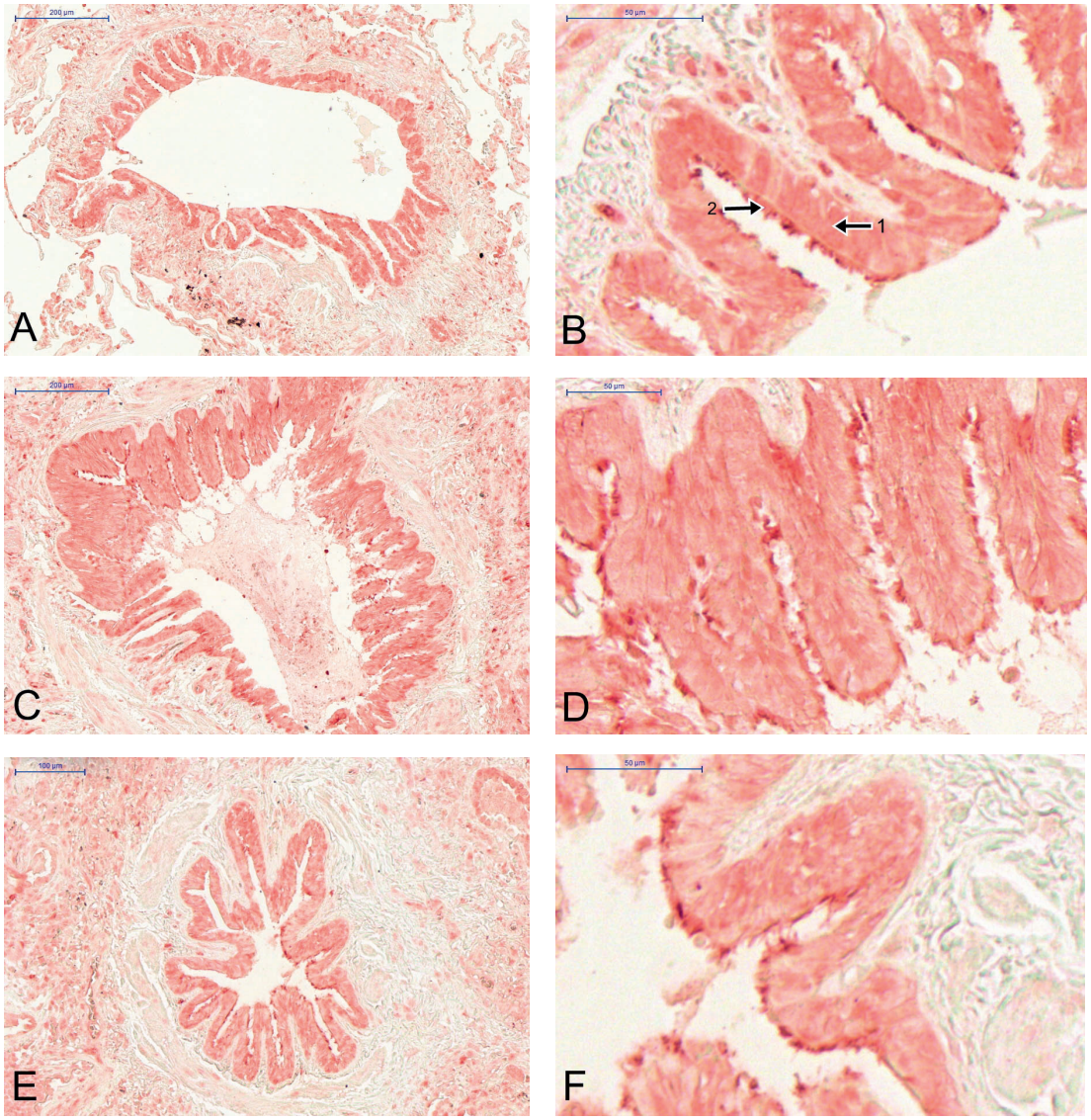


Abbildung 35: Expression von Visfatin im Bronchialepithel. Gezeigt sind immunhistochemische Visfatinfärbungen von Donorgewebe (A,B) sowie IPF- (C,D) und SSc-Gewebe (E,F). Links ist jeweils eine Übersichtsaufnahme dargestellt, rechts eine vergrößerter Abschnitt daraus. Alle Gewebe zeigten eine starke Visfatinexpression im Bereich der Bronchialepithelzellen (Pfeil 1 in B) und der Flimmerhärchen (Pfeil 2 in B).

Die stärkste Visfatinexpression fand sich in allen Patientenkollektiven im Bronchialepithel. Dabei färbten sich die epithelialen Zellen selbst diffus an, die Färbung war also nicht, wie in den Resistinfärbungen, auf den Zellkern konzentriert. Auch die Flimmerhärchen (Kinozilien) zeigten eine regelmäßige, starke Färbung (s. Abb. 35). Die Mittelwerte lagen bei 2,5 bei der SSc-Gruppe, bei 2,38 bei der Donorgruppe bzw. bei 2,25 bei der IPF-Gruppe (s. Tab. 20). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,569$). Weiterhin wurde auch die Gefäßwand größerer Lungengefäße hinsichtlich ihrer Visfatinexpression beurteilt. Alle Patientenkollektive zeigten ein schwaches Visfatinsignal im Bereich der Gefäßwand. Die Mittelwerte lagen in allen Gruppen bei 1,0. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p > 0,999$).

3.2.4 Vergleich und Kolokalisation der pulmonalen Adipokinexpression

Beim Vergleich der verschiedenen Adipokinfärbungen untereinander fiel auf, dass es Überschneidungen der Lokalisation von Resistin und Visfatin gab. Die Adiponektinexpression wies ein anderes Färbemuster auf. Im gesunden Donorgewebe ließ sich eine im Schnitt mittlere bis starke Expression aller drei Adipokine nachweisen. Die fibrotischen Gewebe der IPF- und SSc-Schnitte zeigten ebenfalls eine im Schnitt mittlere bis starke Resistin- und Visfatinexpression, jedoch ließ sich nur ein schwaches Adiponektinsignal nachweisen. Die Mittelwerte des semiquantitativen Scorings sind für alle ausgewerteten Bereiche in Tabelle 21 als Übersicht dargestellt.

Tabelle 21: Expression der verschiedenen Adipokine in den Lungengeweben. Gezeigt sind die Mittelwerte des semiquantitativen Scorings der Adiponektin-, Resistin- und Visfatinfärbungen von Donor-, IPF- und SSc-Gewebe in den verschiedenen Kompartimenten.

	Adiponektin	Resistin	Visfatin
Donor			
generelle Färbung	2,75	2,43	2,14
Bronchialepithel	0,5	2,38	2,38
Gefäßwand	2,38	1,38	1,0
Parenchym	2,75	2,34	2,14
IPF			
generelle Färbung	1,10	1,88	2,38
Bronchialepithel	0,63	2,25	2,25
Gefäßwand	1,75	0,88	1,0
Parenchym	1,0	1,63	2,38
SSc			
generelle Färbung	1,0	2,5	2,0
Bronchialepithel	1,0	2,5	2,5
Gefäßwand	1,5	1,0	1,0
Parenchym	1,0	2,0	2,0

Betrachtet man die Adipokinexpression in der Gefäßwand, zeigte sich in allen Gewebeschnitten ein nur schwaches Resistin- und Visfatinsignal. Dabei waren in den Resistinschnitten vor allem einzelne Zellen in der Gefäßwand gefärbt, die Visfatinfärbung stellte sich hier nicht zellassoziiert dar, sondern homogen über die gesamte Gefäßwand verteilt. Die Gefäße wiesen hingegen bei den Adiponektingeweben im Schnitt das stärkste Signal auf. Hierbei war die Diskrepanz in der Donorgruppe am höchsten, da das Adiponektinsignal hier durchgehend eine mittelstarke bis starke Ausprägung zeigte (s. Abb. 36).

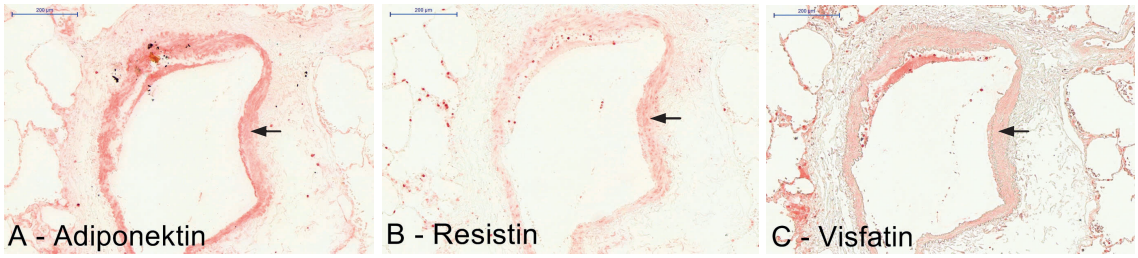


Abbildung 36: Vergleich der Expression von Adiponektin, Resistin und Visfatin in der Gefäßwand. Beispielhaft gezeigt sind die immunhistochemischen Schnitte eines großen Gefäßes aus dem Donorkollektiv. Die Gefäßwand ist jeweils mit einem Pfeil markiert. Adiponektin wurde stärker exprimiert als Resistin und Visfatin. Verwendet wurden serielle Schnitte.

Beim Vergleich der Adipokinexpression im Bronchialepithel ließen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede im Färbemuster nachweisen. Zunächst ließ sich feststellen, dass die Expression von Adiponektin im Bronchialepithel in allen Geweben schwach war und sich die stärkste Ausprägung in den Flimmerhärchen fand. Im Gegensatz dazu zeigten die Visfatin- und Resistin-gefärbten Gewebe ein starkes Signal im Bereich des Bronchialepithels, welches in allen Geweben gleichermaßen nachgewiesen wurde. Dabei wurde Resistin vor allem im Bereich des Zellkerns nachgewiesen, jedoch nicht im Bereich der Flimmerhärchen. Visfatin zeigte eine meist starke Färbung sowohl der Zellen selbst als auch im Bereich der Flimmerhärchen (s. Abb. 37).

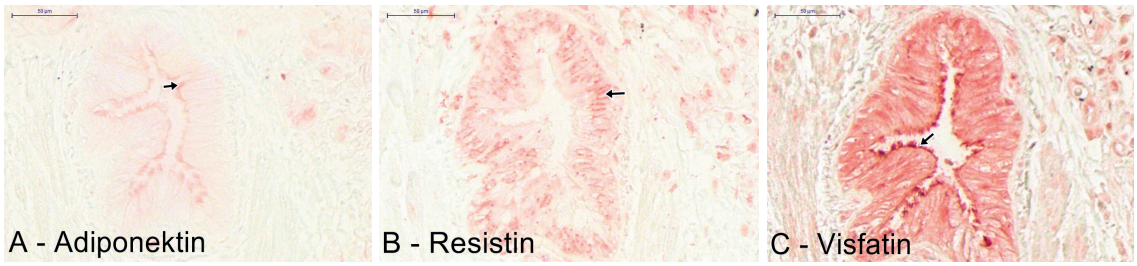


Abbildung 37: Vergleich der Expression von Adiponektin, Resistin und Visfatin im Bronchialepithel. Dargestellt ist beispielhaft ein Bronchus aus einem SSc-Gewebe in seriellen Schnitten. Dabei zeigt die Adiponektinfärbung das schwächste Signal, welches sich häufig nur in den Flimmerhärchen (Pfeil in A) fand. Resistin und Visfatin wurde mittelstark bis stark von dem Epithel exprimiert: Ein positives Resistinsignal zeigte sich vor allem im Bereich der Zellkerne (Pfeil in B); die Visfatinschnitte zeigten sowohl eine Färbung der Zellen als auch der Flimmerhärchen (Pfeil in C). Dieses Muster ließ sich für die verschiedenen Gewebe gleichermaßen nachweisen.

Im Bereich des Parenchyms zeigten alle Gewebe eine im Schnitt mittelstarke Expression der Adipokine Visfatin und Resistin. Adiponektin wurde von der Donorgruppe mittelstark bis stark exprimiert, wohingegen die IPF- und SSc-Gewebe nur ein schwaches Adiponektinsignal aufwiesen (siehe Tab. 21). In den fibrotischen Geweben ließen sich, im Gegensatz zum Donorkollektiv, Entzündungszellinfiltrate nachweisen. Diese wiesen eine mittlere bis starke Resistin- und Visfatinexpression auf, waren jedoch Adiponektin-negativ (siehe Abb. 38).

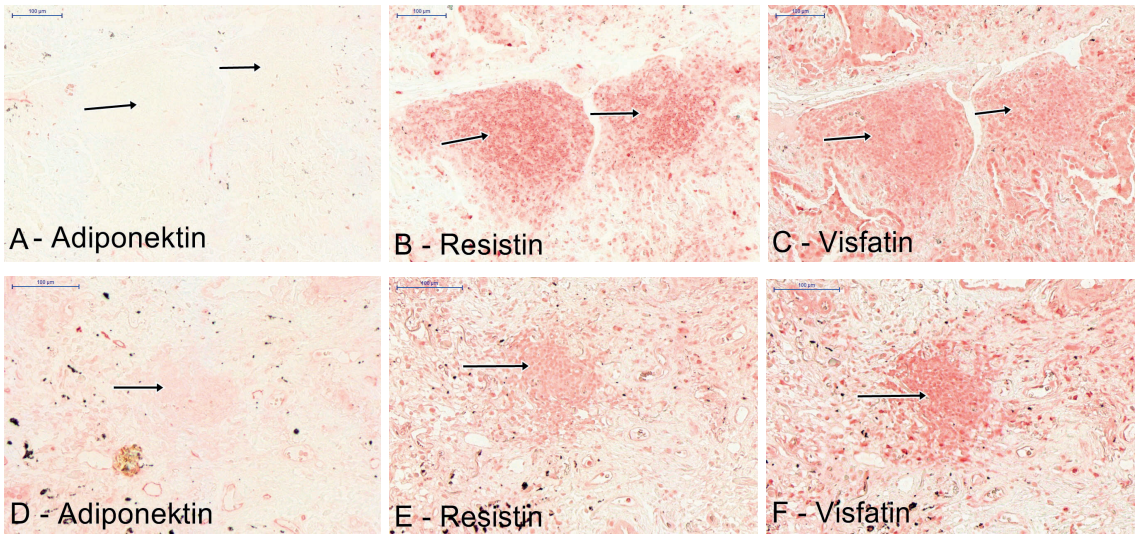


Abbildung 38: Darstellung von Entzündungszellinfiltraten im IPF- und SSc-Gewebe. Gezeigt sind jeweils die gleichen Infiltrate in den unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen. Die Infiltrate im SSc-Gewebe (A-C) zeigten eine positive Resistin- (B) und Visfatinexpression (C), ein Adiponektinsignal ließ sich nicht nachweisen (A). Auch im IPF-Gewebe zeigte sich ein positives Signal für Resistin (E) und Visfatin (F), jedoch nicht für Adiponektin (A). Die Infiltrate sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methodik

Die systemische Sklerose gehört zu den seltenen Erkrankungen. Auf Grund dessen ist es in der Regel schwieriger als bei anderen Erkrankungen, Studien mit einem großen Patientenkollektiv durchzuführen, da nur eine sehr begrenzte Zahl an Patienten existiert. Auf Grund des Ziels der Arbeit einer Analyse der organbezogenen Expression verschiedener Immunzellrezeptoren und Adipokinen in beteiligten Magen- und Lungengeweben in Verbindung mit der Notwendigkeit einer invasiven Probengewinnung wird das Patientenkollektiv weiter limitiert. Insbesondere die Probengewinnung der durch die systemische Sklerose bedingte interstitielle Lungenerkrankung ist anspruchsvoll. Dies auch auf Grund der Tatsache, dass für eine Diagnosestellung heutzutage eine Lungenbiopsie nicht mehr zwingend notwendig ist, sondern in vielen Fällen über eine HRCT gestellt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Lungenschnitte von Patienten mit systemischer Sklerose stammten von zwei Patienten, die einer Lungentransplantation zugeführt wurden, also bereits in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium waren. Neben den SSc-Patienten und dem gesunden Kontrollkollektiv (Donorpatienten für Lungentransplantationen) wurde bei der Lungenprobenauswertung ein drittes Kollektiv eingeschlossen – das der idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF). Diese Lungenproben wurden über Lungenbiopsien gewonnen, die zur Diagnosesicherung durchgeführt wurden. Dadurch wurde bei der IPF eine Kollektivgröße erreicht, die mit dem gesunden Kontrollkollektiv auf dem Boden einer statistischen Auswertung verglichen werden konnte. Allerdings konnten die Befunde, die im Kollektiv der systemischen Sklerose erhoben wurden, auf Grund der geringen Kollektivgröße (n = 2) keiner statistischen Auswertung zugeführt werden. Dadurch ist die Aussagekraft in Bezug auf die sytemische Sklerose limitiert. Durch die Miteinbeziehung der IPF konnte jedoch ein Vergleich zwischen fibrotischem und gesundem Lungengewebe erfolgen.

Die Gewinnung von Magenproben gestaltet sich nicht so schwierig wie die Gewinnung von Lungenproben, da eine Gastroskopie deutlich weniger invasiv ist als eine Lungenbiopsie. Aber auch hier besteht das Problem der limitierten Zahl an SSc-Patienten. Um ausreichende Fallzahlen für eine statistische Auswertung zu erhalten, wurden alle vorhandenen SSc-Proben gleichermaßen in das SSc-Kollektiv aufgenommen, unabhängig davon, welche Form der Erkrankung bestand. Über eine weitere Subspezifizierung des SSc-Kollektivs wäre eine Interpretation der Ergebnisse

dieser Arbeit in Bezug auf Krankheitsform und –dauer möglich gewesen, allerdings wurde dies auf Grund der kleinen Stichprobengröße nicht durchgeführt. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die Magenproben über Zangenbiopsien im Rahmen einer Gastroskopie entnommen wurden. Über eine Zangenbiopsie ist lediglich das Gewebe der Mukosa- und in den meisten Fällen auch der Submukosaschicht zugänglich, jedoch können tiefere Schichten, wie zum Beispiel die Tunika muscularis oder die bindegewebige Adventitia, wegen der Perforationsgefahr nicht erfasst werden. Auf Grund dessen beschränken sich die erhobenen Ergebnisse auf die Mukosa- und Submukosaschicht, wohl wissend, dass im Fall eines fibrotischen Umbaus vermutlich auch die tieferen Schichten betroffen sein würden, die jedoch hier nicht beurteilt werden können. Zudem wurden bei den meisten Patienten Proben aus Magenantrum und -corpus verwendet, so dass ein eventueller Unterschied zwischen diesen beiden Regionen nicht erfasst werden konnte. Da alle Patienten auf Grund einer klinischen Beschwerdesymptomatik einer Gastroskopie zugeführt wurden, welche im SSc-Kollektiv u.a. aus gastroösophagealem Reflux oder einer Dysphagie bestand, waren vermutlich bei diesen Patienten bereits fibrotische Veränderungen vorhanden.

Eine weitere Limitation der Studie entstand durch die angewandten histologischen Techniken. Für die Magenproben wurden Gefrierschnitte verwendet, die nicht die gleiche hohe Qualität aufweisen wie Paraffinschnitte. Für die immunhistochemischen Färbungen der Immunzellmarker CD4, CD8 und CD68 ließen sich gut auswertbare Ergebnisse erzielen. Die immunhistochemischen Adipokinfärbungen ließen nur eine Beurteilung dahingehend zu, ob eine Färbung vorlag oder nicht. Die unterschiedlich gute Auswertbarkeit von Adipokinen und Immunzellmarkern in den Gefrierschnitten kommt dadurch zustande, dass sich Immunzellmarker auf der Oberfläche der Zellen befinden, im Gegensatz dazu Adipokine sezerniert werden, also sehr schnell aus den Zellen freigesetzt werden. Die Bewertung der einzelnen anatomischen Kompartimente in den Magenschnitten gestaltete sich schwerer als die der Lungenschnitte. Durch die exzellente Qualität der Paraffinschnitte der Lungengewebe konnte hier die Beurteilung leicht erfolgen und die immunhistochemischen Färbungen konnten bestimmten Arealen oder sogar einzelnen Zellen auf Grund deren Morphologie zugeordnet werden.

Die Auswertung erfolgte quantitativ, qualitativ oder semiquantitativ. Für die Auswertung der Immunzellfärbungen wurden repräsentative Kästchen in zuvor definierte Bereiche gesetzt, die alle Bereiche der Gewebeschnitte gleichermaßen abdecken sollten. Durch die willkürliche Auswahl bestimmter Bereiche, auch wenn diese kategorisiert waren, und anschließender manueller Auszählung, konnte nicht die gleiche Neutralität vorherrschen wie bei einer automatisierten Auszählung mit einem computerbasierten Programm. Auch könnte es bei einem zufälligen Setzen der Felder ohne

Berücksichtigung von Infiltraten sowie Mukosa- oder Submukosaschicht zu einem anderen Ergebnis kommen. Durch die qualitative Auswertung der Adipokinfärbungen der Magenschnitte konnte nur die Aussage getroffen werden, ob eine Färbung vorlag oder nicht. Auf Grund der verminderten Qualität war eine weitere Abstufung im Sinne einer semiquantitativen Auswertung hier nicht möglich. So kann eine Verfälschung der Ergebnisse entstanden sein, da alle positiven Färbungen den gleichen Score erhielten. Sowohl die qualitative als auch die semi-quantitative Bewertung unterliegt trotz dem Ziel einer objektiven Auswertung immer subjektiven Einflüssen. Durch die geringe Probenanzahl in den einzelnen Kollektiven wurde in den meisten Fällen keine Normalverteilung erreicht. Auf Grund dessen wurde auf nicht-parametrische Tests zurückgegriffen. Für die Auswertung der quantitativen und semiquantitativen Ergebnisse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, für die qualitativen Ergebnisse der Fisher's exact Test. Trotzdem müssen erreichte und auch nicht erreichte Signifikanzniveaus zurückhaltend interpretiert werden. In Fällen, in welchen das Signifikanzniveau nicht erreicht worden ist, könnte dies an der kleinen Stichprobengröße gelegen haben, oder aber, dass tatsächlich keine Signifikanz existiert. Ein erreichtes Signifikanzniveau muss ebenfalls zurückhaltend interpretiert werden, da auf Grund der wenigen Testparameter auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet wurde. Dadurch wird eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Fehlers 1. Art, d.h. eines falsch positiven Ergebnisses, in Kauf genommen. Jedoch würde es im Gegenzug bei Anwendung einer Korrektur für multiples Testen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 2. Art, d.h. eines falsch negativen Ergebnisses, kommen, so dass eventuell vorhandene Unterschiede zwischen den Kollektiven nicht erkannt werden würden.

Diese Arbeit soll in dem gegebenen Rahmen erste Aufschlüsse über die organbezogene Adipokin- und Immunzellexpression geben. Durch die Veränderung der Diagnosekriterien der SSc könnte eine erhöhte Anzahl von Patienten in frühen Krankheitsstadien in der Zukunft die Diagnose einer SSc erhalten, so dass weitere Forschungsarbeiten mit einem größeren Patientenkollektiv gezielt durchgeführt werden könnten, wie z.B. für Adiponektin.

4.2 Diskussion der Ergebnisse und Bezug zu anderen Studien

4.2.1 Immunzellinfiltration bei der systemischen Sklerose

Nach der Haut ist der Gastrointestinaltrakt das am häufigsten betroffene Organsystem bei der systemischen Sklerose. Ca. 80% aller Patienten leiden unter einer gastrointestinalen Beteiligung, die mit einer hohen Morbidität vergesellschaftet ist und die Lebensqualität nachweislich beeinträchtigen kann [121]. Obwohl nahezu alle SSc-Patienten unter einer gastrointestinalen Beteiligung leiden, sind dazu bisher nur wenige Studien durchgeführt worden.

Der erste Teil dieser Arbeit hat sich mit der Expression verschiedener Immunzellen in der Magenwand von Patienten mit systemischer Sklerose (SSc) mit gastrointestinaler Beteilung beschäftigt. Als Kontrollkollektiv diente eine heterogene Gruppe von Patienten, die allesamt an verschiedenen Formen einer Gastritis litten, jedoch nicht an einer Kollagenose. Das Studiendesign lässt es zu, die Gruppe der SSc-Patienten mit einer anderen, jedoch nicht gesunden, sondern ebenfalls an einer Gastritis erkrankten Gruppe zu vergleichen. Damit konnte der Fragestellung nachgegangen werden, wie sich die SSc von anderen Erkrankungen und die Studie sich von solchen, die ein gesundes Kollektiv als Kontrollgruppe benutzen, unterscheidet. Es erfolgte eine immunhistochemische Anfärbung von $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD68^+$ Zellen, die dann quantitativ ausgewertet wurden. Dabei ließ sich in beiden Gruppen eine Zellinfiltration mit den genannten Immunzellen nachweisen. Die höchsten absoluten Zellzahlen ließen sich in beiden Gruppen für $CD4^+$ Zellen nachweisen, dann folgen $CD8^+$ Zellen und schließlich $CD68^+$ Zellen. Für die Anzahl von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen ließ sich ein beiden Gruppen ein vergleichbarer Wert bestimmt, wohingegen für $CD68^+$ Zellen in der SSc-Gruppe eine signifikant höhere Anzahl vorhanden war.

Da die Infiltration von $CD4^+$ Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der systemischen Sklerose spielt, war von Interesse, ob auch eine erhöhte Anzahl von $CD4^+$ Zellen im Vergleich zu einem ebenfalls entzündlich veränderten Gewebe – das des Gastritis-Kontrollkollektivs – nachweisbar wäre. In beiden Kollektiven ließ sich eine vergleichbar hohe Zahl an $CD4^+$ Zellen darstellen.

Nach Sakkas et. al [122] sind T-Zellen für die Entstehung der systemischen Sklerose von zentraler Bedeutung. Immunzellen, darunter $CD4^+$ T-Helferzellen wandern vor der eigentlichen Fibrosebildung in die von der SSc betroffenen Areale ein und bilden profibrotische Zytokine, vor allem IL-4 und IL-13. Dabei sind insbesondere TH2-Zellen involviert, die über die sezernierten Zytokine entweder direkt oder indirekt eine

profibrotische Aktivität haben. Durch das vorherrschende Zytokinmilieu kommt es zur Makrophagen- und Fibroblastenaktivierung.

Dass T-Helferzellen in der Pathogenese nicht nur in der systemischen Sklerose, sondern auch in anderen Fibroseformen eine wichtige Rolle spielen, ist unbestritten. In einem Ratten-Tiermodell von Westermann et al. [50] konnte gezeigt werden, dass es bei einer Radiatio-bedingten Lungenfibrose nach der Bestrahlung zunächst zur Einwanderung von $CD4^+$ Zellen in das Lungengewebe kommt. Eine vermehrte Bildung von IL-4 konnte nachgewiesen werden, sodass von einer TH2-Antwort ausgegangen wurde. Durch Depletion der $CD4^+$ Zellen konnte die Gewebsdicke der bestrahlten Lungengewebe vermindert werden, die Fibrose also abgeschwächt werden.

Da die $CD4^+$ Zellen in unserer Studie in den anderen Gastritisformen in vergleichbarer Anzahl repräsentiert waren, scheinen sie auch dort eine Rolle in der Pathogenese inne zu haben. In verschiedenen Studien zur Rolle von T-Zellen in der Helicobacter-induzierten Gastritis werden $CD4^+$ Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Aufrechterhaltung der Entzündung zugeschrieben. Im Gegensatz zur SSc sind hier vor allem TH1-Zellen involviert [123]. Dies verdeutlicht, dass das vorherrschende Zytokinmilieu ein wichtiger Faktor der Pathogenese dieser Erkrankungen ist und nicht nur die verschiedenen Immunzellen als solche.

Nach Manetti et al. [124] zeigt sich im Vergleich zwischen SSc-Patienten und gesunden Kontrollen ein erhöhter CD4/CD8-Ratio in der Magenschleimhaut von Antrum und Corpus, welcher sich in unserer Studie ebenfalls bestätigt. Allerdings ist auch das Verhältnis von $CD4^+$ Zellen zu $CD8^+$ Zellen nicht auf die SSc beschränkt, sondern fand sich in dieser Arbeit auch in dem Gastritis-Kontrollkollektiv. In der Studie von Manetti et al. konnten sowohl diffus verteilte als auch in Infiltraten organisierte $CD4^+$ Zellen nachgewiesen werden, was in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Interessant ist, dass in der Studie von Manetti et al. noch keine Veränderungen in der Gefäßarchitektur festzustellen war.

In einer weiteren Studie von Manetti et al. [18] fand sich eine erhöhte Kollagenablagerung in Magenproben von SSc-Patienten. Dabei konnte Kollagen nicht nur um die glatte Muskulatur im Bereich der Tunica muscularis der Magenwand nachgewiesen werden, sondern auch schon in der Lamina propria. Dies lässt vermuten, dass Mechanismen, die die Fibrosereaktion triggern, eventuell schon in der Mukosaschicht entstehen. Diese Studie deckt sich mit unseren Ergebnissen insoweit, dass nicht nur in der Submukosa, sondern auch in der Mukosa Immunzellinfiltrate nachweisbar waren, die mit der späteren Fibrosebildung assoziiert sind. Auch würde dies bedeuten, dass bereits eine Magenbiopsie der Mukosa bei betroffenen Patienten hinreichend Aufschluss darüber geben könnte, ob eine Magenbeteiligung vorliegt oder

nicht. Eine Früherkennung einer gastrointestinalen Beteiligung ist wichtig, um einer späteren Mangelernährung vorzubeugen. Gelegentlich ist bei Magenbiopsien nur die Mukosaschicht, nicht jedoch die tiefere Submukosaschicht erfasst. Diese Arbeit konnte jedoch aufweisen, dass beide Schichten gleichermaßen bei der gastrointestinalen Beteiligung bei der SSc betroffen sind.

Auch $CD8^+$ Zellen waren in unserer Studie in der Magenwand von SSc- und Gastritis-Patienten in vergleichbarer Anzahl vorhanden. Dabei erschien die Zellzahl in der Submukosa bei SSc-Patienten höher zu sein als im Kontrollkollektiv, jedoch wurde eine statistische Signifikanz nicht erreicht, was möglicherweise an der geringen Stichprobengröße gelegen haben könnte. Studien zur Rolle der T-Zellen bei der systemischen Sklerose beschäftigen sich vorwiegend mit T-Helferzellen. Doch auch zytotoxische T-Zellen scheinen eine Rolle in der systemischen Sklerose inne zu haben. So zeigten Fusciotti et al. in ihrer Studie [52], dass $CD8^+$ Zellen im Blut von Patienten mit SSc das profibrotische Zytokin IL-13 produzieren, welches mit der TH2-gerichteten Immunantwort assoziiert ist. Zudem ließ sich ein höherer Anteil von $CD8^+$ Effektorzellen und ein geringerer Anteil $CD8^+$ Memoryzellen im SSc-Kollektiv verglichen zur Kontrolle nachweisen, was darauf hinweist, dass ein aktiver Immunprozess im Gange ist. In einer weiteren Studie von Fusciotti et al. [125] zeigte sich, dass IL-13-produzierende $CD8^+$ Zellen gesunde dermale Fibroblasten in vitro dazu stimulieren, Extrazellularmatrix (EZM) zu produzieren. Durch die Gabe von einem IL-13-Antikörper ließ sich die Bildung von Extrazellularmatrix wieder reduzieren, so dass ein direkter Zusammenhang zwischen IL-13-Produktion und Anhäufung von Extrazellularmatrix besteht. Zudem ließen sich auf peripheren $CD8^+$ Blutzellen von SSc-Patienten sogenannte hautsuchende Rezeptoren („skin homing receptors“) wie der CLA („cutaneous lymphocyte antigen“)-Rezeptor oder der Chemokin-Rezeptor CCR10 nachweisen. Diese Rezeptoren konnten im Donorkollektiv nicht nachgewiesen werden. Diese Rezeptoren ermöglichen es den sie tragenden Zellen, in die Haut einzuwandern. In Hautproben von SSc-Patienten ließ sich in einem frühen Krankheitsstadium eine erhöhte Anzahl an IL-13-produzierenden Monozyten nachweisen, die vor allem aus $CD8^+$ Zellen bestehen. In einem späteren Krankheitsstadium lässt sich eine Verschiebung zugunsten der $CD4^+$ Zellen beobachten, dabei ist ein Rückgang der IL-13-Produktion zu verzeichnen. In den Hautproben von Gesunden lassen sich nur wenige $CD4^+$ Zellen im Bereich von Gefäßen und Hautanhangsgebilden nachweisen. $CD8^+$ Zellen sind nicht nachweisbar, ebenso lässt sich beim Gesunden keine IL-13-Produktion nachweisen.

Im Mausmodell zur Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zeigte sich zudem in einer Studie von Brodeur et al. [126], dass sich ortsständige $CD8^+$ Zellen der Lunge unter

dem Einfluss von IL-21 zu IL-13-produzierenden Tc2-Zellen entwickeln. Bei IL-21-defizienten Mäusen konnte hingegen durch die pulmonale Installation von Bleomycin eine Entzündungsreaktion hervorgerufen werden, jedoch keine Fibrose, was die Notwendigkeit von IL-21 in diesem Fibroseprozess implementiert. Auch konnte in einem Mausmodell zur Atemwegsentzündung und bronchialer Hyperreagibilität von Miyahara et al. nachgewiesen werden, dass $CD8^+$ Zellen Produzenten von IL-13 sind, welches ebenfalls in eine TH2-Immunantwort involviert ist [127].

Diese Studien lassen vermuten, dass auch $CD8^+$ Zellen eine wichtige Rolle in der TH2-gerichteten Immunantwort spielen können und somit nicht nur $CD4^+$ Zellen für die T-Zell-Komponente im Rahmen der Fibrose als auch der systemischen Sklerose verantwortlich zu sein scheinen.

Neben der gastrointestinalen Beteiligung von T-Zellen bei der systemischen Sklerose wurde die Beteiligung von Makrophagen untersucht. Makrophagen sind Schlüsselspieler des Immunsystems und werden schon seit Langem mit der Pathogenese der systemischen Sklerose in Verbindung gebracht. Dabei tritt aktuell immer mehr die Plastizität der Makrophagenpopulationen in den Vordergrund – so können sich diese, obwohl sie evolutionsbiologisch einen alten Teil des Immunsystems repräsentieren, durch den Einfluss von Zytokinen zu verschiedenen Subpopulationen entwickeln. Je nach deren Aktivierungsstatus können sie spezifische Immunantworten auslösen: Die klassisch M1-aktivierten Makrophagen schütten IFNy und TNF aus, um eine mikrobizide und tumorzide Antwort zu generieren. Die alternativ aktivierten M2-Makrophagen, die erstmalig in parasitären Infektionen beschrieben wurden, sind verbunden mit einer IL-4 Sekretion und einer TH2-gerichteten Immunantwort, die mit Wundheilung, Geweberemodelling und im pathologischen Fall einer Fibrosebildung einhergeht [128]. In dieser Arbeit konnten wir Hinweise dafür finden, dass Makrophagen bei der SSc, verglichen zu anderen Gastritiden, in erhöhter Anzahl in der Magenschleimhaut vorhanden waren. Dabei ließ sich in beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Makrophageninfiltration der Mukosa und Submukosa darstellen. Beide Bereiche wurden ungefähr gleich stark von Makrophagen infiltriert. Dass die Makrophageninfiltration gleichermaßen die Mukosa- und Submukosaschicht betraf, deckt sich mit den Ergebnissen für die T-Zellen. Für die Gesamtzellzahl der Makrophagen wurde die statistische Signifikanz erreicht; der p-Wert für die gesonderte Auswertung der Mukosa- und Submukosainfiltration erreichte diese nicht. Allerdings muss das Erreichen einer statistischen Signifikanz vorsichtig interpretiert werden, da nur eine geringe Stichprobengröße vorlag und auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet wurde. Jedoch ließen sich bei SSc-Patienten im Schnitt in allen Bereichen doppelt so viele Makrophagen wie bei Patienten der

Kontrollgruppe darstellen. Damit deckt sich diese Studie mit vorangegangen Studien, in denen eine erhöhte Makrophagendichte in verschiedenen Geweben von SSc-Patienten nachgewiesen werden konnte. So wurde von Fleischmajer et al. beschrieben, dass neben Lymphozyten und Plasmazellen auch Makrophagen in Hautproben von SSc-Patienten vorhanden sind [49]. Auch konnten Higashi-Kuwata et al. aufweisen, dass die Monozyten- bzw. Makrophagenpopulation in der Haut und im Blut bei SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zum einen erhöht waren und zum anderen einen aktivierten M2-Phänotypen aufwiesen. Durch Nachweis von CD163 und CD204 konnten die aktivierten Makrophagen dem M2-Phänotyp zugeordnet werden. In der Haut ließen sich diese Makrophagen im Bereich von perivaskulären Arealen und zwischen Kollagenbündeln nachweisen [56]. Eine weitere Studie von Bielecki et al. konnte zudem zeigen, dass lösliches CD163 in erhöhter Menge im Serum von SSc-Patienten nachweisbar ist und dass die CD163-Level mit einer schlechteren Prognose der Krankheit korrelieren [129]. Auch bei SSc-Patienten mit SSc-assoziierter interstitieller Lungenerkrankung konnten zirkulierende, aktivierte M2-Makrophagen beschrieben werden [130]. Auch konnte die Beteiligung von Makrophagen, v.a. vom M2-Phänotyp, mit verschiedenen fibrotischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. In einer Studie zur idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) von Gibbons et al. konnte eine Beteiligung von alternativ aktivierten Makrophagen nachgewiesen werden [131]. Des weiteren werden neben Beteiligungen bei der SSc und IPF auch Beteiligungen bei der nephrogenen systemischen Fibrose sowie kardialer, hepatischer und renaler Fibrose beschrieben [57]. Diese Arbeit hat mit CD68 lediglich einen Panmakrophagenmarker benutzt, der nicht zwischen M1- oder M2-Makrophagen unterscheidet. Trotzdem gibt diese Arbeit Hinweise darauf, dass Makrophagen in der gastrointestinalen Beteiligung bei der SSc eine Rolle spielen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vieler vorangegangener Studien, die die Hypothese unterstützen, dass Makrophagen Schlüsselspieler in der Pathogenese der systemischen Sklerose sind. Weitere Forschungsarbeiten sind notwendig, um die genauere Subspezifizierung der Makrophagenpopulation sowie das vorherrschende Zytokinmilieu zu erfassen.

Zusammenfassend kann aufgrund der Experimente dieser Promotionsarbeit geschlussfolgert werden, dass sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ Zellen und Makrophagen in die Pathogenese der gastrointestinalen Beteiligung der systemischen Sklerose involviert sind. Allerdings sind zumindest $CD4^+$ - und $CD8^+$ Zellen genauso in die Pathogenese anderer entzündlicher Gastritiden involviert, so dass man hier keine Spezifität für die systemische Sklerose herausarbeiten kann. Vielmehr ist das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellen unter dem vorherrschenden Zytokinmilieu von zentraler Bedeutung und bedarf weiterer Detailanalyse. Zur

Früherkennung könnte der Nachweis von $CD4^+$ Zellen auf Grund der erhöhten absoluten Anzahl herangezogen werden, dieser wäre jedoch nicht spezifisch für die SSc. Auch könnte sich der Nachweis von $CD68^+$ Zellen als spezifischer Marker für eine Magenbeteiligung in der SSc eignen. Um geeignete Früherkennungsmaßnahmen zu finden, sind allerdings weitere Forschungsarbeiten an größeren Patientenkollektiven nötig, um die hier erhobenen Ergebnisse zu bestätigen.

4.2.2 Organbezogene Expression von Adiponektin

Adiponektin ist ein Adipokin, das auf verschiedenste Art und Weise im menschlichen Körper wirkt und dabei zum Teil paradoxe Wirkungen entfaltet. Viele Studien beschäftigen sich mit der Rolle von Adiponektin in kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen, in welchen Adiponektin protektive Effekte ausübt. Hierbei wurde deutlich, dass Adiponektin auch antifibrotische Effekte ausüben kann. Bei der systemischen Sklerose sind dazu bisher nur sehr wenige Studien durchgeführt worden, die sich bis jetzt größtenteils auf den Vergleich von Serumadiponektinspiegeln und Hautuntersuchungen beschränken. Diese Arbeit ist eine der ersten Studien, die sich mit der organbezogenen Expression verschiedener Adipokine bei SSc-Patienten auseinandersetzt. Auf Grund der häufigen Beteiligung entschieden wir uns zur Einbeziehung des Gastrontestinaltraktes sowie auf Grund der hohen Morbidität und Mortalität zur Einbeziehung der Lunge. Bei anderen rheumatischen Erkrankungen wurde Adiponektin zum Teil bereits in den betroffenen Geweben untersucht: Sowohl bei der rheumatoiden Arthritis als auch bei der Arthrose konnte ein Adiponektinnachweis in den betroffenen Gelenkarealen beobachtet werden, der hier als Ausdruck des inflammatorischen Prozesses gesehen wird [101]. Auch konnten bereits unterschiedliche Wirkungen von Adiponektin in Effektorzellen rheumatischer Erkrankungen beobachtet werden: In einer Studie von Frommer et al. führte eine Stimulation von synovialen Fibroblasten mit Adiponektin bei der RA zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen [85]. Im Gegensatz dazu beschrieben Fang et al. durch Adiponektin eine Hemmung der Kollagensynthese und TGF-ß-gesteuerten profibrotischen Aktivität in SSc- und gesunden Fibroblasten über eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase [132].

In dieser Arbeit konnte im Vergleich der Magenproben von SSc- und Gastritiskollektiv ein signifikant niedrigerer Adiponektinnachweis im SSc-Kollektiv gezeigt werden. Im Kontrollkollektiv exprimierten bis auf eine Ausnahme alle Patienten Adiponektin,

wohingegen in der SSc-Gruppe nur etwas weniger als die Hälfte der Patienten einen positiven Adiponektinnachweis zeigten. Auch das Muster der Adiponektinexpression unterschied sich in den beiden Gruppen: Die Kontrollgruppe wies eine zellassoziierte Anfärbung insbesondere in der Lamina propria auf, wohingegen die SSc-Gruppe in den Fällen, in denen Adiponektin exprimiert wurde, lediglich eine Anfärbung der Gefäßwand kleiner Gefäße zeigte. Allerdings war auf Grund der Verwendung von Gefrierschnitten, deren Qualität niedriger ist als die von Paraffinschnitten, eine exakte anatomische Zuordung zu einzelnen Zellen in den vorliegenden immunhistochemischen Färbungen nicht exakt möglich. Die hohe Rate an Adiponektin-positiven Patienten in der Kontrollgruppe könnte einerseits entzündungsassoziiert sein, alternativ aber auch ein physiologischer Zustand sein. Dazu wäre der Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe notwendig. Das beobachtete Verschwinden der Adiponektinexpression im SSc-Kollektiv könnte im Rahmen eines fibrotischen Prozesses geschehen, da Adiponektin nachgewiesener Maßen antifibrotische Eigenschaften hat. Das reduzierte Vorhandensein von Adiponektin in dieser Arbeit deckt sich mit einer Studie von Arakawa et al. [133], in der gezeigt werden konnte, dass Patienten mit SSc niedrigere Adiponektinserumspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufwiesen. Dabei wurde für die Gruppe der dSSc-Patienten eine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle erreicht, für das SSc-Gesamtkollektiv jedoch nicht. Auch war eine inverse Korrelation des Adiponektinserumspiegels mit dem mRSS darstellbar, d.h., je niedriger der Adiponektinserumspiegel, desto schlechter der Hautbefund. Auch in den betroffenen Hautarealen selbst konnte bei SSc-Patienten eine reduzierte Expression von Adiponektin-mRNA im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe beobachtet werden. Zudem war die Expression von Adiponektin-mRNA in der Haut mit der Form der SSc vergesellschaftet: Bei der dSSc waren erneut niedrigere Adiponektinlevel nachweisbar als bei der lSSc. Auch konnte in dieser Studie eine inverse Korrelation von Adiponektinspiegel und dem Vorhandensein einer Lungenbeteiligung beobachtet werden.

Da auf Grund der sehr limitierten Möglichkeit, Proben von SSc-Patienten zu erhalten, alle Formen der SSc gleichermaßen eingeschlossen wurden, kann auch nicht unterschieden werden, ob gegebenenfalls Patienten in einem frühen oder späten Krankheitsstadium bzw. mit einer diffusen oder limitierten Form der SSc unterschiedliche Adiponektinexpressionen bieten könnten. So bleibt die Frage unbeantwortet, ob eventuell in einem frühen Stadium der Erkrankung noch eher eine Adiponektinexpression vorhanden ist, wohingegen sie im weiteren Verlauf mit Entwicklung der Fibrose verschwinden könnte. Interessanterweise korrelierte in dieser Arbeit das Vorhandensein der Adiponektinexpression mit der Anzahl $CD4^+$ Zellen, was

für eine Assoziation mit einem inflammatorischen Prozess sprechen könnte. Eine zu bedenkende Möglichkeit wäre, dass die Adiponektin-positiven SSc-Patienten ein frühes Krankheitsstadium respräsentieren, welches mit einer inflammatorischen Reaktion in den betroffenen Geweben einhergeht. Eine Korrelation mit der Anzahl $CD8^+$ Zellen ließ sich jedoch nicht nachweisen. Allerdings konnte eine inverse Korrelation der Adiponektinexpression mit der Anzahl $CD68^+$ Zellen beobachtet werden, also Adiponektin-negative Gewebe eine höhere Anzahl an $CD68^+$ Zellen boten. Eine statistische Signifikanz wurde hierbei jedoch nur erreicht, wenn man beide Kollektive zusammen betrachtet. Kritisch zu bedenken ist allerdings, dass in der Kontrollgruppe nur ein Patient Adiponektin-negativ war und alle erhobenen Vergleiche für Adiponektin-negativ im Kontrollkollektiv sich nur auf diesen Patienten beziehen. Eine Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv wäre nötig, um diese Befunde verifizieren zu können. Interessanterweise wurde in einer Studie von van Stijn et al. ein Wechselwirken zwischen Makrophagen, Adiponektin und dem Adiponektinrezeptor beschrieben. Bei M1-aktivierten Makrophagen wurde die Expression von AdipoR supprimiert, wohingegen dieser bei M2-aktivierten Makrophagen weiter exprimiert wurde. Durch Adiponektinstimulation der Makrophagen wurden allerdings konträre Reaktionen hervorgerufen - so hat bei M1-Makrophagen Adiponektin zu einer Induktion proinflammatorischer Zytokine geführt, wohingegen bei M2-Makrophagen das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 gebildet wurde [134]. Auch konnte bei Adiponektin-defizienten Mäusen eine spontante Aktivierung von Alveolarmakrophagen und ein emphysemartiger Parenchymumbau beobachtet werden [135]. Diese Studien implementieren eine Wechselwirkung zwischen Adiponektin und Makrophagen in inflammatorischen Prozessen.

In dieser Arbeit wurde zudem die Adiponektinexpression in gesunden und fibrotischen Lungengeweben untersucht. Auch hier konnte eine inverse Korrelation von Fibrose und Adiponektinexpression beobachtet werden. Der fibrotische Umbau der betroffenen Lungenareale wurde von einer stark reduzierten lokalen Adiponektinexpression begleitet, wohingegen gesunde Lungenproben eine starke Adiponektinexpression boten. Analog zu den Magenproben konnte auch in den Lungenproben eine zellassoziierte Adiponektinfärbung beobachtet werden, die sich insbesondere im Bereich der Alveolarepithelzellen sowie der Gefäßwände größerer und kleinerer Gefäße darstellen ließ. Ein nur sehr schwaches Adiponektinsignal konnte im Bronchialepithel bzw. im Bereich der Kinozilien beobachtet werden, das jedoch in allen Gruppen ähnlich war. Auf Grund der sehr limitierten Verfügbarkeit von Lungengewebe von SSc-Patienten war eine statistische Analyse nur zwischen dem IPF- und dem gesunden Donorkollektiv möglich, so dass die Aussagekraft in Bezug auf die SSc

natürlich eingeschränkt bleibt. Die beiden SSc-Patienten, deren Gewebeproben eingeschlossen waren, befanden sich in einem weit fortgeschrittenen Stadium einer SSc-assoziierten ILD und waren für eine Lungentransplantation vorgesehen. Allerdings ließen sich trotz der geringen Probenanzahl Parallelen zwischen den beiden fibrotischen Krankheitsentitäten beobachten. So ließ sich bei diesen insbesondere eine deutliche Reduktion der Adiponektinexpression im Lungenparenchym darstellen, die zwischen IPF- und Donorkollektiv statistisch signifikant war. Ebenso wie das IPF-Kollektiv bot das SSc-Kollektiv einen deutlich erniedrigten Adiponektin-Score im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Darüber hinaus konnte ebenfalls in den Gefäßwänden der fibrotischen Proben eine abgeschwächte Adiponektinexpression beobachtet werden, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Allerdings waren die erhobenen Mittelwerte des Adiponektin-Scores für die Gefäßanfärbung in den fibrotischen Geweben deutlich niedriger als in den gesunden Geweben. Das Verfehlen einer statistischen Signifikanz könnte durch die geringe Stichprobengröße bedingt sein. Interessanterweise konnte in den Lungenproben auch ein ähnliches Muster der Adiponektinexpression wie in den Magenproben nachgewiesen werden, welches zunächst eine inverse Korrelation mit dem Vorhandensein einer fibrotischen Erkrankung, aber auch eine Assoziation von Adiponektin mit vaskulären Strukturen zeigte. Ein Wirken von Adiponektin auf pulmonalvaskuläre Prozesse wurde bereits zuvor beschrieben: Im Tiermodell Adiponektin-überexprimierender Mäuse zur pulmonalen Hypertonie konnte eine Reduktion der pulmonalen Hypertonie durch eine verminderte Proliferation pulmonalvaskulärer glatter Muskelzellen beobachtet werden [136]. In einem weiteren murinen Tiermodell führte eine gezielte Adiponektindepletion zu einem spontan auftretendem Lungenphänotyp, der mit aktiviertem Lungenendothel, perivaskulären Immunzellinfiltraten und erhöhtem pulmonalarteriellen Druck einherging [137]. Auch wurde eine Beeinflussung von für die Vaskuloneogenese notwendigen endothelialen Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPC) durch Adiponektin beschrieben: In einer Studie von Shibata et al. zeigt sich, dass Adiponektin-defiziente Mäuse ein nur geringes Wachstum von EPC aufwiesen; dieser Effekt konnte durch die Zufuhr von Adiponektin reversibel gemacht werden [138]. Interessanterweise wurde auch eine Akkumulation von Adiponektin an Stellen vaskulärer Verletzung beschrieben [139]. Diese Studien geben Anlass zu der Annahme, dass Adiponektin notwendig für die vaskuläre Homöostase sein könnte, da sein Fehlen zu Vaskulopathien führt.

Adiponektin scheint zudem für eine physiologische Lungenfunktion notwendig zu sein: So konnte der Adiponektinrezeptor AdipoR1 auf dem Lungenepithel nachgewiesen werden [140] und eine Regulation des pulmonalen Gewebeumbaus und der Zellproliferation durch Adiponektin beobachtet werden [141]. Zudem wirkt Adiponektin

als protektiver Faktor im hyperreagiblen Bronchialsystem [142]. In verschiedenen Studien konnte eine positive Korrelation des Adiponektinserumspiegels mit der Vitalkapazität der Lungen aufgestellt werden [143, 144].

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in anderen Studien das antifibrotische Potenzial von Adiponektin bereits beschrieben: So wirkt Adiponektin protektiv in der Prävention myokardialer Fibrose [145] und schwächt eine Leberfibrose über die Modulation der NO-Synthese in hepatischen Sternzellen ab [146]. Auch konnte im Tiermodell eine protektive Wirkung von Adiponektin auf die Entwicklung einer Paraquat-induzierten Lungenfibrose über die Suppression pulmonaler Fibroblasten beschrieben werden [147].

Interessanterweise zeigte sich in einer Studie von Masui et al., dass SSc-Patienten mit einer vorhandenen Lungenbeteiligung nach einer intravenösen Cyclophosphamidgabe mit einem Ansteigen der Adiponektinserumspiegel reagierten [148]. Nicht nur Adiponektinspiegel selbst, sondern auch deren Reaktion auf therapeutische Maßnahmen könnten relevant sein, z.B. um die Krankheitsaktivität und ein mögliches Ansprechen auf eine Therapie zu monitoren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Adiponektin ein antifibrotisches Potenzial aufweist und bei fibrotischen Krankheitsentitäten in den betroffenen Organen eine verringerte Expression zeigt.

Ein vermindertes Vorhandensein von Adiponektin könnte ein starker Trigger in der Fibrosebildung sowohl bei der SSc als auch bei anderen fibrotischen Erkrankungen sein und bedarf weiterer intensiver Erforschung. Adiponektin bzw. dessen Fehlen könnte in Zukunft sowohl als Biomarker zur Früherkennung als auch zum Überwachen des Krankheitsverlaufs und des Therapieansprechens genutzt werden.

4.2.3 Organbezogene Expression von Resistin

In unserer Arbeit wurde die Resistinexpression in Magen- und Lungenproben von SSc-Patienten und verschiedenen Kontrollkollektiven untersucht. Resistin werden insbesondere proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Bisherige Kenntnisse zu Resistin beschränken sich häufig auf in-vitro-Studien, Tiermodelle und Serumresistinuntersuchungen. Nur wenige Studien haben sich mit organbezogener Resistinexpression befasst. Bei der RA, aber auch bei der Arthrose und verschiedenen Spondylarthropathien, besteht eine synoviale Resistinexpression. Daher war in dieser Arbeit von Interesse, wie sich die organbezogene Resistinexpression in den untersuchten Geweben darstellen würde. In der Auswertung der Magenproben ließ sich sowohl im SSc- als auch im Gastritiskollektiv in der Mehrzahl der Fälle eine Resistinexpression nachweisen. Dabei exprimierten 67% der SSc-Patienten und 55% der Gastritispatienten Resistin, so dass kein signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte. Auch konnte im Färbemuster kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven erarbeitet werden; beide Gruppen exprimierten Resistin sowohl im Drüsenepithel als auch der Lamina propria und der Basallamina. Ein Bezug zur gefäßassoziierten Resistinexpression konnte im Gegensatz zur Adiponektinexpression nicht festgestellt werden. Da es sich bei den ausgewerteten Magenproben allesamt um entzündlich verändertes Gewebe handelt, bestätigt die vorliegende Studie die proinflammatorischen Eigenschaften Resistins. Eine Kolokalisation mit Adiponektin konnte nicht beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich im SSc-Kollektiv eine inverse Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer Resistinexpression und der Anzahl $CD4^+$ Zellen, wohingegen das Kontrollkollektiv in Resistin-positiven Geweben eine doppelt so hohe Anzahl an $CD8^+$ Zellen aufwies. In einer Studie von Silswal et al. konnte durch Resistin in vitro eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IL-12 in Makrophagen ausgelöst werden, ähnlich wie durch eine LPS-Stimulation [149]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Makrophagenanzahl und Resistinexpression beobachtet werden. Hier muss auf die vorsichtige Interpretation der erlangten Ergebnisse auf Grund der geringen Stichprobengröße verwiesen werden. Die Gesamtkonstellation zeigt zumindest eine mögliche Verbindung zwischen Resistinexpression und Entzündung, lässt aber noch einige Fragen offen. Insbesondere lässt die Verwendung von Gefrierschnitten keine zellspezifische Zuordnung zu.

Im Gegensatz zu den Magengeweben konnte in den Lungengeweben eine zellassoziierte Resistinexpression beobachtet werden. In allen Kollektiven ließ sich eine mittlere bis starke Resistinexpression beobachten. Die Werte der Donor- und SSc-

Gruppe waren dabei etwas höher als die der IPF-Gruppe, ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nicht eruieren. Resistin wurde von verschiedenen Zellen im Lungenparenchym und intravasal exprimiert, dazu gehörten vor allem Immunzellen wie Granulozyten, Lymphozyten und Alveolarmakrophagen. In einer Studie von Senolt et al. konnte zuvor eine Kolokalisation von Resistin mit Makrophagen, B-Lymphozyten und Plasmazellen, jedoch nicht mit T-Lymphozyten, in der Synovia von RA-Patienten beobachtet werden [102]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich auch im Bronchialepithel eine regelmäßige Resistinexpression nachweisen. Die in allen Gruppen ausgeprägt vorhandene Resistinexpression des Bronchialepithels könnte so interpretiert werden, dass das Bronchialepithel eine wichtige immunologische Funktion im bronchopulmonalen System ausübt, da es eine Barriere zur Außenwelt darstellt. Ein aktives Immunsystem in diesem Bereich schützt den Körper vor infektiösen und toxischen Einflüssen. Wir konnten in den gesunden Donorgeweben eine ähnliche Resistinexpression im Bronchialepithel nachweisen wie in den fibrotischen Proben. Hier stellt sich die Frage, ob eine physiologische Restinexpression als Ausdruck eines aktiven Immunsystems in diesem Bereich gewertet werden kann.

In den Gefäßwänden fanden sich in allen Gruppen nur vereinzelt schwach positive Resistinsignale, die nicht mit der Adiponektinexpression der pulmonalen Gefäße vergleichbar waren (siehe Abb.36). Im Donorkollektiv konnte im Parenchym eine regelmäßige Resistinanfärbung einzelner Zellen innerhalb der dünnen Septen der Alveolen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu boten die fibrotisch umgebauten Areale nur sehr wenige Resistin-positive Zellen, wohingegen Bereiche mit Immunzellinfiltraten sehr viele Resistin-positive Zellansammlungen zeigten, so dass in der IPF- und SSc-Gruppe ein recht heterogenes Bild der Resistinexpression im Parenchym bestand. Besonders auffällig war das Vorhandensein der genannten Resistin-positiven Immunzellinfiltrate bei 75% der IPF-Patienten und 100% der SSc-Patienten, wohingegen nur ein Patient (14%) aus der gesunden Donorgruppe solche Infiltrate zeigte (siehe Abb.38). Diese Beobachtung stützt wiederum die Annahme, dass Resistin proinflammatorisch wirken kann.

4.2.4 Organbezogene Expression von Visfatin

Die Visfatinexpression in den untersuchten Magen- und Lungenproben von SSc- und Kontrollkollektiven stellte sich ähnlich wie die Resistinexpression dar. In den untersuchten Magenproben exprimierten die meisten Patienten in allen Kollektiven Visfatin, dabei zeigten alle Patienten im SSc-Kollektiv (100%) und bis auf eine Ausnahme alle Patienten im Kontrollkollektiv (91%) eine Visfatinexpression. Da es sich bei allen Gewebeproben um entzündlich verändertes Material handelte, untermauert dieses Ergebnis die zuvor beschriebene Annahme, dass Visfatin entzündungsassoziiert vorkommt. In den Magengeweben zeigten sich viele Überschneidungen mit der Resistinexpression; so konnten beide Adipokine in verschiedenen Bereichen wie Mukosaepithel, Lamina propria oder Basallamina nachgewiesen werden. Der Großteil aller Resistin-positiven Gewebe exprimierte auch Visfatin. Eine zellassoziierte Expression konnte wie auch bei Resistin in den Magenschnitten nicht nachgewiesen werden, jedoch in den Lungenschnitten, so dass sich die Frage stellt, ob bei der Verwendung von Paraffinschnitten eine genauere Zuordnung zu bestimmten Zellen möglich gewesen wäre. Eine Korrelation mit den Immunzellmarkern CD4, CD8 und CD68 ließ sich nicht beobachten. Hier muss allerdings bedacht werden, dass nur ein Patient Visfatin-negativ war, so dass es nicht verwundert, dass hier keine Unterschiede darzustellen sind. Dass Visfatin eine Rolle in entzündlichen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes spielt, wurde zuvor schon von Moschen et al. beschrieben: Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn – Erkrankungen, die beide zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehören und eine autoimmune Komponente besitzen – wiesen in ihrem Darmgewebe eine lokale Visfatinexpression auf. Dabei werden allerdings von den Autoren vor allem Antigen-präsentierende Zellen als Visfatinquelle vermutet [114]. Die vorliegende Arbeit deckt sich mit der Studie von Moschen et al. dahingehend, dass eine lokale Visfatinexpression in dem betroffenen, entzündlich veränderten gastrointestinalen Gewebe nachgewiesen werden konnte. Da sich die meisten Adipokinstudien auf die Untersuchung von Adipokinserumspiegeln beschränken, liegen nicht viele Studien vor, mit der diese Arbeit verglichen werden kann. Bei der RA wurde in der Synovialflüssigkeit und im Synovialgewebe ebenfalls eine lokale Visfatinexpression beschrieben. Dabei konnte Visfatin vor allem im „lining layer“, in Lymphozytenaggregaten und innerhalb von interstitiellen Gefäßen nachgewiesen werden [119]. Die Visfatinexpression im Lungengewebe stellte sich, wie auch in den Magenproben, ähnlich wie die Resistinexpression dar. Zunächst konnte in allen drei Kollektiven (IPF-, SSc- und Donorkollektiv) eine mittelstarke bis starke

Visfatinexpression nachgewiesen werden. Wie auch bei Resistin ließ sich diese vorallem im Bronchialepithel, innerhalb einzelner Zellen im Lungenparenchym sowie in Immunzellen intravasal und in Lymphozytenaggregaten nachweisen. Interessant ist, dass bei IPF- und SSc-Patienten zu 100% Visfatin-positive Immunzellinfiltrate nachweisbar waren, die sich im gesunden Donorkollektiv nicht finden ließen. Diese Infiltrate waren in den allermeisten Fällen auch Resistin-positiv (siehe Abb.38), jedoch Adiponektin-negativ. Diese Beobachtung impliziert erneut die Assoziation zwischen inflammatorischen Prozessen und Visfatin. Auch konnte in dieser Arbeit die Expression von Visfatin durch Leukozyten bestätigt werden, die zuvor schon von Friebe et al. beschrieben wurde [111].

Interessant ist die sich durch alle Patientenkollektive ziehende starke Expression von Visfatin durch das Bronchialepithel (siehe Abb.35). Diese weist erneut Parallelen zur Resistinexpression auf, da beide Adipokine im Bronchialepithel exprimiert wurden (siehe Abb.37). Auch stellt sich die Frage, ob das Vorhandensein von Visfatin im Bronchialepithel als Ausdruck der immunologischen Komponente des Bronchialepithels gesehen werden kann. Interessanterweise konnte in einer Studie von Kendal-Wright et al. beobachtet werden, dass im humanen Amnionepithel eine Visfatinexpression vorliegt, die durch eine Dehnung des Amnionepithels ausgelöst wird. Die Visfatinexpression wirkt antiapoptotisch und in diesem Fall protektiv, da ein erhöhter Zelluntergang des Amnionepithels verhindert werden kann [117]. Möglicherweise kann Visfatin in bestimmten Zellen, wie Epithelzellen, auch protektive Eigenschaften ausüben. Eine Hypothese könnte demnach auch sein, dass die Visfatinexpression protektiv auf das Bronchialepithel wirkt und dessen zu schnellen Zelluntergang entgegenwirkt. In dieser Arbeit konnte im Bronchialepithel die stärkste Anfärbung für Visfatin in den Kinozilien nachgewiesen werden. Eventuell könnte dies einer Visfatinsekretion des Bronchialepithels entsprechen. Dass verschiedene humane Epithelzellen Quelle von Zytokinen sein können wurde bereits hinreichend beobachtet [150]. Auch das Bronchialepithel scheint ein wichtiger Produzent von Botenstoffen zu sein: So wurde sowohl eine physiologische Produktion von IL-10, welches anti-inflammatorisch wirkt, durch das Bronchialepithel beschrieben [151], als auch eine Sekretion proinflammatorischer Zytokine als Reaktion auf verschiedene inflammatorische Stimuli [152]. Diese Studien unterstützen die Idee, dass das Bronchialepithel Visfatin sezernieren könnte und hierbei proinflammatorische und antiapoptotische Mechanismen eine Rolle spielen könnten.

Auch bei der RA konnte eine lokale Visfatinexpression im Synovialgewebe und in der Synovialflüssigkeit beobachtet werden, die insbesondere im „lining layer“, in Immunzellinfiltraten und im Bereich interstitieller Gefäße vorhanden war. Zudem konnte

in der Studie von Meier et al. durch eine Visfatinstimulation der synovialen Fibroblasten (RASF) eine erhöhte Produktion von Chemokinen erzeugt werden und somit ein proinflammatorisches Umfeld [119]. Diese Studie demonstriert den proinflammatorischen Effekt Visfatins. Auch deckt sich dies mit der vorliegenden Arbeit dahingehend, dass Visfatin in Immunzellinfiltraten exprimiert wird. Interessanterweise wurde Visfatin, wie auch Resistin, in fibrotisch umgebauten Arealen nicht oder nur sehr reduziert exprimiert (siehe Abb. 33). Der Part, der die Färbung ausmacht, bestand in den fibrotischen Lungen insbesonders aus den Immunzellinfiltraten. Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass Visfatin proinflammatorische Effekte induziert bzw. während inflammatorischen Prozessen vorhanden ist. Die antiapoptotischen Eigenschaften Visfatins könnten mit der Visfatinexpression im Bronchialepithel in Zusammenhang gebracht werden. Hier bedarf es allerdings weiteren Forschungsarbeiten, die sich insbesondere mit der lokalen Visfatinexpression in unterschiedlichen Organsystemen auseinandersetzen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die organbezogene Expression verschiedener Adipokine und Immunzellmarker bei Patienten mit systemischer Sklerose (SSc) untersucht. Adipokine sind hormonähnliche Botenstoffe, die metabolische und immunomodulatorische Funktion aufweisen und deren Wirken bereits bei anderen rheumatischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden konnte. Da insbesondere die gastrointestinale Beteiligung bei der SSc zu den häufigen Organmanifestationen gehört und die pulmonale Manifestation in der Regel den lebenslimitierenden Faktor darstellt, sollte durch den differenziellen Nachweis von Adipokinen ein möglicher Zusammenhang herausgearbeitert werden. Die Limitation der Arbeit bestand hierbei durch die geringe Anzahl an Proben, die durch die geringe Patientenanzahl sowie die invasive Probengewinnung bedingt war.

In der Arbeit wurden zunächst Magengewebe von SSc- und Gastritispatienten auf das Vorhandensein der Immunzellmarker CD4, CD8 und CD68 sowie der Adipokine Resistin, Visfatin und Adiponektin untersucht. In beiden Gruppen wurde eine ähnliche Anzahl an $CD4^+$- und $CD8^+$ Zellen nachgewiesen, dabei bestand jeweils ein erhöhter CD4/CD8-Ratio. In der SSc-Gruppe konnte eine signifikant höhere Anzahl an $CD68^+$ Zellen nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von Immunzellen bei beiden Kollektiven kann als Ausdruck eines inflammatorischen Prozesses interpretiert werden, der nicht spezifisch für die SSc ist, sondern auch bei anderen Gastritiden eine Rolle spielt. Die erhöhte Anzahl von $CD68^+$ Immunzellen bestätigt auch die Ergebnisse früherer Studien, die eine erhöhte Makrophagenanzahl in den von SSc betroffenen Gewebearealen nachweisen konnten.

Bei den Adipokinfärbungen der Magenproben konnte bei beiden Kollektiven ein ähnliches Muster für Visfatin und Resistin beobachtet werden. Beide Adipokine ließen sich bei beiden Patientengruppen in den meisten Geweben nachweisen, wobei der Visfatinnachweis am häufigsten beobachtet werden konnte. Hierbei wurden beide Adipokine gleichermaßen in verschiedenen anatomischen Kompartimenten exprimiert: dem Mukosaepithel, der Lamina propria und der Basallamina. Die Adiponektinexpression war hingegen in der Magenwand von SSc-Patienten signifikant reduziert, wohingegen der Großteil des Kontrollkollektivs eine regelmäßige Adiponektinexpression bot. Die Adiponektinexpression konnte hier in der Lamina propria der Mukosa sowie insbesondere in angeschnittenen Gefäßwänden gezeigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte ein Vergleich der Expression von Adiponektin, Visfatin und Resistin im Lungengewebe von SSc-, IPF- und gesunden Donorpatienten. Auf Grund der geringen Probenanzahl von Patienten mit SSc-assoziierter Lungenerkrankung wurde ein IPF-Kollektiv in die Studie miteingeschlossen. Im Lungengewebe ließ sich, ähnlich wie im Magengewebe, für Resistin und Visfatin eine Assoziation mit inflammatorischen Prozessen aufstellen. Resistin und Visfatin wurden insbesondere in Immunzellen exprimiert. Interessanterweise waren beide Adipokine auch im Bronchialepithel aller Patientenkollektive exprimiert, wobei Visfatin hier die stärkste Expression aufwies. Diese Beobachtung kann als Hinweis auf die immunologischen Eigenschaften des Bronchialsystems als Barriere zwischen Körper und potenziellen Pathogenen gewertet werden. Wie auch im Magengewebe ließ sich eine starke Reduktion der Adiponektinexpression in den fibrotischen Lungen von IPF- und SSc-Patienten im Vergleich zum gesunden Donorkollektiv demonstrieren, in dem es regelmäßig im Bereich des Lungenparechyms vorhanden war. Ebenfalls konnte eine gefäßassoziierte Adiponektinexpression beobachtet werden. Im Gegensatz zu Visfatin und Resistin wurde Adiponektin nicht in Immunzellen, Immunzellinfiltraten und nur sehr schwach im Bronchialepithel exprimiert. Diese Ergebnisse liefern Hinweise dafür, dass Adiponektin in fibrotisch veränderten Geweben herunterreguliert ist und somit protektive Eigenschaften ausüben kann. Das Fehlen von Adiponektin könnte ein Trigger für die Entstehung und/oder Aufrechterhaltung des Fibrosemechanismus sein.

Zusammenfassend konnte für die gastrointestinale Beteiligung bei der SSc eine Rolle der T-Zellen aufgezeigt werden, die jedoch nicht spezifisch für die SSc ist, sondern in anderen Gastritiden gleichermaßen auftritt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der SSc eine erhöhte Makrophagenpopulation, die an inflammatorischen und fibrotischen Prozessen möglicherweise als Schlüsselspieler beteiligt ist. Sowohl im Magen- als auch im Lungengewebe konnte eine Assoziation von Visfatin und Resistin mit inflammatorischen Prozessen dargestellt werden, wohingegen Adiponektin in fibrotischen Geweben herunterreguliert war und somit potenziell anti-fibrotische und protektive Eigenschaften demonstrierte.

Zusammengefasst stützt die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass Adipokine einen differenziellen Einfluss auf verschiedene bei der systemischen Sklerose pathophysiologisch wichtige Stoffwechselwege nehmen.

6 SUMMARY

In this study, lung and gastrointestinal tract samples from SSc patients were analyzed for adipokine and immune cell marker expression. Adipokines are bioactive substances secreted by adipose tissue and by different resident cells. Adipokines are known to have an influence on metabolism but there is increasing evidence for an immunomodulatory role of different adipokines including adiponectin, visfatin/PBEF and resistin. For example, these adipokines are strongly expressed in synovial tissue of RA patients compared to controls. Since little is known about the role of adipokines in other rheumatic diseases including SSc, we analyzed the expression of the adipokines adiponectin, resistin and visfatin in SSc organ involvement. As gastrointestinal involvement leads to high morbidity and pulmonal involvement causes high mortality, the role of adipokines in those organs was evaluated. The study was restricted by the limited availability of SSc tissue samples which is related to the rarity of SSc itself as well as the invasive methods used in obtaining tissue samples.

Initially, gastric samples from SSc and gastritis patients were examined for the expression of the immune cell markers CD4, CD8 and CD68 and also for adiponectin, visfatin and resistin. The frequency of $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells in the gastric wall was comparable in SSc and gastritis patients, both showing an elevated CD4/CD8 ratio. SSc patients had a statistically significant higher number of $CD68^+$ immune cells compared to gastritis patients. T-cell involvement appears to be linked to inflammation in SSc as well as in other forms of gastritis. Elevated numbers of macrophages in SSc gastric tissue confirm the results of previous studies describing macrophage infiltration within affected SSc tissue.

Visfatin and resistin expression in the gastric wall was present in most patients from both groups without significant difference. Both adipokines were detected in most tissues of both groups, with visfatin being detectable in almost all tissues. The pattern of visfatin and resistin expression was similar in all tissues as both adipokines could be detected in different anatomic compartments: mucosal epithelium, lamina propria and basal lamina. In contrast, gastric adiponectin expression was significantly decreased in SSc compared to gastritis patients. In gastritis patients, adiponectin could be detected consistently within the lamina propria, especially in the microvasculature.

Subsequently, we evaluated the expression of adiponectin, visfatin and resistin in lung tissue from SSc-, IPF- and healthy donor patients. Due to the limited availability of SSc lung tissue, IPF lung samples were included in the study, representing another collective of fibrosing lung disease.

Similar to gastric tissue, lung tissue resistin and visfatin expression could be linked to inflammation. Resistin and visfatin were particularly detectable within immune cells. Interestingly, both adipokines were also expressed in bronchial epithelial cells of all groups, with visfatin showing the strongest expression. This observation implies an immunologic function of bronchial epithelial cells, exerting a barrier function for potential pathogens.

Adiponectin was expressed in vessels and lung parenchyma, but not by immune or bronchial epithelial cells. Again, adiponectin was decreased significantly within fibrotic lung tissue from SSc and IPF patients compared to healthy controls. These results highlight that adiponectin expression is decreased in fibrotic tissue and could therefore exert protective properties. The strong decrease of adiponectin could itself be a trigger for the development as well as the maintenance of the mechanism of fibrosis.

Taken together, T-cell involvement in gastritis appears to be linked to inflammation including SSc. In contrast, macrophage involvement seems to play a key role in inflammatory and fibrotic processes in SSc pathogenesis. In both gastric and lung tissue, resistin and visfatin expression could be linked to inflammation, whereas adiponectin was downregulated in fibrotic tissue, demonstrating anti-fibrotic and protective properties.

In summary, this study underlines the idea of adipokine involvement in distinct mechanisms of SSc pathophysiology.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACA	Anti-Centromer-Antikörper
ACE	Angiotensin Converting Enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
ACR	American College of Rheumatology
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AIP	akute interstitielle Pneumonie
AMP	Adenosinmonophosphat
ANA	Antinukleäre Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AT	Angiotensin
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCR10	Chemokinrezeptor CCR10
CD	Cluster of Differentiation
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
CMV	Cytomegalie-Virus
COP	kryptogen organisierende Pneumonie
CRP	C-reaktives Protein
DIP	desquamative interstitielle Pneumonie
DLCO	Diffusing Capacity of the Lung for Carbon Monoxide (Diffusionskapazität der Lunge für Kohlenmonoxid)
dSSc	diffuse kutane systemische Sklerose
EKG	Elektrokardiogramm
EPC	endothelial progenitor cells (Endotheliale Vorläuferzelle)
ERS	European Respiratory Society
EULAR	European League Against Rheumatism
EUSTAR	European Scleroderma Trials and Research group
EZM	Extrazellularmatrix
FVC	forcierte Vitalkapazität
GAVE	Gastric Antral Vascular Ectasia
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GIT	Gastrointestinaltrakt
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HR-CT	high resolution computed tomography (hochauflösendes Computertomogramm)
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IIP	idiopathische interstitielle Pneumonie
IL	Interleukin
ILD	interstitielle Lungenerkrankung
IPF	idiopathische pulmonale Fibrose
KHK	koronare Herzkrankheit
LIP	lymphozytäre interstitielle Pneumonie
LPS	Lipopolysaccharid
lSSc	limitierte kutane systemische Sklerose
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MMP	Matrixmetalloproteinase

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mRSS	modified Rodnan skin score
MTX	Methotrexat
NAC	N-Acetylcystein
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Nampt	Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSIP	Nicht Spezifische Interstitielle Pneumonie
OCT	Optimum Cutting Temperature
PAH	Pulmonal Arterielle Hypertonie
PBEF	Pre-B-cell Colony-Enhancing Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PPFE	pleuroparenchymale Fibroelastose
PPI	Protonenpumpeninhibitor
RA	Rheumatoide Arthritis
RASF	rheumatoid arthritis synovial fibroblasts
RB-ILD	Respiratorische Bronchiolitis mit interstitieller Lungenerkrankung
SSc	systemische Sklerose
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLS I	Scleroderma Lung Study I
SLS II	Scleroderma Lung Study II
TGF-ß	Transforming Growth Factor beta (transformierender Wachstumsfaktor beta)
TH1	Typ1-T-Helferzelle
TH2	Typ2-T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UIP	usual interstitial pneumonia (gewöhnliche interstitielle Pneumonie)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Einteilung der interstitiellen Lungenerkrankungen nach der ATR/ERS, AJRCCM, 2002 21
Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung der Zellzahlerfassung CD4-positiver Zellen.. 45
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung immunhistochemischer Resistinfärbungen... 46
Abbildung 4: Darstellung der anatomischen Lungenkompartimente anhand der Surfactant-Färbung. 47
Abbildung 5: Anzahl CD4-positiver Zellen in der Magenwand..... 50
Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung der CD4-positiven Zellen in der Magenwand. 51
Abbildung 7: Anzahl CD8-positiver Zellen in der Magenwand..... 52
Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung CD8-positiver Zellen in der Magenwand 53
Abbildung 9: Anzahl CD68-positiver Zellen in der Magenwand..... 54
Abbildung 10: Immunhistochemische Darstellung CD68-positiver Zellen in der Magenwand. 55
Abbildung 11: Expression von Resistin in der Magenwand..... 56
Abbildung 12: Immunhistochemische Darstellung der Expression von Resistin in der Magenwand 57
Abbildung 13: Anzahl CD4-positiver Zellen in Resistin-positiven und Resistin-negativen Magenschnitten 58
Abbildung 14: Expression von Visfatin in der Magenwand..... 59
Abbildung 15: Immunhistochemische Darstellung der Expression von Visfatin in der Magenwand. 60
Abbildung 16: Expression von Adiponektin in der Magenwand..... 62
Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung der Expression von Adiponektin im Magen…….63
Abbildung 18: Anzahl CD4-positiver Zellen in Adiponektin-positiven und Adiponektin-negativen Magenschnitten 65
Abbildung 19: Anzahl CD68-positiver Immunzellen in Adiponektin-positiven und Adiponektin-negativen Magenschnitten. 65
Abbildung 20: Expression von Adiponektin im Lungengewebe. 68
Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung der Expression von Adiponektin im Lungengewebe. 69
Abbildung 22: Expression von Adiponektin in den Lungengefäßen. 70

Abbildung 23: Expression von Adiponektin in der Gefäßwand größerer Lungengefäße 71
Abbildung 24: Expression von Adiponektin in kleinen Lungengefäßen mit dünner Gefäßwand. 72
Abbildung 25: Expression von Adiponektin im Bronchialepithel. 73
Abbildung 26: Expression von Adiponektin im Parenchym gesunder und fibrotischer Lungen 74
Abbildung 27: Expression von Resistin im Lungenparenchym. 77
Abbildung 28: Expression von Resistin im Bronchialepithel 77
Abbildung 29: Expression von Resistin in der Gefäßwand 77
Abbildung 30: Expression von Resistin in gesunden und fibrotischen Lungen 78
Abbildung 31: Expression von Resistin im Bronchialepithel 79
Abbildung 32: Expression von Resistin in der Gefäßwand größerer Lungengefäße ... 80
Abbildung 33: Expression von Visfatin in gesunden und fibrotischen Lungen 82
Abbildung 34: Expression von Visfatin im Lungengewebe 83
Abbildung 35: Expression von Visfatin im Bronchialepithel……...83
Abbildung 36: Vergleich der Expression von Adiponektin, Resistin und Visfatin in der Gefäßwand 85
Abbildung 37: Vergleich der Expression von Adiponektin, Resistin und Visfatin im Bronchialepithel. 86
Abbildung 38: Darstellung von Entzündungszellinfiltraten im IPF- und SSc-Gewebe.. 86

9 TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 1: Diagnosekriterien zur systemischen Sklerose des American College of Rheumatology / der European League Against Rheumatism 2013. 5
Tabelle 2: Einteilung der idiopathischen interstitiellen Pneumonien nach der American Thoracic Society und European Respiratory Society 2013.....22
Tabelle 3: Für die Immunhistochemie verwendete Primärantikörper.....39
Tabelle 4: Für die Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörpersysteme.....39
Tabelle 5: Für die Arbeit verwendete Geräte und Software.....40
Tabelle 6: Scoring der immunhistochemischen Lungenfärbungen.....47
Tabelle 7: Anzahl CD4-positiver Zellen in der Magenwand.....50
Tabelle 8: Anzahl CD8-positiver Zellen in der Magenwand.....52
Tabelle 9: Anzahl CD68-positiver Zellen in der Magenwand.....54
Tabelle 10: Expression von Resistin in der Magenwand.....56
Tabelle 11: Korrelation von Immunzellmarkern zur Expression von Resistin in der Magenwand.....58
Tabelle 12: Expression von Visfatin in der Magenwand.....59
Tabelle 13: Korrelation der Immunzellmarker CD4, CD8 und CD68 zur Expression von Visfatin 61
Tabelle 14: Korrelation von Visfatin- und Resistinexpression der Magenschnitte.....61
Tabelle 15: Korrelation von den Immunzellmarkern CD4, CD8 und CD68 zur Expression von Adiponektin in der Magenwand.....64
Tabelle 16: Korrelation von Adiponektin- und Resistinexpression in der Magenwand.....66
Tabelle 17: Korrelation von Adiponektin- und Visfatinexpression in der Magenwand.....66
Tabelle 18: Expression von Adiponektin im Lungengewebe 68
Tabelle 19: Expression von Resistin im Lungengewebe 76
Tabelle 20: Expression Visfatin im Lungengewebe.....81
Tabelle 21: Expression der verschiedenen Adipokine in den Lungengeweben 84

10 ERKLÄRUNG

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert.Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum Nina Christine Lepper

11 LITERATURVERZEICHNIS

1 Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, eds. Harrisons Innere Medizin: Deutsche Ausgabe. In Zusammenarbeit mit der Charité, 16th edn. Berlin: ABW Wissenschaftsverlagsgesellschaft 2005.

2 Chifflot H, Fautrel B, Sordet C, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37(4):223–35.

3 Andréasson K, Saxne T, Bergknut C, et al. Prevalence and incidence of systemic sclerosis in southern Sweden: population-based data with case ascertainment using the 1980 ARA criteria and the proposed ACR-EULAR classification criteria. *Ann Rheum Dis* 2014;73(10):1788–92.

4 Saar P, Müller-Ladner U. Die systemische Sklerose--Eine rheumatologische Herausforderung. *Z Rheumatol* 2006;65(5):429-38; quiz 439-40.

5 Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48(8):2246–55.

6 Tan FK, Arnett FC. Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon. *Curr Opin in Rheumatol* 2000;12(6):511–19.

7 Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1956–63.

8 Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of Fetal DNA and Cells in Skin Lesions from Women with Systemic Sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338(17):1186–91.

9 Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, et al. Antibodies against Human Cytomegalovirus in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis: A Gene Array Approach. *PLOS Med* 2005;3(1):e2.

10 Mora GF. Systemic sclerosis: environmental factors. *J Rheumatol* 2009;36(11):2383–96.

11 Fritsch P. Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas: Springer Berlin Heidelberg 2013.

12 Manger B, Schulze-Koops H, Arbogast M, et al. Checkliste Rheumatologie: Thieme 2012.

13 Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, et al. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):444–51.

14 Masi AT. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23(5):581–90.

15 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. *Arthritis Rheum* 2013;65(11):2737–47.

16 Mierau R, Roers A, Genth E. Labordiagnostik bei systemischer Sklerose. *Z Rheumatol* 2007;66(3):206, 208-11.

17 Hunzelmann N, Krieg T. Das Deutsche Netzwerk für Systemische Sklerodermie (DNSS): Aktuelle Daten zu Diagnostik und Therapie. *Hautarzt* 2012;63 Suppl 1:71–75.

18 Manetti M, Neumann E, Milia AF, et al. Severe fibrosis and increased expression of fibrogenic cytokines in the gastric wall of systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum* 2007;56(10):3442–47.

19 Forbes A, Marie I. Gastrointestinal complications: the most frequent internal complications of systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009;48 Suppl 3:iii36-9.

20 Johnson DA, Drane WE, Curran J, et al. Pulmonary disease in progressive systemic sclerosis. A complication of gastroesophageal reflux and occult aspiration? *Arch Intern Med* 1989;149(3):589–93.

21 Schmeiser T, Saar P, Jin D, et al. Profile of gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2012;32(8):2471–78.

22 Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, et al. Scleroderma lung disease. *Eur Respir Rev* 2013;22(127):6–19.

23 Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. *Ann Rheum Dis* 2007;66(7):940–44.

24 Schurawitzki H, Stiglbauer R, Graninger W, et al. Interstitial lung disease in progressive systemic sclerosis: high-resolution CT versus radiography. *Radiology* 1990;176(3):755–59.

25 McNearney TA, Reveille JD, Fischbach M, et al. Pulmonary involvement in systemic sclerosis: associations with genetic, serologic, sociodemographic, and behavioral factors. *Arthritis Rheum* 2007;57(2):318–26.

26 Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35(1):35–42.

27 Steen VD, Conte C, Owens GR, et al. Severe restrictive lung disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1994;37(9):1283–89.

28 Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, et al. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997;40(4):743–51.

29 Launay D, Remy-Jardin M, Michon-Pasturel U, et al. High resolution computed tomography in fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2006;33(9):1789–801.

30 Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM, et al. CT features of lung disease in patients with systemic sclerosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. *Radiology* 2004;232(2):560–67.

31 Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(12):1581–86.

32 Fujita J. Non-specific interstitial pneumonia as pulmonary involvement of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2001;60(3):281–83.

33 Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cyclophosphamide versus placebo in scleroderma lung disease. *N Engl J Med* 2006;354(25):2655–66.

34 Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med* 2016;4(9):708-19.

35 Khanna D, Tashkin D, Furst DE, et al. FRI0252 Efficacy of Mycophenolate Mofetil (MMF) versus Oral Cyclophosphamide (CYC) on Skin Thickness in The Scleroderma Lung Study II. *Ann Rheum Dis* 2016;75(Suppl 2):525.

36 Chang B, Wigley FM, White B, et al. Scleroderma patients with combined pulmonary hypertension and interstitial lung disease. *J Rheumatol* 2003;30(11):2398–405.

37 Kowal-Bielecka O, Landewé R, Avouac J, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis* 2009;68(5):620–28.

38 Hudson M, Baron M, Tatibouet S, et al. Exposure to ACE inhibitors prior to the onset of scleroderma renal crisis-results from the International Scleroderma Renal Crisis Survey. *Semin Arthritis Rheum* 2014;43(5):666–72.

39 Hesselstrand R, Scheja A, Akesson A. Mortality and causes of death in a Swedish series of systemic sclerosis patients. *Ann Rheum Dis* 1998;57(11):682–86.

40 Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G. Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik, 2nd edn. Stuttgart: Thieme 2007.

41 Rink L, Kruse A, Haase H. Immunologie für Einsteiger, 2nd edn. Berlin: Springer Spektrum 2015.

42 Gabrielli, Armando, M.D. Avvedimento, et al. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;306:1989–2003.

43 Distler JHW. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2006;45(Supplement 3):iii26-iii27.

44 Rabquer BJ, Koch AE. Angiogenesis and vasculopathy in systemic sclerosis: evolving concepts. *Curr Rheumatol Rep* 2012;14(1):56–63.

45 Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007;9 Suppl 2:S2.

46 Hügle T, White K, van Laar JM. Cell-to-cell contact of activated mast cells with fibroblasts and lymphocytes in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71(9):1582.

47 Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117(3):557–67.

48 O'Reilly S, Hügle T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology* 2012;51(9):1540–49.

49 Fleischmajer R, Perlish JS, Reeves JRT. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 1977;20(4):975–84.

50 Westermann W, Schöbl R, Rieber EP, et al. Th2 cells as effectors in postirradiation pulmonary damage preceding fibrosis in the rat. *Int J Radiat Biol* 1999;75(5):629–38.

51 Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, et al. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology* 2011;50(5):944–52.

52 Fuschiotti P. CD8+ T cells in systemic sclerosis. *Immunol Res* 2011;50(2-3):188–94.

53 Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999;42(6):1168–78.

54 Luzina IG, Atamas SP, Wise R, et al. Occurrence of an activated, profibrotic pattern of gene expression in lung CD8+ T cells from scleroderma patients. *Arthritis Rheum* 2003;48(8):2262–74.

55 Fuschiotti P, Medsger TA, Morel PA. Effector CD8+ T cells in systemic sclerosis patients produce abnormally high levels of interleukin-13 associated with increased skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;60(4):1119–28.

56 Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2010;12(4):R128.

57 Wermuth PJ, Jimenez SA. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. *Clin Transl Med* 2015;4:2.

58 Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2(3):189–202.

59 Zhou D, Chen Y, Chen F, et al. Critical involvement of macrophage infiltration in the development of Sjögren's syndrome-associated dry eye. *Am J Pathol* 2012;181(3):753–60.

60 Kräling BM, Maul GG, Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 1995;63(1):48–56.

61 Behr J, Günther A, Ammenwerth W, et al. S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose. *Pneumologie* 2013;67(2):81–111.

62 Costabel U, Kroegel C. Klinische Pneumologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis: Thieme 2013.

63 American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(2):277–304.

64 Travis WD, Costabel U, Hansell DM, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(6):733–48

65 Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, et al. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(4):967–72.

66 Demedts M. Interstitial lung diseases: a clinical update: Proceedings of an International Symposium held in Leuven, Belgium, on March 23-25, 2000. Sheffield, Cambridge, MA: European Respiratory Society (ERS); Maney Pub 2001.

67 Prasse A. Die idiopathische Lungenfibrose. *Pneumologie* 2015;69(10):608-14; quiz 615.

68 Behr J. The diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dtsch Arztebl Int* 2013;110(51-52):875–81.

69 Raghu G, Anstrom KJ, King TE, et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2012;366(21):1968–77.

70 King TE, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014;370(22):2083–92.

71 Richeldi L, Du Bois RM, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014;370(22):2071–82.

72 Murray LA, Rubinowitz A, Herzog EL. Interstitial lung disease: is interstitial lung disease the same as scleroderma lung disease? *Curr Opin Rheumatol* 2012;24(6):656–62.

73 Lee JS, Ryu JH, Elicker BM, et al. Gastroesophageal reflux therapy is associated with longer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(12):1390–94.

74 Corte TJ, Wort SJ, Wells AU. Pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis: a review. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2009;26(1):7–19.

75 Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(6):788–824.

76 Pochetuhen K, Luzina IG, Lockatell V, et al. Complex regulation of pulmonary inflammation and fibrosis by CCL18. *Am J Pathol* 2007;171(2):428–37.

77 Truchetet M, Brembilla NC, Montanari E, et al. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther* 2011;13(5):R166.

78 Herzog EL, Mathur A, Tager AM, et al. Review: interstitial lung disease associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis: how similar and distinct? *Arthritis Rheumatol* 2014;66(8):1967–78.

79 Pischon T. Adiponectin: Stability in Plasma over 36 Hours and Within-Person Variation over 1 Year. *Clin Chem* 2003;49(4):650–52.

80 Diez J, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003;148(3):293–300.

81 Frystyk J, Berne C, Berglund L, et al. Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(2):571–76.

82 Krenning G, Moonen JAJ, Harmsen MC. Pleiotropism of adiponectin: inflammation, neovascularization, and fibrosis. *Circ Res* 2009;104(9):1029–31.

83 Tomizawa A, Hattori Y, Kasai K, et al. Adiponectin induces NF-kappaB activation that leads to suppression of cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells: globular adiponectin vs. high molecular weight adiponectin. *Diab Vasc Dis Res* 2008;5(2):123–27.

84 Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002;277(29):25863–66.

85 Frommer KW, Zimmermann B, Meier FMP, et al. Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62(10):2886–99.

86 Ebina K, Fukuhara A, Ando W, et al. Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction. *Clin Rheumatol* 2009;28(4):445–51.

87 Ebina K, Oshima K, Matsuda M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of adiponectin reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378(2):186–91.

88 Rovin BH, Song H, Hebert LA, et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 2005;68(4):1825–33.

89 Tomčík M, Arima K, Hulejová H, et al. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis. *Cytokine* 2012;58(2):165–68.

90 Ding X, Saxena NK, Lin S, et al. The Roles of Leptin and Adiponectin. *Am J Pathol* 2005;166(6):1655–69.

91 Summer R, Fiack CA, Ikeda Y, et al. Adiponectin deficiency: a model of pulmonary hypertension associated with pulmonary vascular disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(3):L432-8 (accessed 15 Jan 2016).

92 Filková M, Haluzík M, Gay S, et al. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol* 2009;133(2):157–70.

93 Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409(6818):307–12.

94 Rae C, Graham A. Human resistin promotes macrophage lipid accumulation. *Diabetologia* 2006;49(5):1112–14.

95 Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(2):472–76.

96 Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, et al. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 2005;174(9):5789–95.

97 Verma S, Li S, Wang C, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003;108(6):736–40.

98 Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, et al. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 2005;111(7):932–39.

99 Kang J, Yu B, Youn D. Relationship of Serum Adiponectin and Resistin Levels with Breast Cancer Risk. *J Korean Med Sci* 2007;22(1):117.

100 Pamuk GE, Demir M, Harmandar F, et al. Leptin and resistin levels in serum of patients with hematologic malignancies: correlation with clinical characteristics. *Exp Oncol* 2006;28(3):241–44.

101 Schäffler A, Ehling A, Neumann E, et al. Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA* 2003;290(13):1709–10.

102 Senolt L, Housa D, Vernerová Z, et al. Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis* 2007;66(4):458–63.

103 Almehed K, d'Elia HF, Bokarewa M, et al. Role of resistin as a marker of inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2008;10(1):R15.

104 Bostrom EA, d'Elia HF, Dahlgren U, et al. Salivary resistin reflects local inflammation in Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 2008;35(10):2005–11.

105 Karmiris K, Koutroubakis IE, Xidakis C, et al. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(2):100–05.

106 Kim B, Mok J, Kang S, et al. The relationship between serum adipocytokines and Graves' ophthalmopathy: A hospital-based study. *Endocr J* 2016.

107 Masui Y, Asano Y, Akamata K, et al. Serum resistin levels: a possible correlation with pulmonary vascular involvement in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2014;34(8):1165–70.

108 Samal B, Sun Y, Stearns G, et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994;14(2):1431–37.

109 Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005;307(5708):426–30.

110 Dahl TB, Holm S, Aukrust P, et al. Visfatin/NAMPT: a multifaceted molecule with diverse roles in physiology and pathophysiology. *Annu Rev Nutr* 2012;32:229–43.

111 Friebe D, Neef M, Kratzsch J, et al. Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia*;54(5):1200–11.

112 Adeghate E. Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem* 2008;15(18):1851–62.

113 Saddi-Rosa P, Oliveira CSV, Giuffrida FMA, et al. Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2:21.

114 Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. Visfatin, an Adipocytokine with Proinflammatory and Immunomodulating Properties. *J Immunol* 2007;178(3):1748–58.

115 Jia SH, Li Y, Parodo J, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 2004;113(9):1318–27.

116 Ye SQ, Simon BA, Maloney JP, et al. Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(4):361–70.

117 Kendal-Wright CE, Hubbard D, Bryant-Greenwood GD. Chronic Stretching of Amniotic Epithelial Cells Increases Pre-B Cell Colony-Enhancing Factor (PBEF/Visfatin) Expression and Protects Them from Apoptosis. *Placenta* 2008;29(3):255–65.

118 Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation* 2007;115(8):972–80.

119 Meier FMP, Frommer KW, Peters MA, et al. Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis. *J Biol Chem* 2012;287(34):28378–85.

120 Masui Y, Asano Y, Shibata S, et al. A possible contribution of visfatin to the resolution of skin sclerosis in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis via a direct anti-fibrotic effect on dermal fibroblasts and Th1 polarization of the immune response. *Rheumatology* 2013;52(7):1239–44.

121 Domsic R, Fasanella K, Bielefeldt K. Gastrointestinal manifestations of systemic sclerosis. *Dig Dis Sci* 2008;53(5):1163–74.

122 Sakkas LI, Chikanza IC, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(12):679–85.

123 Larussa T, Leone I, Suraci E, et al. Helicobacter pylori and T Helper Cells: Mechanisms of Immune Escape and Tolerance. *J Immunol Res* 2015;2015:981328.

124 Manetti M, Neumann E, Müller A, et al. Endothelial/lymphocyte activation leads to prominent CD4+ T cell infiltration in the gastric mucosa of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008;58(9):2866–73.

125 Fuschiotti P, Larregina AT, Ho J, et al. Interleukin-13-producing CD8+ T cells mediate dermal fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2013;65(1):236–46.

126 Brodeur TY, Robidoux TE, Weinstein JS, et al. IL-21 Promotes Pulmonary Fibrosis through the Induction of Profibrotic CD8+ T Cells. *J Immunol* 2015;195(11):5251–60.

127 Miyahara N, Swanson BJ, Takeda K, et al. Effector CD8+ T cells mediate inflammation and airway hyper-responsiveness. *Nat Med* 2004;10(8):865–69.

128 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8(12):958–69.

129 Bielecki M, Kowal K, Lapinska A, et al. Increased release of soluble CD163 by the peripheral blood mononuclear cells is associated with worse prognosis in patients with systemic sclerosis. *Adv Med Sci* 2013;58(1):126–33.

130 Mathai SK, Gulati M, Peng X, et al. Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype. *Lab Invest* 2010;90(6):812–23.

131 Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, et al. Ly6C hi Monocytes Direct Alternatively Activated Profibrotic Macrophage Regulation of Lung Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(5):569–81.

132 Fang F, Liu L, Yang Y, et al. The adipokine adiponectin has potent anti-fibrotic effects mediated via adenosine monophosphate-activated protein kinase: novel target for fibrosis therapy. *Arthritis Res Ther* 2012;14(5):R229.

133 Arakawa H, Jinnin M, Muchemwa FC, et al. Adiponectin expression is decreased in the involved skin and sera of diffuse cutaneous scleroderma patients. *Exp Dermatol* 2011;20(9):764–66.

134 van Stijn, Caroline M W, Kim J, Lusis AJ, et al. Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *FASEB J* 2015;29(2):636–49.

135 Summer R, Little FF, Ouchi N, et al. Alveolar macrophage activation and an emphysema-like phenotype in adiponectin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294(6):L1035-42.

136 Weng M, Raher MJ, Leyton P, et al. Adiponectin decreases pulmonary arterial remodeling in murine models of pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45(2):340–47.

137 Summer R, Fiack CA, Ikeda Y, et al. Adiponectin deficiency: a model of pulmonary hypertension associated with pulmonary vascular disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(3):L432-8.

138 Shibata R, Skurk C, Ouchi N, et al. Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett* 2008;582(11):1607–12.

139 Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, et al. An adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res* 2000;32(2):47–50.

140 Miller M, Cho JY, Pham A, et al. Adiponectin and Functional Adiponectin Receptor 1 Are Expressed by Airway Epithelial Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Immunol* 2008;182(1):684–91.

141 Haley S, Shah D, Romero F, et al. Scleroderma-related lung disease: are adipokines involved pathogenically? *Curr Rheumatol Rep* 2013;15(12):381.

142 Zhu XL, Qin XQ, Xiang Y, et al. Adipokine adiponectin is a potential protector to human bronchial epithelial cell for regulating proliferation, wound repair and apoptosis: comparison with leptin and resistin. *Peptides* 2013;40:34–41.

143 Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Kuznar-Kaminska B, et al. Circulating adipokines and organ involvement in patients with systemic sclerosis. *Acta Reumatol Port* 2015;40(2):156–62.

144 Thyagarajan B, Jacobs DR, Smith LJ, et al. Serum adiponectin is positively associated with lung function in young adults, independent of obesity: the CARDIA study. *Respir Res* 2010;11:176.

145 Sam F, Walsh K. What can adiponectin say about left ventricular function? *Heart* 2010;96(5):331–32.

146 Dong Z, Su L, Esmaili S, et al. Adiponectin attenuates liver fibrosis by inducing nitric oxide production of hepatic stellate cells. *J Mol Med* 2015;93(12):1327–39.

147 Yao R, Cao Y, He Y, et al. Adiponectin attenuates lung fibroblasts activation and pulmonary fibrosis induced by paraquat. *PLoS ONE* 2015;10(5):e0125169.

148 Masui Y, Asano Y, Takahashi T, et al. Clinical significance of monitoring serum adiponectin levels during intravenous pulse cyclophosphamide therapy in interstitial lung disease associated with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2013;23(2):323–29.

149 Silswal N, Singh AK, Aruna B, et al. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334(4):1092–101.

150 Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 1994;8(13):1041–47.

151 Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, et al. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13(3):257–61.

152 Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, et al. The Airway Epithelium: Soldier in the Fight against Respiratory Viruses. *Clin Microbiol Rev* 2011;24(1):210–29.

12 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Abstract beim European Workshop for Rheumatology Research (EWRR) 2013 veröffentlicht sowie als Poster dort präsentiert:

Lepper N, Peters M, Vasile M, Roeb E, Günther A, Müller-Ladner U, Neumann E. Evaluation of tissue inflammation and adipokine expression in gastric and lung tissue of systemic sclerosis (SSc) patients. *Ann Rheum Dis* 2013;**72**:Suppl 1 A26

Zudem wurden die Ergebnisse dieser Arbeit als Publikation bei der Zeitschrift *Seminars in Arthritis and Rheumatism* eingereicht und befinden sich aktuell in Revision:

Elena Neumann, **Nina Lepper**, Massimiliano Vasile, Marvin Peters, Florian Meier, Oliver Distler, Steffen Gay, Andreas Günther, Elke Roeb, Klaus W. Frommer, Ulf Müller-Ladner. Adipokine expression in systemic sclerosis lung and gastrointestinal organ involvement.

13 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Müller-Ladner danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich meiner Betreuerin PD Dr. Elena Neumann vom Franz-Groedel-Institut der Kerckhoff Klinik Bad Nauheim, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die gemeinsamen Ausarbeitungen, die Hilfe bei jedweden Problemen und die konstruktive Kritik.

Darüber hinaus danke ich besonders Dr. Marvin Peters und Sabrina Brückmann für die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Ingo Tarner bedanken, der diese Arbeit mitbetreut hat und mir viele hilfreiche Tipps geben konnte.

Ein weiterer großer Dank geht an Prof. Roeb und Prof. Günther und deren Teams für die Gewinnung und Überlassung des Gewebematerials.

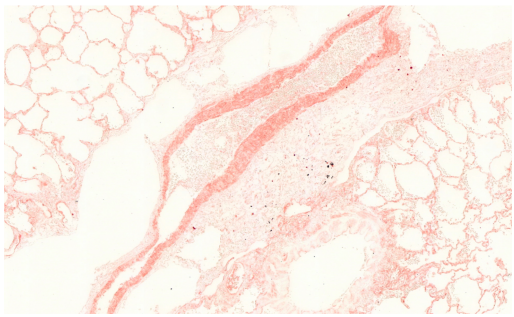
Ich danke meinen Eltern und meinen Großeltern für die Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit. Zudem danke ich meiner Schwester Marlen für ihre Tipps und ehrlichen Worte.

Weiterhin danke ich meinem Freund Marco für seine mentale Unterstützung, andauernde Motivation und natürlich für seine Hilfe bei PC-Problemen aller Art.

Zuletzt möchte ich meinem auf tragische Weise verstorbenen Doktorvater Prof. Robert Dinser danken. In der kurzen Zeit, in der ich ihn kennenlernen durfte, hat er mich unglaublich freundlich und bemüht in das Thema eingearbeitet und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Die Motivation, diese Arbeit anzufertigen, ist durch ihn entstanden.

14 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6652-9