

**Analyse der kleinen dermalen  
Nervenfasern und Gefäße in  
Hautbiopsien bei systemischer Sklerose  
unter vasoaktiver Therapie**

**Inauguraldissertation**

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

vorgelegt von Bajors, Luk Alessandro  
aus Frankfurt am Main

Gießen, 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-  
Universität Gießen**

Aus dem Institut für Neuropathologie

Gutachterin: Professorin Dr. med. Anne Schänzer

Gutachter: Professor Dr. Dr. Hagen B. Huttner

Tag der Disputation: 03.09.2024

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Ziel der Arbeit .....	1
1.2	Fragestellung:.....	3
2	Hintergrund .....	4
2.1	Systemische Sklerose .....	4
2.2	Pathophysiologie .....	4
2.2.1	Fibrose .....	5
2.2.2	Vaskulopathie der systemischen Sklerose .....	8
2.2.3	Autoimmunität .....	10
2.3	Diagnose .....	11
2.4	Therapie .....	13
2.4.1	Immunmodulierende Medikamente .....	13
2.4.2	Vasoaktive Therapie .....	13
2.5	Neuropathie.....	15
2.5.2	Diagnostik der kleinen Nervenfasern .....	16
2.6	Neuropathien in der systemischen Sklerose .....	20
2.6.1	Beteiligung des peripheren Nervensystems.....	20
2.6.2	Neuropathische Schmerzen.....	20
2.6.3	Neurophysiologie bei systemischer Sklerose .....	21
2.6.4	Hautpathologie bei systemischer Sklerose .....	21
3	Material und Methoden .....	23
3.1	Material.....	23
3.2	Studienkollektiv .....	23
3.3	Ethikvotum.....	23
3.4	Klinische Untersuchung, Serologie und Kapillarmikroskopie .....	24
3.5	Probenentnahme, Fixierung und Lagerung der Proben .....	24

3.6	Kryostatschnitte.....	25
3.7	Histologische Färbungen .....	26
3.8	Immunfluoreszenzfärbung .....	26
3.8.1	Epidermale Nerven und Gefäße.....	27
3.8.2	Darstellung von Langerhans-Zellen.....	29
3.8.3	Regenerierende Fasern .....	30
3.9	Auswertung.....	33
3.9.1	Morphometrische Auswertung der dermalen Nervenfasern.....	33
3.9.2	Auswertung der kleinen Gefäße und Langerhans-Zellen.....	35
3.9.3	Histologische Analyse der Hautbeteiligung mit einem SSc-Hautscore ...	42
3.10	Statistische Analyse .....	45
4	Ergebnisse .....	46
4.1	Charakteristika der Kohorten.....	46
4.2	Auswertung der Hautbiopsien.....	48
4.2.1	Morphometrische Analyse .....	48
4.3	Korrelation der Variablen.....	54
4.4	Prüfung auf Normalverteilung.....	57
4.5	Unterschiede zwischen der gesunden und der erkrankten Gruppe .....	58
4.6	Unterschiede zwischen der SSc-Kohorte prä- und posttherapeutisch.....	59
4.7	Epidermale Nervenfaserdichte (END) .....	60
4.8	Gefäßdichte (VD).....	61
4.9	Langerhans-Zell-Dichte (LC-Dichte).....	63
4.10	Hautscore.....	65
4.11	Centromer-Antikörper .....	67
4.12	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	68
5	Diskussion.....	69
5.1	Hautveränderungen bei Systemischer Sklerose .....	71

5.1.1	SSc-Hautscore bei Erkrankten .....	71
5.1.2	Hautbeteiligung unter Iloprost-Therapie .....	72
5.2	Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei der systemischen Sklerose .....	73
5.2.1	Epidermale Nervenfaserdichte .....	73
5.2.2	Epidermale Nervenfaserdichte unter Iloprost-Therapie .....	75
5.3	Gefäßflächendichte .....	77
5.3.1	Gefäßflächendichte der systemischen Sklerose .....	77
5.3.2	Gefäßflächendichte unter Iloprost-Therapie .....	79
5.4	Langerhans-Zellen .....	80
5.5	Limitationen .....	81
5.6	Fazit und Ausblick .....	84
6	Zusammenfassung .....	86
7	Summary .....	87
8	Abkürzungsverzeichnis .....	88
9	Abbildungsverzeichnis .....	89
10	Tabellenverzeichnis .....	90
11	Literatur .....	91
12	Anhang .....	102
12.1	Geräte .....	102
12.2	Software .....	102
12.3	Verbrauchsmaterialien .....	103
12.4	Gebrauchsmaterialien .....	105
12.5	Protokolle .....	106
12.5.1	Färbungen .....	106
12.5.2	Digitalisierung der Schnitte mit Zeiss AxioScan .....	108
12.5.3	Morphometrische Analyse .....	108

13	Publikationsverzeichnis .....	110
14	Ehrenwörtliche Erklärung.....	111
15	Danksagung.....	112

# 1 Einleitung

## 1.1 Ziel der Arbeit

Die systemische Sklerose (SSc, engl.: „*systemical sclerosis*“) ist eine entzündlich-rheumatologische Systemerkrankung, bei der es durch gesteigerte Kollagenbildung und -ablagerungen zur diffusen Fibrose und Sklerosierung in Haut und verschiedenen Organsystemen kommt. Neben den funktionellen Beschwerden stellen Schmerzen eine Hauptursache zur Minderung der Lebensqualität Betroffener dar. In neueren Studien klagt teilweise mehr als jeder zweite Erkrankte über neuropathische Schmerzen, ein möglicher Hinweis für eine Schädigung des peripheren Nervensystems (Cuzdan, Turk, Sarpel, Erken, & Alparslan, 2018; Ostojic et al., 2019; Sousa-Neves, Cerqueira, Santos-Faria, Afonso, & Teixeira, 2018). Obwohl schon früh eine Assoziation zwischen systemischer Sklerose und des peripheren Nervensystems angenommen wurde, gelten die neurologischen Manifestationen eher als seltene Komplikationen der Krankheit (Amaral, Peres, Lapa, Marques-Neto, & Appenzeller, 2013; Richter, 1954).

Eine Ursache von neuropathischen Schmerzen ist die Schädigung kleiner Nervenfasern in der Haut. Die nicht myelinisierten C-Fasern vermitteln Schmerz- und Temperaturempfinden. Bei Schädigung dieser Fasern kommt es zu neuropathischen Schmerzen und Missempfindungen wie Brennen oder Kribbeln (Devigili et al., 2008; Schlereth et al., 2019). Sind keine größere Nervenfasern betroffen, wird dies als Kleinfaserneuropathie (SFN, engl.: „*small fiber neuropathy*“) klassifiziert. Diagnostisch kann die Schädigung der kleinen Nervenfasern mittels Funktionstests wie zum Beispiel der quantitativ sensorischen Testung überprüft werden (Badry et al., 2018; Baum, 2018; Devigili et al., 2019; Schady et al., 1991; Zakrzewska-Pniewska, Jabłon'Ska, Kowalska-Olędzka, Błaszczuk, & Hausmanowa-Petrusewicz, 1999). Zur Sicherung der Diagnose einer Kleinfaserneuropathie sollten zwei der drei Kriterien erfüllt sein: klinische Befunde einer Kleinfaserneuropathie, pathologische quantitative sensorische Testung oder verminderte Dichte der dermalen kleinen Fasern. Die Hautbiopsie mit Färbung und Messung der epidermalen Nervenfaserdichte (END) ist dabei eine zuverlässige Methode (Devigili et al., 2019; Lauria et al., 2005).

In einer Studie konnte bereits eine verminderte epidermale Nervenfaserdichte bei SSc-Erkrankten ohne neuropathische Symptomatik nachgewiesen werden (Provitiera et al.,

2005). Als Ursache wurde angenommen, dass die Nervenschädigung durch die Vaskulopathie der systemischen Sklerose und Fibrosierung der Haut bedingt sei (Provitera et al., 2005; Provitera et al., 2007; Sousa-Neves et al., 2018). Dieser Zusammenhang soll in dieser Arbeit überprüft werden.

Die systemische Sklerose gehört zu den Autoimmunerkrankungen und ist durch ein fehlreguliertes Immunsystem bedingt (Choi & Fritzler, 2016). Als immunologische Zellen der Epidermis könnten Langerhans-Zellen gerade in der entzündlich dermalen Fibrosierung der systemischen Sklerose möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen (Xie et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit sollen daher die Langerhans-Zellen in Hautbiopsien Erkrankter analysiert werden, um Hinweise auf eine mögliche pathophysiologische Beteiligung der systemischen Sklerose zu finden.

Zur Behandlung der krankheitstypischen digitalen Ulzera, pulmonaler Hypertonie und Raynaud-Symptomatik nach den Leitlinien intravenöses Iloprost empfohlen (Kowal-Bielecka et al., 2017). Hierbei handelt es sich um ein synthetisches Prostacyclin-Analogon der zweiten Generation, das über G-Protein-gekoppelte Prostacyclin E2 Rezeptoren mittels der Proteinkinase A zur Gefäßweitung führt und zugleich die Thrombozytenaggregation inhibiert (Juche et al., 2020; Truchetet, Allanore, Montanari, Chizzolini, & Brembilla, 2012).

Neben der Wirkung auf das Gefäßsystem wirkt Iloprost antiinflammatorisch sowie antifibrotisch. Durch die Behandlung kommt es zur verminderten Expression von proinflammatorischen Molekülen wie etwa IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Bettoni et al., 2002; D'Amelio et al., 2010; Della Bella et al., 2001; Foti et al., 2017; Scarsi et al., 2011; Truchetet et al., 2012). Während die Wirkung der Vergrößerung des Gefäßlumen und Aggregationshemmung der Thrombozyten nur für maximal zwei Stunden bestehen, lassen sich immunmodulatorische Effekte noch nach einem Monat messen (D'Amelio et al., 2010; Della Bella et al., 2001).

In einer Fallstudie konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass Iloprost zur Regeneration der epidermalen Nervenfasern führt (Provitera et al., 2007). Falls die beschriebenen neuropathischen Schmerzen durch eine vaskulopathische Malnutrition der kleinen Nervenfasern bedingt ist, könnte Iloprost der Entstehung neuropathischer Schmerzen kausal entgegenwirken (Cuzdan et al., 2018; Ostojic et al., 2019). Die schwierige symptomatische Therapierbarkeit der neuropathischen Schmerzen

unterstreicht die Relevanz einer effektiven Therapie gegen die Entstehung und das Voranschreiten der Nervenschädigung (Schlereth et al., 2019).

In unserer Studie wollen wir den Einfluss von Iloprost auf die Gefäßdichte, die Fibrose, das Immunsystem und die epidermale Nervenfaserdichte in Hautbiopsien von SSc-Erkrankten untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist, die Beteiligung einer Kleinfaserpathologie in Assoziation zur systemischen Sklerose zu untersuchen (1), eine Assoziation zwischen Nervenfaserdichte und Gefäßdichte zu prüfen, um die Hypothese einer möglichen Malnutrition intrakutaner Nervenfasern zu bekräftigen (2), den Einfluss von Iloprost als vasoaktives Medikament auf das Gefäß- und Nervensystem zu untersuchen (3) sowie die Langerhans-Zellen in der Epidermis quantitativ zu untersuchen (4).

## **1.2 Fragestellung:**

Das Ziel der Arbeit ist die Beantwortung folgender Fragen:

- Ist die systemische Sklerose mit einer Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte assoziiert?
- Korreliert die intraepidermale Nervenfaserdichte mit dem Verlust der Gefäßinnervation, gemessen durch die Gefäßdichte?
- Ist die Anzahl Langerhans-Zellen in der Epidermis SSc-Erkrankter verändert?
- Kann durch eine Iloprost-Therapie eine Regeneration des Kapillarbett und der Nervenfaserdichte erreicht werden?
- Führt eine Iloprost-Therapie zu einer Steigerung der intraepidermalen Nervenfaserdichte und korreliert diese Erhöhung mit der Erhöhung der Gefäßdichte?

## 2 Hintergrund

### 2.1 Systemische Sklerose

Die systemische Sklerose gehört zu den Kollagenosen, einer Untergruppe der rheumatologischen Erkrankungen. Sie betrifft in etwa 150-300 Personen pro Millionen und zählt somit zu den seltenen Erkrankungen. Jedoch weist sie innerhalb der Gruppe der rheumatologischen Erkrankungen die höchste Letalität auf (Barnes & Mayes, 2012; Denton & Khanna, 2017). Vor allem bei einer pulmonalen Beteiligung ist die Sterblichkeit deutlich erhöht (Tyndall et al., 2010). Neben der Lebenserwartung ist bei Betroffenen häufig auch die Lebensqualität eingeschränkt. Limitation ihrer Körperfunktionen sowie Schmerzen hindern die Betroffenen an der gesellschaftlichen Teilhabe (Almeida, Almeida, & Vasconcelos, 2015).

### 2.2 Pathophysiologie

Heutiger Stand der Forschung ist, dass die systemische Sklerose durch ein Zusammenspiel aus Autoimmunität, Gefäßschäden mit dysfunktionalen Reparaturmechanismen und übermäßiger Produktion von Extrazellulärmatrix entsteht (Castelino & Varga, 2014). Pathologische Varianten in den Genen können für die Krankheit disponieren. Vertreter der HLA-Komplexe wie DRB1\*01, DRB1\*11 oder A\*30 sind mit der systemischen Sklerose assoziiert, wohingegen DRB1\*07, B\*57 und Cw\*14 protektiv zu sein scheinen (Pattanaik, Brown, Postlethwaite, & Postlethwaite, 2015). Weiterhin sind bestimmte HLA-Gene mit der Mortalität, mit der Subklassifikation der systemischen Sklerose, mit den Autoantikörpern sowie auch mit den Komplikationen der systemischen Sklerose assoziiert. Neben den HLA-Genen zeigen sich bei der systemischen Sklerose außerdem Variationen in den Genen des Immunsystems, wie dem Autophagie Protein 5, B-Lymphozyten Kinase, CD (engl.: „*cluster of differentiation*“) 247 und weiteren (Pattanaik et al., 2015; Sierra-Sepúlveda et al., 2019). Darüber hinaus sind epigenetische Prozesse und microRNA (Ribonukleinsäure, engl.: „*ribonucleic acid*“) für eine veränderte Genexpression verantwortlich (Altorok, Tsou, Coit, Khanna, & Sawalha, 2015; Pattanaik et al., 2015). Es wird angenommen, dass die Krankheit bei genetischer Disposition durch exogene Trigger wie zum Beispiel Silikone, organische Lösungsmittel, Schwermetalle, Vitamin-D-Mangel sowie Infektionen ausgelöst werden

kann (Abbot, Bossingham, Proudman, De Costa, & Ho-Huynh, 2018). Auch Chemotherapeutika wie zum Beispiel Taxane stehen im Verdacht, ein Trigger zu sein (Itoh, Yanaba, Kobayashi, & Nakagawa, 2007; Yang et al., 2015).

### 2.2.1 Fibrose

Hauptmerkmal der systemischen Sklerose ist die pathologische Überproduktion der Extrazellulärmatrix. Es kommt zur übermäßigen Aktivierung von Fibroblasten. Sie produzieren große Mengen Kollagen und sind resistent gegen Apoptose (Ho, Lagares, Tager, & Kapoor, 2014). Der fortschreitende fibrotische Umbau des Bindegewebes führt zur Schädigung von funktionellem Gewebe der betroffenen Organsysteme und bestimmt so die Prognose der Erkrankung (Sobolewski et al., 2019) (Tabelle 1).

<b>Dermale Sklerose</b>	mRSS $\geq 2$ in mindestens einer Körperregion	75 %
<b>Gastrointestinale Symptome</b>	Dysphagie, Reflux, Völlegefühl, Erbrechen, Diarrhoe oder Verstopfung in der Anamnese	71 %
<b>Interstitielle Lungenerkrankung</b>	Reduzierte DLCO ( $< 80$ %)	65 %
	FVC ( $< 80$ %)	31 %
<b>Digitale Ulzera</b>	Atraumatische digitale Ulzera	34 %
<b>Herzbeteiligung</b>	Diastolische Dysfunktion, Leitungsblöcke, reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, Perikarderguss	32 %
<b>Pulmonalarterielle Hypertonie</b>	Echokardiographisch erhöhter PAP ( $> 40$ mmHg)	14 %
<b>Renale Krise</b>	Renale Krise in der Anamnese	3 %

**Tabelle 1: Organbeteiligungen bei systemischer Sklerose (Jaeger et al., 2016).** Beschrieben sind die verschiedenen Organbeteiligungen im ersten Krankheitsjahr nach Auftreten der Raynaud-Symptomatik. mRSS = „*modified Rodnan Skin Score*“, DLCO = Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, FVC = Forcierte Vitalkapazität, PAP = Pulmonalarterieller Blutdruck.

#### 2.2.1.1 Hautbeteiligung

Betroffen ist vor allem die Haut der distalen Extremitäten, meist beginnend an den Händen. Zunächst kommt es infolge einer Lymphabflussstörung zur Ausbildung von Ödemen. Folgend verhärtet sich die Haut und zeigt eine gespannte und glänzende Oberfläche. Im finalen atrophischen Stadium wird die Haut bleicher. Zusätzlich fallen die

Haare aus (Bongi, Angela, Passalacqua, Miccio, & Matucci Cerinic, 2011; Ferreli et al., 2017). Klinisch kann die Hautbeteiligung durch den mRSS (engl.: „*modified Rodnan Skin Score*“) evaluiert werden. Die verschiedenen Hautbereiche werden mittels einer Ordinalskala beurteilt. Gemessen wird beidseits an den Fingern, dem Handrücken, dem Unterarm, dem Oberarm, den Hüften, dem Unterschenkel und den Füßen. Zusätzlich werden Bauch, Brust und Gesicht evaluiert. Bewertet wird von „0“ bis „3“. Während „0“ normaler Haut entspricht, ist bei „1“ die Haut geschwollen. Bei „2“ ist es dem Untersucher nicht möglich, die Haut zusammenzukneifen. Bei „3“ ist es dem Untersuchenden nicht möglich, die Haut zu verschieben (Czirjak et al., 2007).

Im Verlauf der Krankheit entwickeln sich häufig Veränderungen der Nägel, Ulzera, Teleangiektasien, Hyperpigmentierungen sowie eine Calcinosis cutis (Ferreli et al., 2017).

In den Fingern bilden sich vor allem Beugekontrakturen aus, die zur Krallhand führen können. Durch vermehrtes Sehnenreiben kommt es vermehrt zu Sehnenscheidenentzündungen. Weiterhin kann es im Verlauf zu Akroosteolysen kommen, vom distal an wird der Knochen in Richtung proximal resorbiert (Young, Namas, Dodge, & Khanna, 2016). Während die Fibrosierung an Händen und Fingern die Beweglichkeit behindert, führt eine Verhärtung der Haut im Gesicht zur Störung der Mimik und der Mundöffnung. Hierdurch können Sprech- und Essstörungen entstehen (Ferreli et al., 2017).

#### 2.2.1.2 Gastrointestinaltrakt

Ein häufig betroffenes System ist der Gastrointestinaltrakt. Vor allem im Ösophagus steigt durch Verminderung der Peristaltik und unzureichende Sphinkterfunktion sowie vermehrte Hiatushernien das Risiko für einen Reflux. Die Folgen sind Dysphagie, ein brennendes Gefühl im Thorax, aber auch Husten und Heiserkeit. Die Fibrosierung kann die Motorik des Magens lähmen, was zu einem vorzeitigen Völlegefühl und Erbrechen führen kann. Darüber hinaus bilden sich vermehrt gastral antrale vaskuläre Ektasien, welche zu chronischen sowie auch akut lebensgefährlichen Blutungen führen können. Durch die Fibrosierung und vaskuläre Minderversorgung der Muskeln kommt es im Darm zu Motilitätsstörungen. Hieraus entsteht die Neigung zu Obstipation und Divertikelbildungen. Eine weitere Problematik ist die bakterielle Überbesiedlung, welche die Mukosa schädigen kann und zu Diarrhoe führen kann. Außerdem verbraucht die

pathologische Darmflora vermehrt Nährstoffe. Am zweithäufigsten betroffen ist der anorektale Abschnitt. Hier kann es neben Obstipation auch zu Stuhlinkontinenz sowie zum Rektumprolaps kommen (Denton & Khanna, 2017; McFarlane et al., 2018).

### 2.2.1.3 Lunge

Pulmonal kann sich durch die Bindegewebsproliferation eine interstitielle Lungenerkrankung entwickeln, die sich schon im frühen Krankheitsstadium manifestieren kann und so prognosebestimmend ist. In einigen Fällen entwickelt sich eine fortschreitende Lungenfibrose (Denton & Khanna, 2017; Elhai, Avouac, Kahan, & Allanore, 2015). Die Lungenmanifestation der systemischen Sklerose ist maßgeblich an der Mortalität von Erkrankten beteiligt. Die Mortalität ist bei Erkrankten mit interstitieller Lungenerkrankung um das Dreifache erhöht (Fischer, Patel, & Volkmann, 2019).

### 2.2.1.4 Herz und Gefäßsystem

Bei etwa 15 % der Erkrankten kommt es zur pulmonal-arteriellen Hypertonie (Denton & Khanna, 2017). Mit der Lungenfibrose ist die pulmonal-arterielle Hypertonie ein Faktor, die sekundär das Herz schädigen können. Die systemische Sklerose kann jedoch ebenfalls primär das Herz schädigen. Fibrosierung, Inflammation und Vaskulopathie können die Herzfunktion beeinträchtigen. Der linke Ventrikel ist in seiner Funktion sowohl systolisch als auch diastolisch eingeschränkt. Bei Fibrosierung des Reizleitungssystem kann eine Arrhythmie ausgelöst werden. Darüber hinaus kann die Inflammation zu einer Myokarditis oder Perikarditis führen (Sobolewski et al., 2019).

Durch die Vaskulopathie kann es zu einer renalen Krise kommen. Durch einen renalen Gefäßschaden kommt es zu fibrotischen Stenosierung und einer überschießenden Freisetzung von Renin. Zusätzlich kann es zu einer Verbrauchskoagulopathie kommen, wodurch die systemische Sklerose mit anderen thrombotischen Mikroangiopathien verwechselt werden kann. Die renale Krise kann mit einem akuten Nierenversagen sowie einem arteriellen Hypertonus einhergehen (Bose, Chiesa-Vottero, & Chatterjee, 2015).

Sowohl renale Krise als auch die pulmonal-arterielle Hypertonie können Erstsymptom einer systemischen Sklerose sein (Bellando-Randone & Matucci-Cerinic, 2017).

## 2.2.2 Vaskulopathie der systemischen Sklerose

Ein zentraler Punkt der Pathophysiologie der systemischen Sklerose ist die Veränderung der kleinen Gefäße, die schon im frühen Krankheitsstadium auftritt (Ho et al., 2014). Im Serum werden Antikörper gegen Endothelzellen nachgewiesen, die Endothelzellen in die Apoptose leitet (Sgonc et al., 2000).

Neben der Schädigung des Gefäßsystems ist bei der systemischen Sklerose weiterhin die Gefäßreparatur defekt. Im Vergleich zur Kontrollkohorte sind geringere Konzentration endothelialer Vorläuferzellen im Blut nachzuweisen. In Mausmodellen der systemischen Sklerose bildeten Vorläuferzellen weniger Gefäße aus (Kuwana & Okazaki, 2014). Es wird angenommen, dass endotheliale Vorläuferzellen nicht adäquat rekrutiert werden können (Asano, 2018). In Studien wurde gezeigt, dass CCN-1, (engl.: „*cellular communication network factor 1*“), ein Protein, das für die Bindung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Blut ans Endothel zuständig ist, an kleinen Gefäßen vermindert exprimiert wird (Saigusa et al., 2015).

In Hautbiopsien zeigten sich bei systemischer Sklerose erhöhte Mengen des proangiogenetischen Faktors VEGF und seiner Rezeptoren. Dies wurde nicht durch Gewebshypoxie und folgender Erhöhung des HIF-1 (engl.: „*hypoxia-inducible transcription factor*“), sondern durch PDGF (engl.: „*platelet derived growth factor*“) und Interleukin-1 $\beta$  vermittelt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die übermäßige Stimulation durch Wachstumsfaktoren zu einer ungeordneten und dysfunktionalen Angiogenese führt (Distler et al., 2004).

Auf der anderen Seite findet sich bei der systemischen Sklerose eine vermehrte Expression von angiostatischen Zytokinen, beispielweise Thrombospondin-1, welches am Endothel der Proliferation entgegenwirkt und Endothelzellen in die Apoptose leitet. Bei Endothelzellen wurde unter Hypoxie vermehrt Thrombospondin-1 freigesetzt (Morgan-Rowe et al., 2011).

Ein weiterer Teil der Vaskulopathie ist die Neigung zur Vasokonstriktion. Typisch für die systemische Sklerose sind erhöhte Spiegel des vasokonstriktiv wirkenden Endothelin-1. Auf der anderen Seite werden Vasodilatoren wie Prostazyklin und Stickstoffmonoxid vermindert exprimiert (Asano, 2018; Kao & Weyand, 2010). Pathologisch zeigt sich eine verdickte Intima, die zu einer Verengung des Lumens führt (Fleming, Nash, Mahoney, & Schwartz, 2009). Darüber hinaus weisen SSc-Erkrankte vermehrt eine Koagulopathie auf. Erhöhte Serumspiegel an von-Willebrand-Faktor, D-Dimeren und Fibrinogen deuten

auf eine Gerinnungs- und Thromboseneigung hin. Darüber hinaus zeigten sich Defekte der Fibrinolyse (Ames et al., 1997).

Klinisch zu untersuchen sind die Gefäßveränderungen mit der Nagelfalzmikroskopie. Bei Zimmertemperatur werden die Erkrankten mit einem Videokapillarskop untersucht. Sowohl die Anzahl der Kapillaren als auch die Morphologie der einzelnen Kapillarschlingen werden beurteilt (Lambova & Müller-Ladner, 2019). Abhängig vom Stadium unterscheidet man verschiedene Muster. Das frühe Muster („*early pattern*“) ist charakterisiert durch eine reduzierte Anzahl von Kapillaren pro Millimeter Nagelfalz (1). Im Muster der aktiven Veränderung („*active pattern*“) zeigen sich vermehrt vergrößerte Kapillaren, Kapillarektasien und Megakapillaren (Lumengröße  $\geq 50 \mu\text{m}$ ). Die Struktur der Kapillaren geht verloren. Außerdem zeigt sich bereits ein geringer Verlust von Kapillaren und Einblutungen ins Kapillarbett (2). Das späte Muster („*late pattern*“) ist definiert durch diffuse Erweiterungen der Kapillaren. Zudem entstehen avaskuläre Bereiche durch den Verlust der Kapillaren (3) (Cutolo et al., 2004; Jung & Trautinger, 2013; Koenig et al., 2008).

Histologisch kann zur Evaluation die Gefäßdichte gemessen werden. Ursprünglich wurde die mikroskopische Gefäßdichtemessung zur prognostischen Evaluation von Brustkrebs konzipiert. Die Gefäßdichte im invasiven Mammakarzinom ist hier ein unabhängiger Risikofaktor für eine Metastasierung (Weidner, Semple, Welch, & Folkman, 1991). Auch in einigen weiteren malignen Erkrankungen wie beispielsweise der chronisch myeloischen Leukämie und dem multiplen Myelom konnte eine Assoziation der Gefäßdichte zum Verlauf gezeigt werden. Eine geringere Gefäßdichte ist hier mit einer erhöhten Überlebensrate bzw. einem besseren Ansprechen auf die Medikation verbunden (Bhatti, Kumar, Dinda, & Dawar, 2006; Korkolopoulou et al., 2003). De-Sà-Earp et al. (2013) fanden in Hautbiopsien bei systemischer Sklerose ein geringeres Gefäßvolumen und eine geringere Dichte im Vergleich zu Gesunden (de-Sà-Earp, Nascimento, Carneiro, Porto, & Monte-Alto-Costa, 2013).

### 2.2.2.1 Raynaud-Phänomen

Eines der klinischen Symptome der Vaskulopathie ist das Raynaud-Phänomen. Hierbei handelt es sich um meist Kälte getriggerte episodische Vasospasmen, meist in den distalen Extremitäten. Es führt zu Blässe, Taubheit oder Schmerzen in den betroffenen Regionen (Block & Sequeira, 2001). Das Raynaud-Phänomen tritt in fast allen Fällen der

systemischen Sklerose auf und meist lange vor anderen Symptomen (Elhai et al., 2015). Bereits zu diesem Zeitpunkt kann auf eine systemische Sklerose gescreent werden. Mittels Nagelpfalzkapillarmikroskopie und spezifischen Antikörpern lässt sich bereits früh mit einer guten Spezifität die Entwicklung einer systemischen Sklerose voraussagen (Koenig et al., 2008; Minier et al., 2014).

### **2.2.3 Autoimmunität**

Das Immunsystem spielt bei der Pathogenese der systemischen Sklerose eine wichtige Rolle. Ungeklärt ist, welche Trigger die Autoimmunität initiiert. Der dauerhafte Gewebeschaden führt zum Beispiel zur Freisetzung von DAMP (engl: „*damage-associated molecular pattern*“), die eine chronischen Reaktion des Immunsystems verursacht, welches über Interaktion mit den Bindegewebszellen wiederum die Fibrose antreibt und schließt somit einen Kreislauf, der zum Progress der Krankheit führt (Ho et al., 2014). In der systemischen Sklerose werden charakteristische Antikörper gebildet, die in den aktuellen Leitlinien als Kriterien für die Diagnose festgelegt sind (Van Den Hoogen et al., 2013). Neben der Diagnostik sind die einzelnen Antikörper mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen assoziiert. Antikörper gegen Endothelzellen sind beispielsweise mit dem Entwickeln einer pulmonalarteriellen Hypertonie assoziiert (Choi & Fritzler, 2016).

#### **2.2.3.1 Langerhans-Zellen**

Parallel zu den Untersuchungen des epidermalen Nervengeflechts im Jahr 1868 entdeckte Paul Langerhans Zellen mit mehreren Ausläufern inklusive eines langen Ausläufers in Richtung der Dermis. Aufgrund der Struktur nahm Paul Langerhans an, es würde sich um Zellen des Nervensystems handeln (Langerhans, 1868). Über die Funktion der Zellen wurde seitdem diskutiert. 1961 beschrieben Birbeck und Kollegen elektronenmikroskopische Granula, die spezifisch in den Langerhans-Zellen (LC) vorkommen (Birbeck, Breathnach, & Everall, 1961). Anhand der charakteristischen Birbeck Granula konnte festgestellt werden, dass Langerhans-Zellen ebenfalls in Organen des Lymphsystems vorkommen (Ruco, Uccini, & Baroni, 1989). Zusammen mit der Erkenntnis, dass Langerhans-Zellen Antigene präsentieren können, wurde der Verdacht geäußert, dass sie eine immunologische Rolle spielen (Silberberg, Baer, & Rosenthal, 1976). Im Vergleich zu anderen dendritischen Zellen nehmen die Langerhans-Zellen

weniger bakterielle Proteine auf und präsentieren sie. Sie können dementsprechend weniger antibakterielle T-Zellen stimulieren. Die Langerhans-Zellen sind jedoch in der Lage, vermehrt regulatorische T-Zellen zu stimulieren und können somit zur Toleranzbildung gegenüber Antigenen beitragen und überschießende Immunreaktionen verhindern (Van Der Aar et al., 2013). Aktuell besteht somit die These, dass die Langerhans-Zellen physiologisch regulierend auf das Immunsystem der Haut wirken (Clayton, Vallejo, Davies, Sirvent, & Polak, 2017).

Zur systemischen Sklerose wurde bezüglich der Langerhans-Zellen bisher nur wenig geforscht. Die Dichte HLA-DR-, ATPase- und OKT6-positiver Langerhans-Zellen war geringer in Biopsien erkrankter Hautabschnitte im Vergleich zu gesunder Haut bei SSc-Erkrankten (Goobar, Fang, Weisman, Zvaifler, & Gigli, 1987).

### **2.3 Diagnose**

Die Diagnose wird anhand der Kriterien (Tabelle 2) gestellt, die durch das ACR (engl.: „*American College of Rheumatology*“) und die EULAR (engl.: „*European League Against Rheumatism*“) 2013 definiert worden sind (Van Den Hoogen et al., 2013). Einerseits werden Symptome (Items) der Fibrosierung im Score miteinbezogen. Die verdickte Haut proximal des Metakarpalgelenks ist hinreichendes Kriterium zur Diagnosestellung einer systemischen Sklerose. Zusätzlich werden Veränderungen der Finger, im Sinne einer Schwellung oder im Endstadium einer Sklerodaktylie, in den Score miteinbezogen sowie Ulzerationen oder Rattenbissnekrosen der Finger. Andererseits werden klinische Zeichen der Vaskulopathie mit Teleangiektasien und dem Raynaud-Phänomen in den Score miteinbezogen. Eine abnormale Nagelpfalzmikroskopie ist ebenfalls Teil des Scores. Als Manifestation der inneren Organe werden pulmonalarterielle Hypertonus als auch eine interstitielle Lungenerkrankung berücksichtigt. Als Laborwerte fließen Autoantikörper ein: Anti-Zentromer-, Anti-Topoisomerase I- oder auch Anti-RNA-Polymerase III-Antikörper. Die Diagnose der systemischen Sklerose wird ab einem Grenzwert von 9 Punkten gestellt (Van Den Hoogen et al., 2013) (Tabelle 2).

Neben der Diagnosestellung können Autoantikörper weiterhin prognostische Bedeutung haben. So konnte in einer retrospektiven Studie gezeigt werden, dass Anti-Zentromer-Antikörper klinisch mit einer pulmonalarteriellen Hypertonie und Anti-Topoisomerase-Antikörper mit einer Lungenfibrose assoziiert sind (Steen, 2005).

Klinisch kann die systemische Sklerose weiterhin anhand ihrer Hautbeteiligung unterteilt werden. Unterschieden werden hier die limitierte von der diffusen Form. Die Hautbeteiligung der limitierten Form der systemischen Sklerose überschreitet nicht die Knie beziehungsweise Ellenbogen. Bei der diffusen Form treten die Hautveränderungen am ganzen Körper auf. Sie ist ebenfalls mit vermehrter Organbeteiligung sowie auch einer höheren Mortalität assoziiert (Hachulla et al., 2021).

Item	Unterpunkt	Wert
Hautverdickung beidseits proximal der Metakarpalgelenke		9
Hautverdickung der Finger (maximal 4 Punkte)	- Geschwollene Finger	2
	- Sklerodaktylie	4
Fingerspitzen (maximal 3 Punkte)	- Ulzerationen	2
	- Rattenbissnekrosen	3
Teleangiektasien		2
Raynaud Phänomen		3
Pathologische Nagelpfalzmikroskopie		2
Pulmonale Manifestationen (maximal 2 Punkte)	- Pulmonalarterielle Hypertonie	2
	- Interstitielle Lungenerkrankung	2
SSc-assoziierte Antikörper	- Anti-Zentromer, Anti-Topoisomerase I oder Anti-RNA-Polymerase III	3

**Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose einer systemischen Sklerose nach ACR/EULAR.** Der Score gilt für Personen mit dem Verdacht auf eine systemische Sklerose. Wenn die Symptome durch andere besser erklärt werden können, sind die Kriterien nicht zur Diagnosestellung geeignet. Sofern keine andere Ursache anzunehmen ist, gilt ein Wert ab 9 als hinreichend für die Diagnosestellung. SSc = systemische Sklerose, RNA = Ribonukleinsäure.

## **2.4 Therapie**

Die genaue Pathogenese der systemischen Sklerose ist bisher noch nicht sicher verstanden. Daher sind die bisherigen Behandlungsansätze symptomatisch und antiinflammatorisch (Sobolewski et al., 2019). Die EULAR hat 2017 ihre Empfehlungen zur Behandlung der systemischen Sklerose aktualisiert. Begonnen werden soll die Therapie so früh wie möglich (Kowal-Bielecka et al., 2017). Meist kommt es bei der systemischen Sklerose bereits ein Jahr nach dem Auftreten des Raynaud-Phänomens zur Beteiligung von Haut und inneren Organen (Jaeger et al., 2016). Wichtiger Bestandteil der Therapie ist daher eine frühe Diagnosestellung sowie ein regelmäßiges Screenen auf Organmanifestationen, um den Progress möglichst frühzeitig mit einer Behandlung zu entschleunigen (Kowal-Bielecka et al., 2017).

### **2.4.1 Immunmodulierende Medikamente**

Bei bestehender und fortschreitender interstitieller Lungenerkrankung wird Cyclophosphamid als erste Wahl empfohlen. Mycophenolat-Mofetil zeigt ebenfalls eine gute Wirkung. Sollten beide Medikamente den Progress nicht kontrollieren können oder ein Organversagen droht, kann eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erwogen werden (Denton & Khanna, 2017; Kowal-Bielecka et al., 2017).

Die Hautmanifestationen können bei Betroffenen mit früher diffuser systemischer Sklerose mit Methotrexat behandelt werden (Kowal-Bielecka et al., 2017).

### **2.4.2 Vasoaktive Therapie**

Zur Behandlung der Vaskulopathie stehen mehrere Medikamente zur Verfügung. Hier werden Kalzium-Antagonisten vom Nifedipin-Typ, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, intravenöse Prostacyclin-Analoga und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten eingesetzt, um die Frequenz und den Schweregrad des Raynaud-Phänomens sowie auch das Auftreten von digitalen Ulzerationen zu reduzieren und deren Abheilung zu fördern (Kowal-Bielecka et al., 2017).

Die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) profitiert ebenfalls durch die vasoaktive Therapie. In schweren Fällen kann außerdem eine Kombination der genannten Medikamente erwogen werden (Kowal-Bielecka et al., 2017).

#### 2.4.2.1 Iloprost bei systemischer Sklerose

Iloprost ist ein synthetisches Prostacyclin-Analogon der zweiten Generation (Negrini et al., 2019). Es bindet vor allem am Prostacyclin-Rezeptor, einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der über die Proteinkinase A seine zellulären Prozesse vermittelt (Truchetet et al., 2012).

Iloprost wirkt am Gefäßsystem und führt hier zur Weitstellung und Aggregationshemmung. Außerdem fördert Iloprost die Fibrinolyse und kann langfristig die Proliferation von Muskelzellen der Gefäße reduzieren (Della Bella et al., 2001; Negrini et al., 2019). Neben den direkten Effekten am Gefäßsystem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Iloprost das Immunsystem modulieren kann. Es reduziert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und hemmt die Expression von Adhensionsmolekülen, was die Migration von Leukozyten erschwert (Della Bella et al., 2001; Mazzone et al., 1996). Während die Wirkung der Gefäßweitung und Aggregationshemmung der Thrombozyten nur für maximal zwei Stunden andauert, lassen sich immunmodulatorische Effekte noch nach einem Monat nachweisen (D'Amelio et al., 2010; Della Bella et al., 2001).

Nach den EULAR-Empfehlungen wird die intravenöse Gabe von Iloprost als Mittel für schwere Raynaud-Symptomatiken sowie zum Abheilen von digitalen Ulzerationen empfohlen, welche im Rahmen der schweren Mikro- und Makrovaskulopathie auftreten können. Als Alternative zu den First-Line-Medikamenten kann es zudem in der Behandlung des pulmonalarteriellen Hypertonus eingesetzt werden (Hughes & Herrick, 2017; Kowal-Bielecka et al., 2017).

Neben der Modulation des Gefäß- und Immunsystems wurde in Bezug auf die systemische Sklerose ebenfalls gezeigt, dass Iloprost die Fibrosierung des Gewebes hemmen kann. Als möglicher Mechanismus konnte gezeigt werden, dass Iloprost die Produktion des profibrotischen Zytokins Connective Tissue Growth Factor hemmt (Stratton et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass unter Iloprost-Therapie der mRSS sinkt. Während in manchen Studien sowohl die limitierte als auch die diffuse Form Verbesserungen zeigten (Foti et al., 2017; Scorza et al., 2001), konnte in anderen Studien der Effekt nur bei der diffusen Form beobachtet werden (Bettoni et al., 2002; Scarsi et al., 2011).

## 2.5 Neuropathie

Eine Neuropathie bezeichnet die Schädigung von peripheren Nerven, verursacht durch unterschiedliche pathologische Mechanismen. Die Symptome einer Neuropathie sind abhängig vom Typ der betroffenen Nervenfasern (Barrel & Smith, 2018).

Die A $\alpha$ -Fasern innervieren die Skelettmuskeln motorisch. Die A $\beta$ -Fasern sind als sensible Fasern für Tast- und Vibrationsempfinden verantwortlich. A $\gamma$ -Fasern tragen über die Innervierung der intrafusalen Skelettmuskeln zur Propriozeption bei. Die kleineren, schwach oder nicht myelinisierten Nervenfasern (A $\delta$ - und C-Fasern) sind für die Thermo- und Nozizeption sowie auch autonome Funktionen zuständig (Tavee & Zhou, 2009) (Tabelle 3).

Fasertyp (nach Erlanger und Gasser)	Faserdurchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Nervenleitgeschwindigkeit (m/s)
A $\alpha$	10 – 20	60 – 120
A $\beta$	7 – 5	40 – 90
A $\gamma$	4 – 8	30 – 50
A $\delta$	2 – 5	10 – 30
B	1 – 3	5 – 20
C	0,5 - 1,5 (keine Myelinisierung)	0,5 – 2

**Tabelle 3: Fasertypen nach Erlanger und Gasser (Pape, Kurtz, & Silbernagl, 2019).** Die verschiedenen Fasertypen sind aufgelistet. Sie werden eingeteilt anhand ihres Faserdurchmessers, der Nervenleitgeschwindigkeit und der Myelinisierung.

### 2.5.1.1 Kleinfaserpathologie

Die A $\delta$ - und C-Fasern sind für die somatosensorische sowie autonome Informationsübertragung zuständig. Die somatosensorische Funktion beinhaltet die Wahrnehmung vor allem von Temperatur und Schmerz. Die Schädigung der somatischen C-Fasern kann sich unterschiedlich präsentieren. Man unterscheidet zwischen positiver und negativer Symptomatik. Von positiven Symptomen wird gesprochen, sobald das tatsächlich Empfundene die erwartete Empfindung eines Gesunden übersteigt. Hier sind vor allem neuropathische Schmerzen zu nennen. Es kommt durch die Nervenschädigung zu spontanen Missempfindungen, die akut einschließend auftreten können, aber auch dauerhaft persistieren können. Vor allem brennende Parästhesien werden angegeben.

Auch nicht schmerzhaft Reize verursachen Schmerzen beim Betroffenen (Allodynie), bzw. leichte schmerzhaft Reize als inadäquat schwere Schmerzen wahrgenommen (Hyperalgesie). Darüber hinaus geben einige Betroffene krampfartige Schmerzen oder Beschwerden eines Restless-Legs-Syndroms an (Mayienne Bakkers, Faber, Hoeijmakers, Lauria, & Merkies, 2014; Schlereth et al., 2019).

Auf der anderen Seite gibt es negativ sensible Symptome, bei denen eine reduzierte Reizwahrnehmung geäußert wird. Temperaturunterschiede oder mechanische Reize werden dabei weniger wahrgenommen (Schlereth et al., 2019; Terkelsen et al., 2017).

Auf der vegetativen Seite wird ein breites Beschwerdebild geboten. Es kann zur Veränderung der Sudomotorik und so zu vermehrtem oder vermindertem Schwitzen kommen. Weiter leiden Erkrankte unter Xerophthalmie und Xerostomie, eine Austrocknung von Auge und Mund. Aufgrund der Fehlinnervation der Gefäße kommt es zur Flush-Symptomatik, erektiler Dysfunktion sowie auch zu orthostatischen Dysregulationen. Ebenfalls betroffen ist der Gastrointestinaltrakt, was sich in Form von Motilitätsstörungen präsentiert (Lacomis, 2002).

Als eigenständiges Krankheitsbild können selektiv die kleinen Fasern in Form einer Kleinfaserneuropathie betroffen sein. Per Definition sind hier nur die A $\delta$ - sowie auch die C-Fasern betroffen (Devigili et al., 2008).

Anhand der Lokalisation der Nervenschäden lässt sich die Pathologie der Kleinfaserneuropathie weiter einordnen. Am häufigsten beginnt die Nervenschädigung in den distalen Extremitäten, vorwiegend an den Füßen und zeigen anschließend ein Fortschreiten in Richtung proximal (längenabhängig). Bei der nicht längenabhängigen Pathologie, treten die Symptome diffus über den Körper verteilt auf (Khan & Zhou, 2012).

## **2.5.2 Diagnostik der kleinen Nervenfasern**

Da die Nervenleitgeschwindigkeiten von den großen Nervenfasern abhängen, sind die Werte bei einer selektiven Schädigung der kleinen Fasern im Normbereich. Für die Diagnostik einer Pathologie der kleinen Fasern ist daher die Anamnese relevant. Diese kann standardisiert anhand eines Fragebogens wie dem *painDETECT* erfolgen (Freynhagen, Baron, Gockel, & Tölle, 2006). Beim Verdacht auf eine

Kleinfaserschädigung sollte die Klinik anhand einer erweiterten elektrophysiologischen Untersuchung wie der quantitativen sensorischen Testung bestätigt werden (Terkelsen et al., 2017). Zusätzlich kann die histologische Analyse der dermalen Nervenfasern die Diagnose stützen (Siao & Cros, 2003).

Die Kleinfaserpathologie ist von der Kleinfaserneuropathie zu unterscheiden. Bei der Kleinfaserpathologie zeigt sich eine pathologische Verminderung in den Hautbiopsien, jedoch haben die Probanden keine Symptome einer Kleinfaserneuropathie. Bei der Kleinfaserneuropathie sind klinische Symptome zur Diagnosestellung erforderlich (Enax-Krumova et al., 2022; Terkelsen et al., 2017; Üceyler, 2016).

### **2.5.2.1 Neurophysiologie**

Um die sensorische Komponente zu messen, kann eine QST durchgeführt werden. Das zugrundeliegende Prinzip ist eine Schwellenwertmessung. An festgelegten Stellen werden Reize bestimmter objektiver Intensität gesetzt. Es soll geäußert werden, sobald der Reiz wahrgenommen werden kann oder ab wann er als schmerzhaft empfunden wird. Gemessen wird in den folgenden Qualitäten: Temperaturempfinden, Berührungs- und Vibrationsempfinden als auch Schmerzempfinden bedingt durch thermale, Druck- oder Stichreize (Rolke et al., 2006; Siao & Cros, 2003).

Eine Möglichkeit zur neurophysiologischen Messung des autonomen Defizits und gängiges Mittel in der Diagnostik der Kleinfaserpathologie stellen sudomotorische Axonreflextests dar. Bei dieser Untersuchung wird Acetylcholin per Iontophorese in die Haut infundiert, um die postganglionären Axone zu stimulieren. Die Schweißproduktion kann mittels eines Sudometers beurteilt werden. Alternativ kann man das Sudometer auch durch digitale Photographien ersetzen und so die Schweißmenge auswerten. Im Vergleich mit den Referenzwerten kann eine Aussage über eine Beteiligung der autonomen Fasern getroffen werden (C. H. Gibbons, Illigens, Centi, & Freeman, 2008; Thaisetthawatkul, Fernandes Filho, & Herrmann, 2013).

### **2.5.2.2 Hautbiopsie**

Neben der funktionellen Überprüfung der Nervenfasern steht die histologische Untersuchung als diagnostisches Mittel zur Verfügung. Mittels Hautbiopsie kann die Nerveninnervation morphometrisch untersucht werden. Trotz des gering invasiven Verfahrens gilt die Methode unter sterilen Bedingungen als nahezu risikofrei. Es sollte

eine ca. 3 mm große Biopsie aus der gewünschten Stelle entnommen werden. Für die Diagnose einer Kleinfaserneuropathie gibt es Normwerte für den lateralen Unterschenkel (Lauria, Hsieh, et al., 2010).

#### 2.5.2.2.1 Epidermale Nervenfaserdichte

Im 19. Jahrhundert beschrieb Langerhans mit einer Goldchlorid-Färbung Nervenfasern, die sich durch in die Epidermis eintraten und dort verzweigten (Langerhans, 1868). In weiteren Studien wurden Nervenfasern mit Methylenblau, Cholinesterase und Silber angefärbt (Ridley, 1969). 1959 wurden die ersten Messungen der epidermalen Nervenfaserdichte vorgenommen. Bereits hier wurde eine von proximal zu distal abnehmende Dichte beschrieben (Arthur & Shelley, 1959). Die frühen Messungen und Ergebnisse der Publikationen variierte jedoch nicht zuletzt wegen methodischen sowie auch technischen Problemen stark. Erst mit Einführungen der Immunhistochemie konnten die epidermalen Nervenfasern zuverlässiger dargestellt werden (Lauria et al., 1999). In der Quantifizierung der epidermalen Nervenfasern setzte sich der Antikörper gegen PGP 9.5 (engl.: „*proteine gene product 9.5*“) durch, eine zytoplasmatisches Protein der Neuronen (Dalsgaard, Ryth, & Haegerstrand, 1989; Lauria et al., 2005; Wilkinson et al., 1989). Durch einheitliche Färbungen und Regeln für die Auswertung der intraepidermalen Nervenfaserdichte konnten nun Referenzdatensätze der Normalbevölkerung entstehen, um somit die intensivere Forschung sowie die klinische Anwendung der Methode zu ermöglichen (Collongues et al., 2018; Kennedy, Wendelschafer-Crabb, & McArthur, 2005; Provitera et al., 2016). Von der EFNS (engl.: „*European Federation of Neurological Societies*“) und der PNS (engl.: „*Peripheral Nerve Society*“) wurde eine Task Force zusammengestellt, die eine generelle Empfehlung zur Durchführung und Auswertung der Hautbiopsien veröffentlichten (Lauria, Bakkers, et al., 2010; Lauria, Hsieh, et al., 2010).

Die epidermale Nervenfaserdichte ist ein gutes diagnostisches Mittel für die Kleinfaserneuropathie (Devigili et al., 2008; McArthur, Stocks, Hauer, Cornblath, & Griffin, 1998). Für die Einordnung bestehen Referenzdatensätze zur Biopsie am Unterschenkel 10 cm oberhalb des Knöchels. Abhängig ist die intraepidermale Nervenfaserdichte vom Alter, dem Geschlecht und der Entnahmestelle der Probe (Collongues et al., 2018; Devigili et al., 2019; Görlach et al., 2020; Lauria, Bakkers, et al., 2010; McArthur et al., 1998). Das Verhältnis der epidermalen Nervenfaserdichte von

Unterschenkel zu Hüfte ist in der gesunden Population konstant. Durch die Beurteilung des Gradienten kann hier also zusätzlich eine mögliche Längenabhängigkeit objektiviert werden (Khan & Zhou, 2012).

In zwei Studien wurde bisher die epidermale Nervenfaserdichte am Unterarm in einer gesunden Kohorte untersucht. Hier wurden mittlere Werte von  $17,07 \pm 6,51$  Fasern/mm ( $n = 55$ ) sowie ein Median von  $15,73$  Fasern/mm ( $n = 26$ ) beschrieben (Chien et al., 2001; Weyer-Menkhoff, Pinter, Schlierbach, Schänzer, & Lötsch, 2019).

In Hautbiopsien von Proband\*innen mit einer diabetischen Kleinfaserneuropathie korreliert die epidermale Nervenfaserdichte negativ mit der Anzahl der Langerhans-Zellen. Postuliert wurde, dass eine höhere Zahl an Langerhans-Zellen einem inflammatorischen Prozess entspricht, der die Schädigung der kleinen Fasern beeinflusst (Casanova-Molla et al., 2012).

#### 2.5.2.2.2 Morphologische Veränderungen der dermalen Nerven

Neben der Dichte der epidermalen Nervenfasern kann die Morphologie der Nervenfasern beurteilt werden (Collongues et al., 2018). Axonale Schwellungen und horizontale Verzweigungen sind frühe Indikatoren für den Verlust von Nervenfasern (Lauria et al., 1999; Lauria et al., 2003).

Neben den somatosensorischen Fasern der Epidermis können autonome Fasern quantifiziert werden. Durch eine Chalkley-Zählung lässt sich histologisch die Innervation der Schweißdrüsen messen und so Aufschluss über die autonome Dysfunktion geben (Chalkley, 1943; Christopher H. Gibbons, Illigens, Wang, & Freeman, 2009; Görlach et al., 2020). Hierfür liegen allerdings keine Normwerte in der Literatur vor.

## **2.6 Neuropathien in der systemischen Sklerose**

### **2.6.1 Beteiligung des peripheren Nervensystems**

Eine Metaanalyse zur neurologischen Beteiligung bei systemischer Sklerose beschreibt sowohl zentrale als auch periphere Beschwerden. Zentral sind vor allem Kopfschmerzen zu nennen. Peripher treten Trigemini neuralgien und Nervenkompressionssyndrome auf, wie beispielsweise das Karpaltunnelsyndrom. Bei 14,25 % der Erkrankten kommt es zu einer sensomotorischen Polyneuropathie (Amaral et al., 2013). Eine weitere Metaanalyse beschreibt eine zusammenfassende Prävalenz von 27,37 % für periphere Neuropathien bei systemischer Sklerose (Almejadi, To, Anderson, & Johnson, 2021).

Histologisch zeigen sich bei der systemischen Sklerose in Nervenbiopsien vermehrte Kollagenablagerungen in Endo- und Perineurium sowie in den Vasa nervorum sowie eine Rarefizierung der Nervenfasern (Di Trapani, Pocchiari, Masullo, Albanese, & Tulli, 1982; Richter, 1954). Es wird angenommen, dass Ödeme und Kollagenablagerungen im Bindegewebe die Nervenfasern komprimieren und deren Schädigung induzieren. Außerdem könnten vaskulitische Prozesse zum Verschluss der Vasa nervorum führen und somit die Degeneration der Axone induzieren. Der langfristige Umbau der Vasa nervorum könnte eine Malnutrition mit Hypoxie der Nervenfasern zur Folge haben. Zusätzlich wird diskutiert, ob bestimmte Autoantikörper der systemischen Sklerose gegen die Axone gerichtet sind und ihnen so schaden (Matucci-Cerinic, Generini, Pignone, & Casale, 1996).

### **2.6.2 Neuropathische Schmerzen**

Die Häufigkeit von neuropathischen Schmerzen bei Personen mit systemischer Sklerose liegt je nach Studie zwischen 26 und 56 Prozent (Bassel et al., 2011; Cuzdan et al., 2018; Merz et al., 2017; Ostojic et al., 2019; Schieir et al., 2010; Sousa-Neves et al., 2018). In diesen Studien zeigte sich, dass die Lebensqualität vor allem bei Betroffenen mit neuropathischen Schmerzen signifikant reduziert ist (Cuzdan et al., 2018; Ostojic et al., 2019).

Das Restless-Legs-Syndrom wird ebenfalls bei der systemischen Sklerose gehäuft beschrieben und ist somit eine weitere Gemeinsamkeit mit der Kleinfaserpathologie (Ostojic, Jovic, & Stojic, 2013; Ostojic et al., 2018; Prado, Allen, Trevisani, Toscano, &

Earley, 2002).

Im Zusammenhang mit der systemischen Sklerose werden Dysautonomien beschrieben. Die Prävalenz der autonomen Dysfunktion bei systemischer Sklerose schwankt jedoch abhängig von der Studie und der verwendeten Messmethode zwischen 14 und 79 Prozent (Amaral et al., 2013).

Der COMPASS31 (engl.: „*composite autonomic symptom score 31*“), ein Fragebogen mit 31 Testitems zur orthostatischen Regulation, Vasomotorik, Sekretomotorik, Pupillomotorik sowie zur Funktion der Blase und des gastrointestinalen Systems, zeigt eine gute Testeffizienz orientierend an der epidermalen Nervenfaserdichte (Devigili et al., 2008; Treister, O'Neil, Downs, & Oaklander, 2015). SSc-Erkrankte zeigten erhöhte COMPASS31-Werte, besonders bei schwerer Beteiligung des Magen-Darm-Traktes (Adler, Russell, Hummers, & McMahan, 2018).

### **2.6.3 Neurophysiologie bei systemischer Sklerose**

Es zeigten sich erhöhte Schwellenwerte auf taktile Reize und Temperatur bei Patienten mit systemischer Sklerose (Schady et al., 1991).

Während noch keine Studie mittels Axonreflextests autonome Dysfunktionen der systemischen Sklerose geprüft hat, wurden bereits in mehreren Studien Betroffene mittels sympathischer Hautreaktion (SSR, engl.: „*sympathetic skin response*“) untersucht. Im Unterschied zu den Axonreflextests mittels Iontophorese wird der Stimulus hier durch einen elektrischen Reiz gesetzt. Dieser wird afferent ins zentrale Nervensystem geleitet. Dort wird auf den Stressor eine Reaktion des Sympathikus generiert, die efferent zur Haut zurückgeleitet wird. Die synchrone Aktivierung der Schweißdrüsen kann in Form von Potentialänderungen der Haut gemessen werden (Baum, 2018).

In mehreren Studien wurde die sympathische Hautreaktion bei Patienten mit systemischer Sklerose durchgeführt. Es zeigten sich pathologische Hautreaktionen als möglicher Hinweis für eine autonome Dysfunktion als Teil der systemischen Sklerose (Badry et al., 2018; Schady et al., 1991; Zakrzewska-Pniewska et al., 1999).

### **2.6.4 Hautpathologie bei systemischer Sklerose**

Morphologisch zeigen sich bei der systemischen Sklerose Veränderungen in den kutanen Nervenfasern. In erkrankten wie auch in gesunden Hautarealen zeigen die Nervenfasern Verdickungen sowie Unterbrechungen (Pawlowski, 1963).

In einer Studie wurde bei Erkrankten eine reduzierte epidermale Nervenfaserdichte an der distalen Hüfte sowie des Unterschenkels gemessen. Die Betroffenen zeigten weder Symptome einer Neuropathie noch pathologische Nervenleitgeschwindigkeiten. Die Gefäßdichte korrelierte positiv mit der epidermalen Nervenfaserdichte (Provitera et al., 2005). Nach Therapie mit intravenösem Iloprost stieg die epidermale Nervenfaserdichte bei den Erkrankten. Es wurde geschlossen, dass eine durch Malnutrition reduzierte Nervenfaserdichte durch das vasoaktive Medikament gesteigert werden könne (Provitera et al., 2007).

Bei der Untersuchung von Muskelbiopsien bei systemischer Sklerose mit Muskelschwäche zeigten sich unter dem Elektronenmikroskop eine verdickte und gedoppelte Basalmembran, eine Aktivierung des Endothels und vermehrte Perizyten (Ellezam et al., 2021; Siegert et al., 2021).

## **3 Material und Methoden**

Im Folgenden soll die Methodik der Studie mit den benutzten Materialien, den verschiedenen Kohorten und der Probenverarbeitung beschrieben werden.

### **3.1 Material**

Die verwendeten Chemikalien, Geräte, Software sind im Anhang unter 12.1, 12.2 und 12.3 gelistet.

### **3.2 Studienkollektiv**

Unsere Studie wurde in Kooperation mit der rheumatologischen Abteilung der Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt. Die Rekrutierung erfolgte durch das Universitätsklinikum Frankfurt. Eine SSc-Kohorte umfasste Proband\*innen mit systemischer Sklerose. Kriterium für die Aufnahme in die SSc-Kohorte war die Diagnosestellung einer systemischen Sklerose anhand der aktuell empfohlenen Kriterien der ACR/EULAR des Jahres 2013 (Van Den Hoogen et al., 2013). Ausschlusskriterien anhand von Vorerkrankungen existierten nicht, eventuelle Vorerkrankungen wurden miterfasst. Als Kontrollkohorte wurden Personen rekrutiert, die nicht an systemischer Sklerose erkrankt sind.

24 Testpersonen der SSc-Kohorte erhielten eine intravenöse Iloprost-Therapie mit 20 µg für 7-10 Tage. Von allen Proband\*innen wurde eine Stanzbiopsie entnommen. Drei Monate nach Therapie wurde eine zweite Biopsie entnommen. Bei fünf Testpersonen wurde keine zweite Biopsie entnommen. Den sieben Kontrollpersonen wurde jeweils eine Biopsie entnommen (Abbildung 1).

### **3.3 Ethikvotum**

Für die Studie liegt ein positives Ethikvotum des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität Frankfurt (454/17) und des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (85/16) vor.

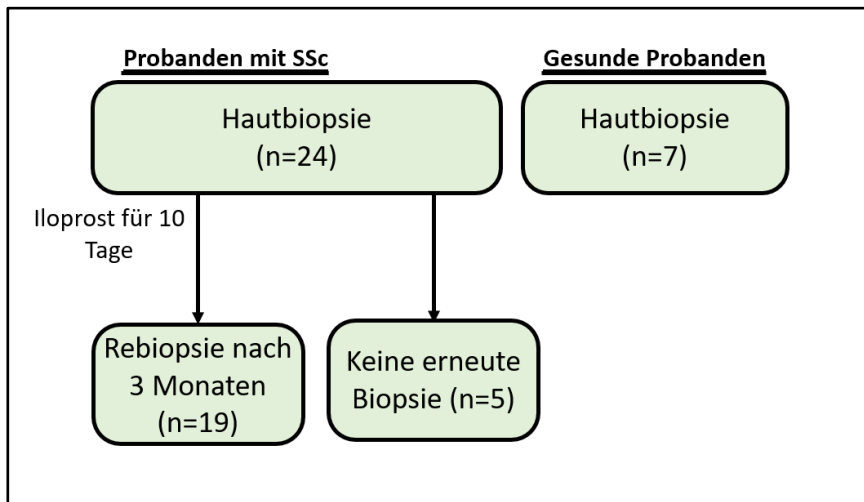


Abbildung 1: Studiendesign. Verteilung der SSc- und Kontrollkohorte. SSc = systemische Sklerose.

### 3.4 Klinische Untersuchung, Serologie und Kapillarmikroskopie

Die klinische Untersuchung, die Abnahme der Serologie sowie die Kapillarmikroskopie wurde durch die Universitätsklinik Frankfurt durchgeführt.

Vor der Therapie wurde bei der SSc-Kohorte ein mRSS erhoben. Durchgeführt wurde es gemäß dem aktuellen Standard (Khanna et al., 2017). Die Erhebung des Scores erfolgte durch erfahrene Rheumatologen. Zusätzlich wurden serologisch die Erkrankten auf Anti-Zentromer-Antikörper CenpA/B (engl.: „centromere proteine A/B“) sowie Anti-Topoisomerase-I geprüft.

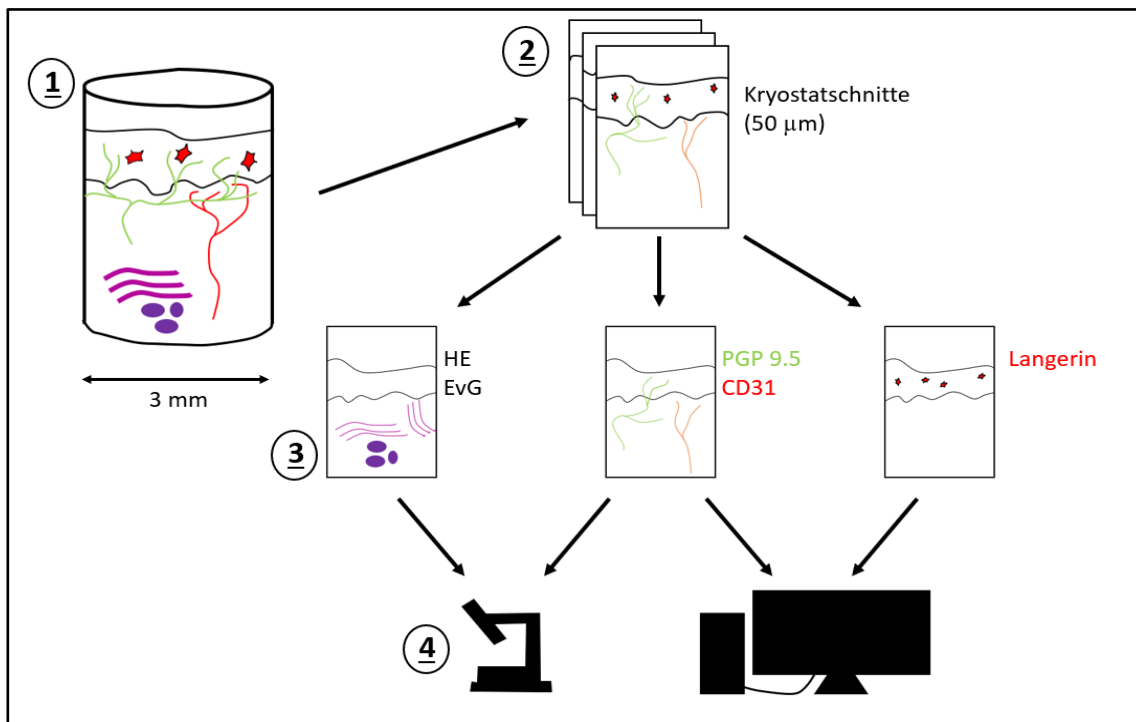
Weiterhin wurde vor Therapie eine Kapillarmikroskopie der gesunden und erkrankten Kohorte durchgeführt. Bei Raumtemperatur wurde bei den Patienten in sitzender Position an den Fingern 2-5 mit Immersionsöl die Mikroskopie durchgeführt. Es wurden die Kapillare pro mm Länge gezählt. Genutzt wurde das Gerät Optilia Digital Capillaroscopy System (Optilia Inspection Systems AB, Sweden).

### 3.5 Probenentnahme, Fixierung und Lagerung der Proben

Zur histologischen Untersuchung der Haut wurden Hautstanzbiopsien mit 3 mm Durchmesser in Frankfurt entnommen. Die Biopsieentnahme erfolgte 15 cm proximal des Processus styloideus ulnae des Unterarms.

Bei Raumtemperatur wurde das Biopsat nach der Entnahme für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Daraufhin wurde die Probe dreimal für zehn Minuten

mit 0,1 M Phosphatpuffer behandelt. Im Anschluss wurde die Probe in 10% Saccharose-Lösung bei 4 °C für mindestens 24 Stunden, jedoch maximal einen Monat, überführt. Das Gewebestück wurde auf ein mit Tissue-Tek benetztes Korkplättchen aufgeblockt. Das Biopsat wurde in 2-Methylbutan in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde es bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.



**Abbildung 2: Gewinnung und Bearbeitung der Proben.** Zuerst wurden Hautstanzbiopsien mit 3 mm Durchmesser entnommen (1). Die Langerhans-Zellen sind in der Epidermis als rote Zellen schematisch dargestellt. Die dermal-epidermalen Nervenfasern sind als grüne Linien und die dermalen Gefäße als rote Linien dargestellt. Als lilafarbene Linien sind die Kollagenfasern dargestellt und als lilafarbene Kreise die Schweißdrüsen. Im nächsten Schritt wurden die Proben in 50 µm Dicke geschnitten (2). Anschließend wurden die Schnitte in HE und EvG als Standardfärbung sowie mittels Immunfluoreszenz gegen die Antigene PGP 9.5 / CD31 und Langerin angefärbt (3). Die Standardfärbungen sowie die epidermalen Nervenfasern wurden am Mikroskop manuell ausgewertet. CD 31 sowie Langerin wurden mit dem AxioScan digitalisiert und anschließend automatisiert ausgewertet (4). HE = Hämatoxylin/Eosin; EvG = Elastika van Gieson; PGP = *proteine gene product*; CD = *cluster of differentiation*.

### 3.6 Kryostatschnitte

Die Proben wurden am Kryostaten (Leica CM 1950 Kryostat, Leica Biosystems, Wetzlar) geschnitten. Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und die Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG) wurden jeweils zwei Schnitte mit 6-7 µm Dicke auf Objektträger aufgezogen und für 15 Minuten getrocknet. Für die Doppelfärbung PGP 9.5 / CD31 wurden von jeder Probe jeweils sechs 50 µm dicke Schnitte angefertigt und in eine 24-Well-Platte überführt. Für die Langerin-Färbung wurden zwei Schnitte mit jeweils 10

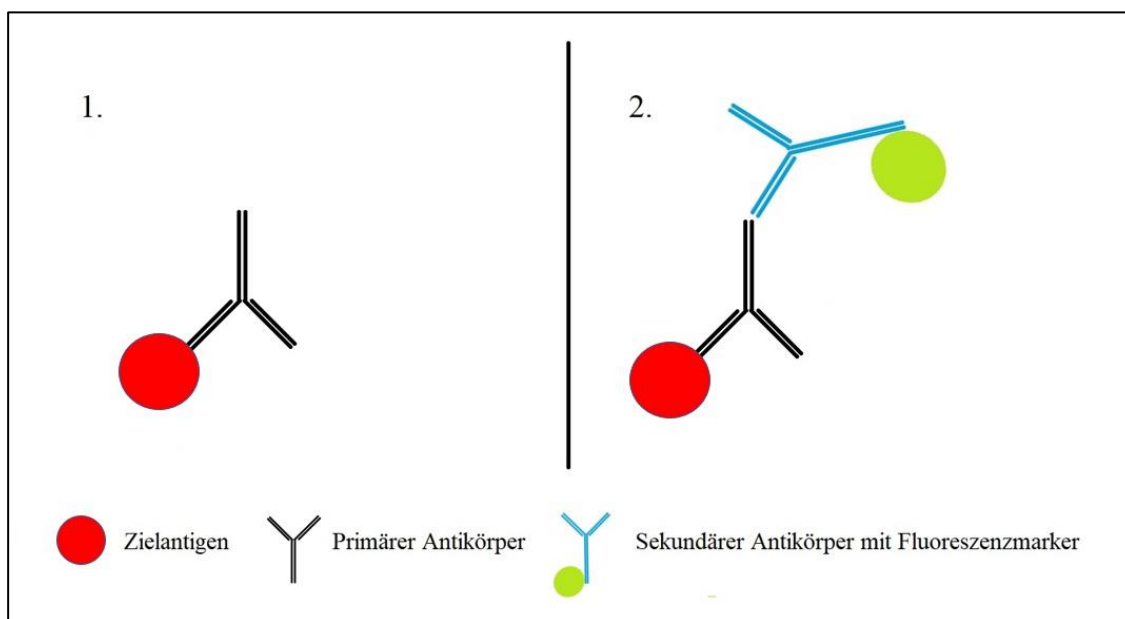
µm Dicke geschnitten und auf Objektträger aufgezogen.

### 3.7 Histologische Färbungen

Die histologische Beurteilung des Krankheitsprogresses erfolgte durch Standardfärbemethoden (HE, EvG). Die HE- und EvG-Färbungen wurden mit dem Färbeautomaten Medite Slide Stainer TST44C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem Deckmittel Cytoseal XYL eingedeckt und getrocknet.

### 3.8 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Darstellung bestimmter Proteine im Schnitt wurde das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz (IF) genutzt. Der erste Schritt beruht auf einem primären Antikörper, der an die Zielstruktur bindet. Im zweiten Schritt bindet der mit Fluoreszenzmarker gebundene Sekundärantikörper an den primären Antikörper. Somit sind die Zielstrukturen fluoreszierend markiert und können mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden (Donaldson, 2015) (Abbildung 3).



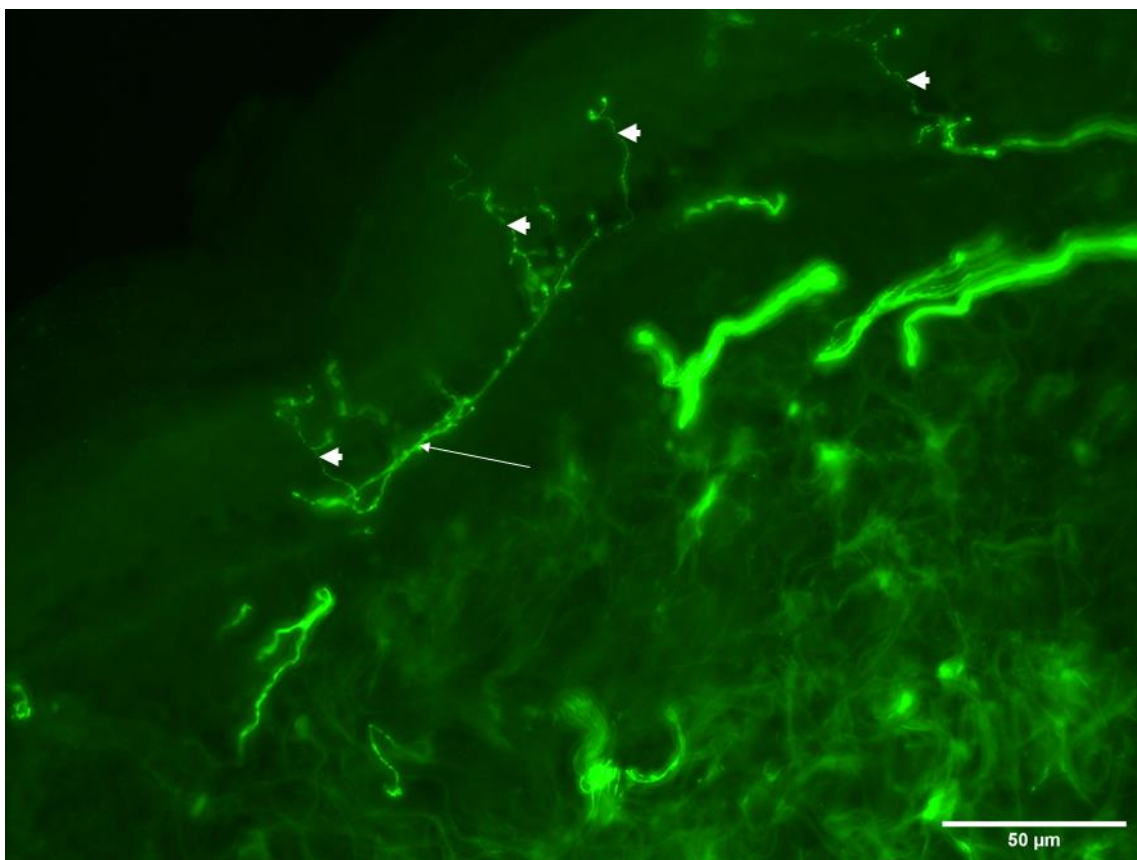
**Abbildung 3: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz (nach Im et al. 2019).** Im ersten Schritt bindet der primäre Antikörper an das Zielantigen. Ein sekundärer Antikörper, welcher mit einem Fluorochrom konjugiert wurde, bindet im zweiten Schritt an den primären Antikörper. Durch die Prozedur wurde das Zielantigen indirekt mit einem fluoreszierenden Marker verbunden und kann nun visuell vom restlichen Schnitt abgegrenzt werden.

### 3.8.1 Epidermale Nerven und Gefäße

#### 3.8.1.1 Antikörper

Ziel der Färbung war die Visualisierung und die räumliche Zuordnung der Nervenfasern und der Gefäße in der Haut.

Der neuronale Marker PGP 9.5 ist eine Ubiquitin C-terminale Hydrolase, die auf der Oberfläche sämtlicher Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert wird (Dalsgaard et al., 1989). Hiermit lassen sich myelinisierte und nicht myelinisierte Nervenfasern darstellen (Kennedy et al., 2005).



**Abbildung 4: Epidermale Nervenfasern bei 40-facher Vergrößerung.** Das Bild zeigt den dermal-epidermalen Übergang eines PGP 9.5-gefärbten Schnittes. Erkennbar ist der subepidermale Nervenplexus (Pfeil) sowie einige epidermale Nervenfasern (Pfeilköpfe).

Zunächst wurden verschiedene Gefäßmarker an den Dickschnitten ausgetestet. In Publikationen zur Darstellung der Gefäßdichte wurde einerseits CD31 verwendet (Fox et al., 1995; Potts, Eberhard, & Salama, 2014; Sohn, Suh, Wang, Freeman, & Gibbons, 2020). Bei CD31 handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein, welches vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird (Horak et al., 1992; Müller

et al., 2002). Neben den Endothelzellen exprimieren ebenfalls myeloische sowie auch megakaryozytische Zellen CD31 (Albelda, Muller, Buck, & Newman, 1991). Neben CD31 gelten ebenfalls CD34 und Endomucin als Gefäßmarker (Depner et al., 2016; Henze et al., 2014).

CD34, ein transmembranöses Phosphoglykoprotein, gilt vor allem als Marker für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Neben den Stammzellen wird CD34 ebenfalls von Zellen des Interstitiums, Vorläuferzellen des Epithels und Endothels und weiteren exprimiert (Sidney, Branch, Dunphy, Dua, & Hopkinson, 2014).

Als weiterer Gefäßmarker gilt das Sialomucin Endomucin. Neben Blutgefäßen wird Endomucin ebenfalls in Lymphgefäßen exprimiert (Kuhn et al., 2002) (siehe Tabelle 4).

### **3.8.1.2 Etablierung einer doppelten IF-Färbung zur Darstellung der dermalen Gefäße und Nervenfasern**

Es wurde eine Doppelfärbung von Nervenfasern und Gefäßen an den Hautschnitten etabliert. Zur Färbung der Schnitte wurde die Free-Floating-Methode verwendet. Hierbei werden die Schnitte in eine 24-Well-Platte gegeben und schwimmen während des gesamten Färbeprozesses in Flüssigkeit.

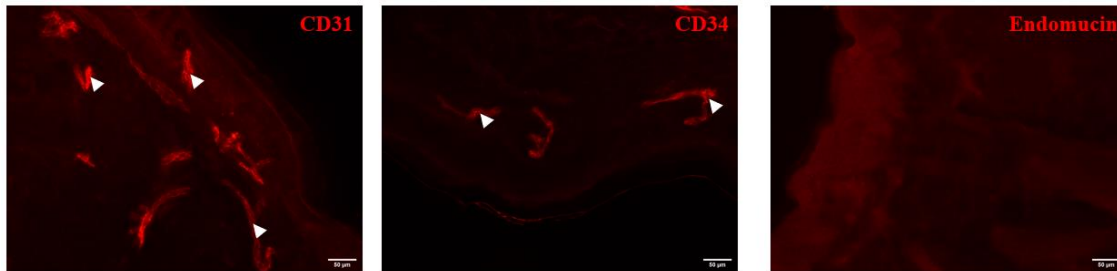
Während bei den Nervenfasern der Anti-PGP 9.5 Antikörper gewählt wurde, wurden zur Darstellung der Gefäße die drei Gefäßmarker CD31, CD34 und Endomucin in Probeschnitten getestet.

Die Kombination der verschiedenen Gefäßmarker mit PGP 9.5-Antikörpern wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet (1:50; 1:100; 1:200; 1:500). Die Inkubationszeiten der primären und sekundären Antikörper wurden in verschiedenen Längen getestet (Primärer Antikörper: 2 Stunden / 1 Tag; Sekundärer Antikörper: 1 Tag / 2 Tage). Es wurden außerdem verschiedene Agenzien zur Verbesserung der Antigen-Strukturen genutzt. Glycin wurde genutzt, um an den Aldehyd-Gruppen in den Schnitten zu binden. Hierdurch konnte eine artifizielle Bindung der primären Antikörper an die Aldehyd-Gruppen unterbunden werden (Rosas-Arellano et al., 2016). Außerdem wurde Normal-Goat-Serum eingesetzt. Das Normalserum setzt sich an Bindungsstellen des Schnittes und blockiert das Ansetzen der Antikörper. Dies reduziert die unspezifische Hintergrundfärbung (Ambrosius & Lupp, 1987) (Protokolle siehe Anhang).

Im Vergleich der Testschnitte konnten mit Antikörpern gegen CD31 in der Verdünnung 1:500 die kleinen Gefäße am besten gefärbt werden, während die Hintergrundfärbung

gering blieb und somit ein guter Kontrast entstand. Unter CD34 und Endomucin konnten die Gefäße nicht ausreichend angefärbt werden. Bei Erhöhung der Antikörperkonzentration bzw. Verlängerung der Einwirkzeit kam es zu einer erhöhten Hintergrundfärbung, sodass eine ausreichende Kontrastierung zur Analyse nicht erreicht werden konnte. Der Anti-CD31-Antikörper wurde somit in der Studie verwendet.

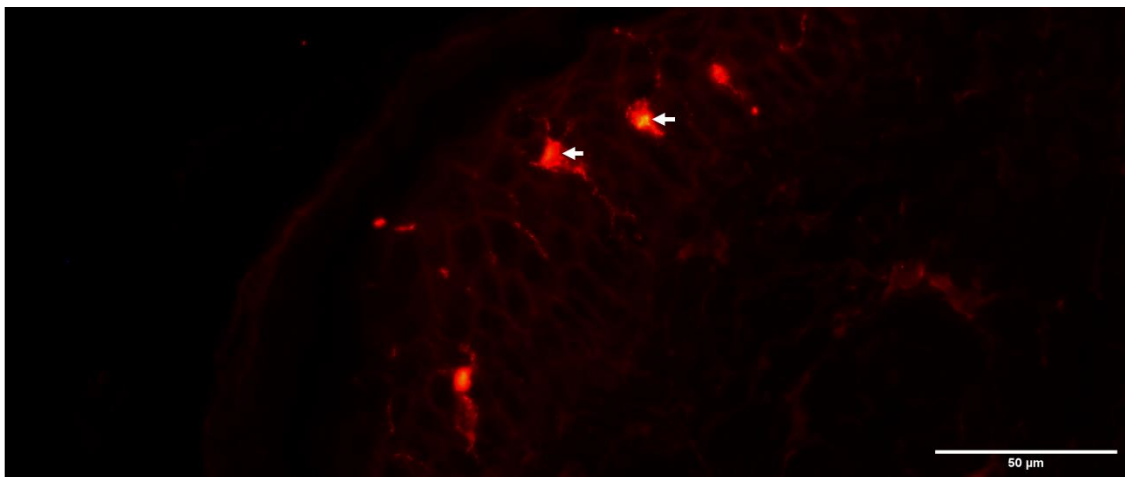
Das Deckmedium der Schnitte enthielt DAPI (4,‘6-Diamidin-2-phenylindol). Es ist ein fluoreszierendes Molekül, welches an die Zellkerne bindet (Kapuscinski, 1995).



**Abbildung 5: Darstellung der Hautgefäße mit Immunfluoreszenzfärbung.** Bei Antikörper gegen CD31 und CD34 Darstellung der Gefäße (Pfeilköpfe). Bei Endomucin ist keine spezifische Anfärbung zu erkennen. Aufgrund der kräftigen Anfärbung und guten Kontrastierung zum Hintergrund wurde CD31 als Antikörper für die Studie gewählt.

### 3.8.2 Darstellung von Langerhans-Zellen

Langerin (CD207) ist ein Typ 2 Lektin, das von Langerhans-Zellen exprimiert wird. Es gilt als spezifischer Marker der Langerhans-Zellen (Lau, Chu, & Weiss, 2008; Séguier, Bodineau, Godeau, Pellat, & Brousse, 2003).

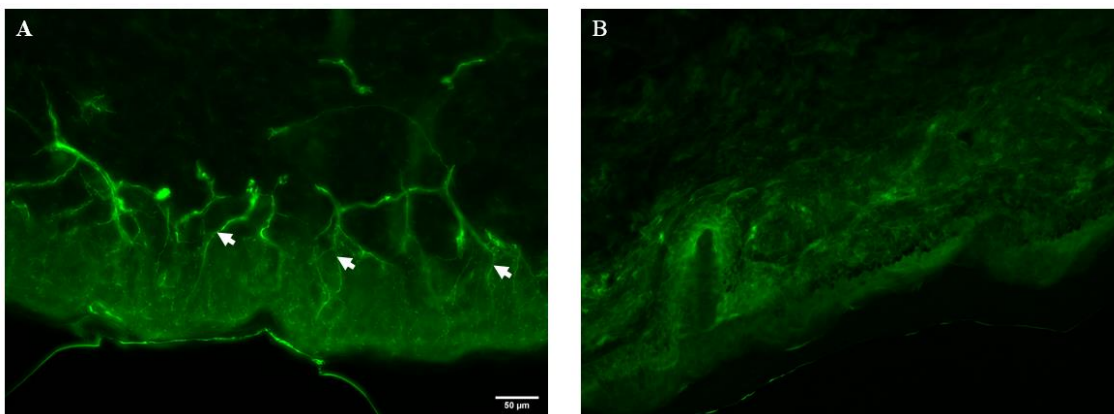


**Abbildung 6: Darstellung der Langerhans-Zellen mit Immunfluoreszenzfärbung.** Epidermis mit angefärbten Langerhans-Zellen mit Antikörper gegen CD207 (Pfeile).

### 3.8.3 Regenerierende Fasern

Weiterhin sollte geprüft werden, ob es im Rahmen der systemischen Sklerose zur vermehrten Regeneration von Nervenfasern kommt. Hierzu sollte eine Färbung mit dem Antikörper gegen GAP43 (engl.: „*Growth-associated Proteine 43*“) verwendet werden. Zur automatisierten Quantifizierung der GAP43-positiven Fasern sollte eine Doppelfärbung mit Anti-Kreatinkinase-MNF116-Antikörpern (CKMNF116, engl.: „*creatine kinase MNF 116*“) etabliert werden. CKMNF116 wird in den Keratinozyten des Stratum basales der Epidermis exprimiert (Prieto, Lugo, & McNutt, 1996).

Unter Variation der Einwirkzeit der Primär- und Sekundärantikörper, der Verdünnungen und der Waschprozeduren konnte keine ausreichende Kontrastierung der Fasern zum Hintergrund hergestellt werden. Die Färbung wurde daher nicht in die Auswertung aufgenommen.



**Abbildung 7: Darstellung von Nervenfasernregeneration.** Mit Antikörpern gegen GAP43 konnte bei Probefärbungen (A) eine gute Darstellung der regenerierenden Fasern erreicht werden, zeigte sich in den Studienschnitten (B) keine gute Anfärbung der Fasern. GAP = Growth-Associated Proteine.

<u>Primäre Antikörper</u>	<u>Zielstruktur</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Lot-Nr.</u>
<b>Polyclonal rabbit IgG anti-PGP 9.5</b>	Axone (Dalsgaard et al., 1989)	Zytomed	<b>1:500</b>	W574
<b>Monoclonal mouse IgG anti-CD31</b>	Endothelzellen (Horak et al., 1992)	DAKO	1:50	
			1:100	
			1:200	
			<b>1:500</b>	
Mouse IgG anti-CD34	Endothelzellen (Henze et al., 2014)	DCS	1:50	Y933
			1:100	
			1:200	
Monoclonal rat IgG anti-Endomucin	Endothelzellen (Samulowitz et al., 2002)	eBioscience	1:100	
			1:200	
			1:500	
Monoclonal rabbit IgG anti-GAP43	Regenerierende Nervenfasern (Galosi et al., 2018)	abcam	1:50	GR42490-43
			1:100	
			1:200	
			1:500	
Monoclonal mouse IgG anti-CKMNF116	Keratinocyten, v.a. Str. basale (Prieto et al., 1996)	DAKO	1:50	
			1:100	
			1:200	
<b>Polyclonal Goat IgG anti-Langerin/CD207</b>	Langerhanszellen	R&D Systems – biotechnie	<b>1:200</b>	KQJ0118 111

**Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper.** Die in der Studie verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind fett markiert. IgG = Immunglobulin, PGP = Proteine Gene Product, CD = Cluster of Differentiation, GAP43 = Growth Associated Proteine 43, CKMNF116 = Kreatinkinase MNF116.

<u>Sekundäre Antikörper</u>	<u>Zielstruktur</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Lot-Nr.</u>
<b>Alexa Fluor 488</b> (Goat anti-rabbit IgG)	Polyclonal rabbit IgG anti-PGP 9.5 Monoclonal rabbit IgG anti-GAP43	Invitrogen	<b>1:500</b>	1981125
			1:1000	
<b>Alexa Fluor 568</b> (Goat anti-mouse IgG)	Monoclonal mouse IgG anti-CD31 Mouse IgG anti-CD34 Monoclonal mouse IgG anti-MNF116	Invitrogen	<b>1:500</b>	2014175
			1:1000	
Alexa Fluor 568 (Goat anti-rat IgG)	Monoclonal rat IgG anti-Endomucin	Invitrogen	1:500	870966
			1:1000	
<b>Alexa Fluor 555</b> (Donkey Anti-Goat IgG)	Polyclonal Goat IgG anti-Langerin	Invitrogen	<b>1:200</b>	

**Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper.** Die in der Studie verwendeten Antikörper und Verdünnung sind fett markiert. IgG = Immunglobulin, PGP = Proteine Gene Product, GAP43 = Growth Associated Proteine 43, CD = Cluster of Differentiation, CKMNF116 = Kreatinkinase MNF116.

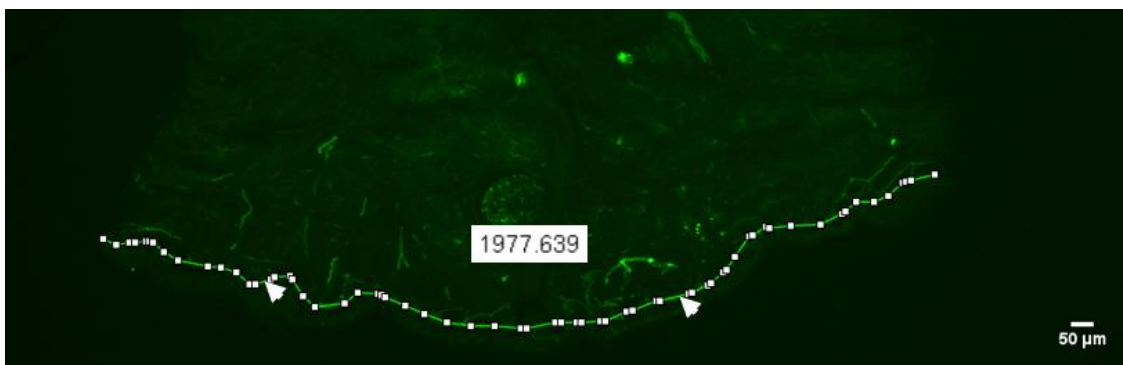
## 3.9 Auswertung

### 3.9.1 Morphometrische Auswertung der dermalen Nervenfasern

Die Fluoreszenzmikroskopie wurden mit dem Leica DM 2000 Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt, welche mit einer Digitalkamera Leica DFC450 C und der Software Leica Application-Suite (Version 4.7.1) ausgestattet ist. Es wurde eine Kalibrierung der Software zur Bestimmung des Verhältnisses von Pixel zu Meter vorgenommen.

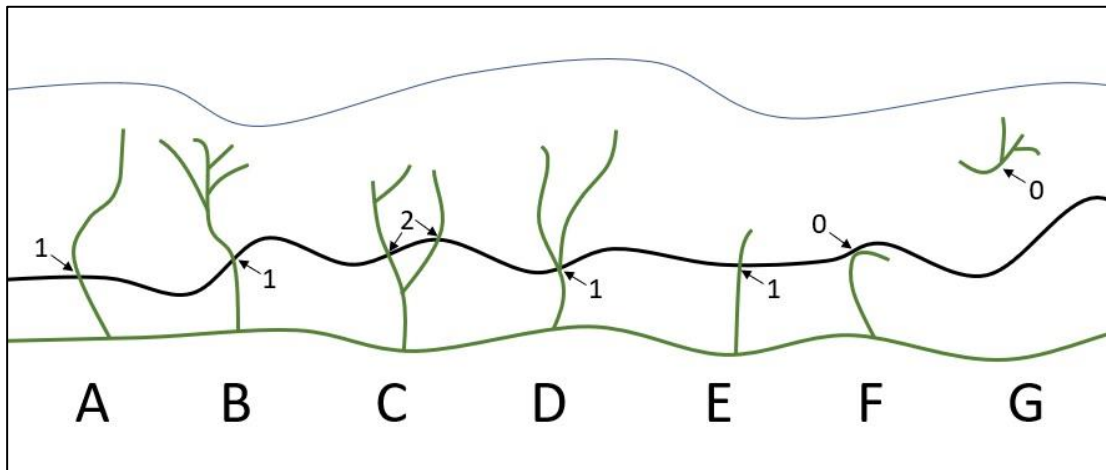
#### 3.9.1.1 Epidermale Nervenfaserdichte

Zuerst wurden die PGP 9.5/CD31-Schnitte auf ihre intraepidermale Nervenfaserdichte untersucht. Die Auswertung wurde anhand der aktuellen Empfehlungen der European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (EFNS/PNS) durchgeführt (Lauria, Hsieh, et al., 2010). Die Schnitte wurden für den Untersuchenden verblindet.



**Abbildung 8: Ausmessung der Epidermislänge an PGP9.5 gefärbten Hautschnitten.** Hier wird die exemplarische Messung der Länge durch die Leica Application Suite dargestellt. Die grüne Linie (Pfeilköpfe) ist der gemessene Pfad.

Die Übertritte einzelner Nervenfasern an der dermal-epidermalen Übergangszone wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung gezählt. Nicht gewertet wurden Aufzweigungen oder Fragmente oberhalb der Übergangszone (siehe Abbildung 9). Die Anzahl der Schnitte wurde durch die Länge der Epidermis dividiert, um so die intraepidermale Nervenfaserdichte (Anzahl/mm) zu erhalten. Ausgewertet wurden sechs Schnitte pro Probe (Lauria, Hsieh, et al., 2010).



**Abbildung 9: Auswertung der intraepidermalen Nervenfasern (modifiziert nach Lauria et al., 2005).** Dargestellt sind die Nervenfasern (grün), die Basalmembran (schwarz) sowie die äußerste Hautschicht (grau). Der einfache Übertritt einer Nervenfaser wird einfach gewertet (A). Sofern sich die Nervenfaser erst distal der Basalmembran verzweigt, wird sie einfach gewertet (B). Abzweigungen proximal der Basalmembran mit separatem Übertritt werden jeweils einzeln gezählt (C). Ist die Abzweigung auf Höhe der Basalmembran, zählt sie nur einfach (D). Sobald eine Nervenfaser die Basalmembran nur knapp überschreitet, wird sie gezählt (E). Nervenfasern, die die Basalmembran erreichen, jedoch nicht in die Epidermis übertreten, werden nicht gezählt (F). In der Epidermis befindliche Nervenfasern ohne erkennbaren Übertritt werden nicht gezählt (G).

## 3.9.2 Auswertung der kleinen Gefäße und Langerhans-Zellen

### 3.9.2.1 Digitalisierung der Schnitte

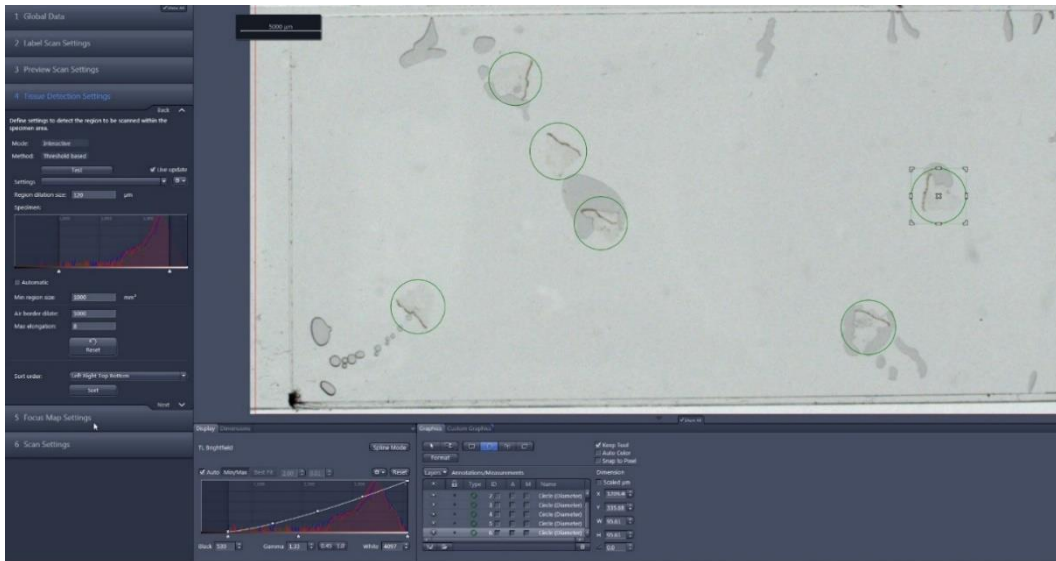
Die Gefäßflächendichte und die Langerhans-Zell-Dichte wurden automatisiert durch ein Bildanalyseprogramm ausgewertet. Hierfür sind digitalisierte Bilder der Schnitte in ausreichend hoher Qualität nötig. Mittels eines ZEISS Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) zusammen mit der Software ZEN 2.6 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) wurden die PGP9.5/CD31- und Langerin-gefärbten Schnitte eingescannt.

Um oberflächliche Verunreinigungen der Schnitte zu minimieren, wurde sie zuerst mit alkoholischer Lösung oberflächlich gereinigt. Als nächstes wurden sie in einen Tray, die Ablagemöglichkeit des Axio Scans, eingespannt.

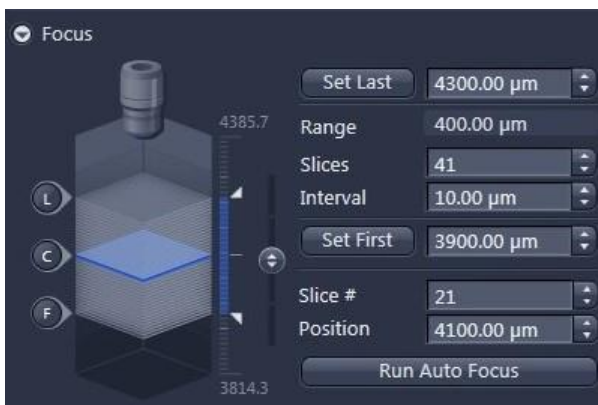
Über die Software ZEN 2.6 wurde der Scanner bedient. Für jede Färbung wurde ein Scanprofil erstellt. Zuerst wurden Preview Scans der Schnitte gemacht, Lichtbilder der Beschriftung des Objektträgers sowie auch der Schnitte selbst. Anschließend wird der zu scannende Bereich erfasst. Für immunhistochemische Färbungen mit ausreichendem Kontrast besitzt der Axio Scan eine automatische Gewebserkennung. Bei Fluoreszenzbildern ist im Lichtbild kein ausreichender Kontrast. Daher musste hier die zu scannende Fläche manuell markiert werden (Abbildung 10).

Um die Schärfe des Schnittes einzustellen, besitzt der Axio Scan eine Autofokusfunktion. Mittels eines Referenzkanals wird eine Höhe bestimmt, in der der Schnitt scharf darzustellen ist. Als Referenzkanal wurde hierfür DAPI gewählt. Falls mit der Autofokusfunktion (Abbildung 11) nicht die gewünschte Schärfe erreicht wurde, besteht die Möglichkeit, manuell die Höhe festzulegen.

Im letzten Schritt wurden die zu scannenden Kanäle eingestellt. Für PGP 9.5 mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 wurde der Kanal mit der Wellenlänge 488nm (grün) gewählt. Die Primärantikörper CD31 und Langerin wurden jeweils mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 568 (rot) kombiniert. Im Kanal des Axio Scans mit der Wellenlänge 568nm wurde keine Fluoreszenz erfasst. Es wurde daher auf den Kanal der Wellenlänge 555nm ausgewichen, welcher aufgrund seiner Nähe zur Wellenlänge des Sekundärantikörpers die Fluoreszenz ebenfalls erfassen konnte. Als zweiter bzw. dritter Kanal wurde DAPI (blau) gewählt (Abbildung 12).



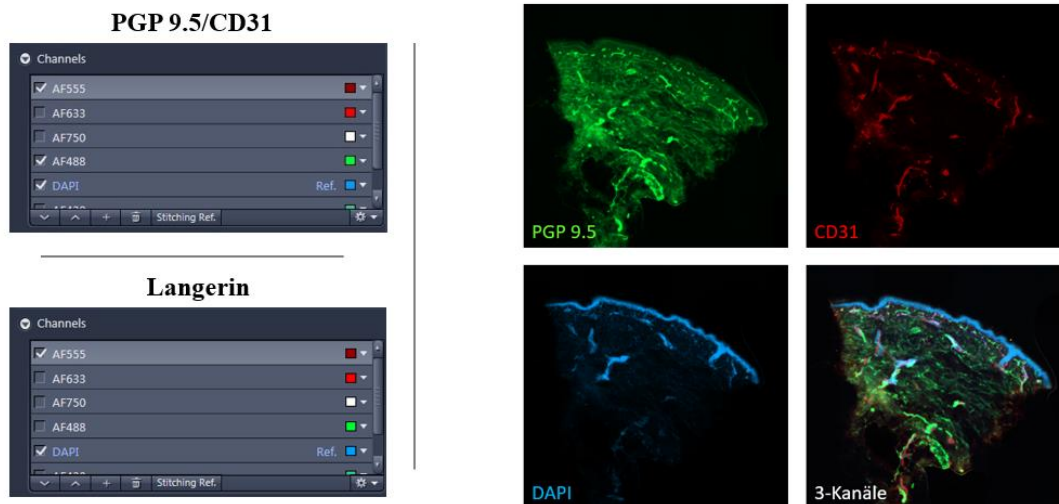
**Abbildung 1011: Manuelle Markierung der IF-Schnitte.** Der Scanner würde ohne eine Markierung der Schnitte die gesamte Fläche des Objektträgers aufnehmen. Da die IF-Schnitte auf dem Lichtbild nur geringen Kontrast zum Hintergrund aufweisen, greift die automatische *Tissue Detection Funktion* des Axio Scan nicht. Daher werden die Schnitte manuell markiert (grüne Kreise). Nun werden ausschließlich die markierten Bereiche gescannt.



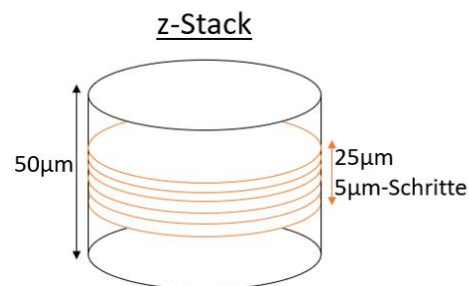
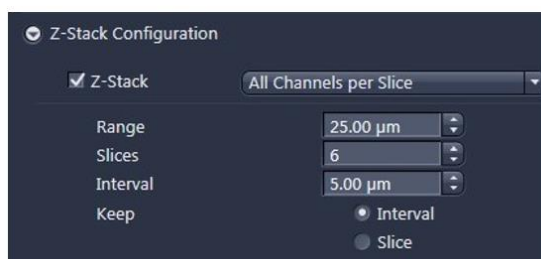
**Abbildung 1110: Autofokus.** Für den Autofokus wurde ein Bereich eingestellt in welcher Höhe der Scanner die Schärfe einstellen soll. Falls der Punkt zur Scharfstellung nicht gefunden wird, kann dieser Bereich gegebenenfalls nachjustiert werden.

Zusätzlich wurde bei den PGP 9.5/CD31-Schnitten ein z-Stack produziert. Es handelt sich hierbei um das Übereinanderlegen mehrerer Schnitte. Hierzu erfasste der Scanner um die per Autofokus ermittelte Höhe in einem Bereich von 25µm in 5µm Schritten jeweils einen Scan und lagerte diese übereinander (Abbildung 13). Daher konnte die Dicke des 50µm Schnittes genutzt und zusätzlich mehr Tiefe des Schnittes analysiert werden.

Die gescannten Schnitte wurden im CZI-Format gespeichert. Zur Auswertung wurde das CZI in den PNG-Format konvertiert. Die Bildanalyse wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Sowohl das Programm als auch die benötigten Plug-Ins stehen online zur freien Verfügung (Link: <http://imagej.nih.gov/ij/>).



**Abbildung 12: Fluoreszenzkanäle.** Die Fluoreszenzwellenlängen wurden jeweils für die entsprechenden Färbungen gewählt und wurden getrennt gescannt. So bestand im Nachhinein die Möglichkeit, sie sowohl einzeln als auch übereinander projiziert zu analysieren.



**Abbildung 13: z-Stack.** Die PGP 9.5/CD31-Schnitte wurden als z-Stack gescannt. Beim z-Stack werden im Bereich von 25µm um die fokussierte Höhe 6 Scans im Abstand von 5µm erzeugt und anschließend übereinander projiziert.

Um die digitalen Pixel der gescannten Schnitte in metrische Einheiten zu transformieren, wurden festgelegte Strecken an vier verschiedenen Schnitten von zwei Proben gemessen, zum einen in Millimeter mittels des Mikroskops über die Leica Application-Suite und zum anderen in Pixel in den digitalen Bildern mittels ImageJ. Ein Pixel entsprach einer Länge von 0,000 227 5 Millimetern.

### 3.9.2.2 Analyse der Gefäßdichte

In dieser Studie wurde zur Analyse der Gefäßflächendichte mittels ImageJ die Gefäßfläche pro Fläche gemessen.

Als erstes wurde die ROI (engl.: „*region of interest*“) ermittelt. Es wurde ein einheitlich definiertes Areal unterhalb der Epidermis definiert. Die Basalmembran wurde als apikaler Startpunkt festgelegt. Als Tiefen wurden 225µm (VD225) und 500µm (VD500) festgelegt, womit sich an den Publikationen zur Gefäßdichte in der Haut orientiert wurde (Provitera et al., 2005; Sohn et al., 2020).

Zur Markierung der Dermis wurde im ersten Schritt die Basalmembran manuell nachgefahren. Um diese Linie wurde nun durch ein Macro, eine automatische Abfolge bestimmter Befehle, um jeden Punkt dieser Linie ein Kreis mit dem Radius der gewünschten Tiefe erstellt. Im nächsten Schritt wurde das Bild außerhalb dieser zusammengesetzten Kreise ausgeschnitten (Abbildung 14).

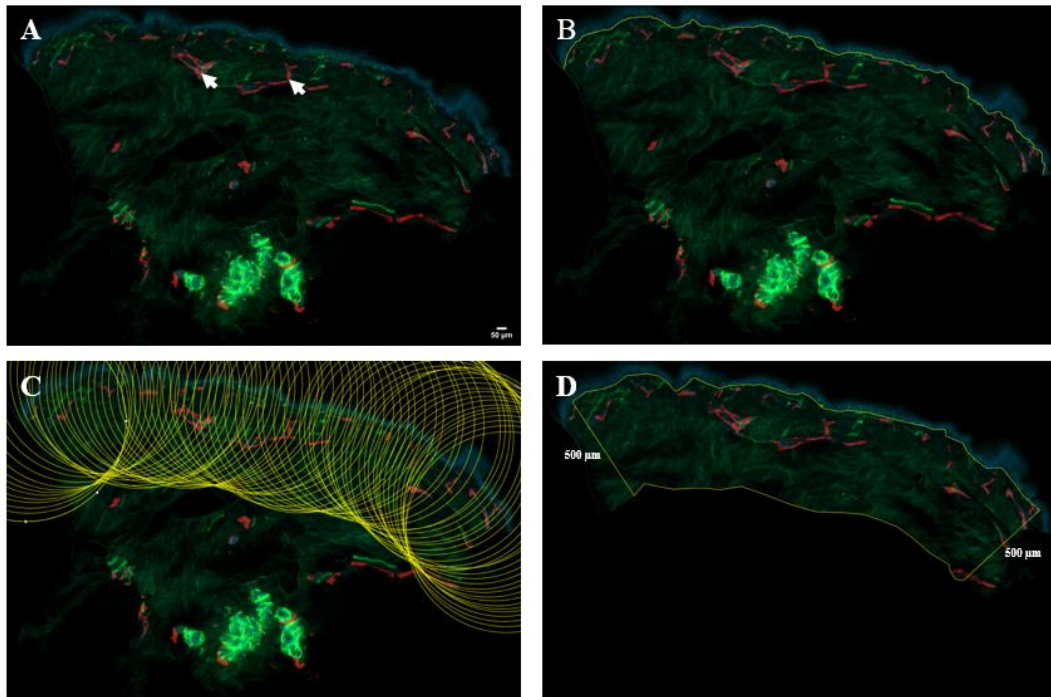
Die Tiefe wurde als senkrecht zur Basalmembran definiert. An den Seiten stand nun jeweils Dermis über, die nicht die gewünschte Tiefe hatte. Durch manuelle Messungen der Tiefe wurde ermittelt, ab welchem Bereich der Schnitt die gewünschte Tiefe hatte. Bis zu diesem Bereich wurden die Seiten abgeschnitten.

Die ROI ist nun definiert durch den Schnitt an den Seiten und in der Tiefe sowie apikal bis zur Basalmembran. Dieser Bereich wurde nun erneut manuell markiert, der Hintergrund ausgeschnitten und die Fläche gemessen.

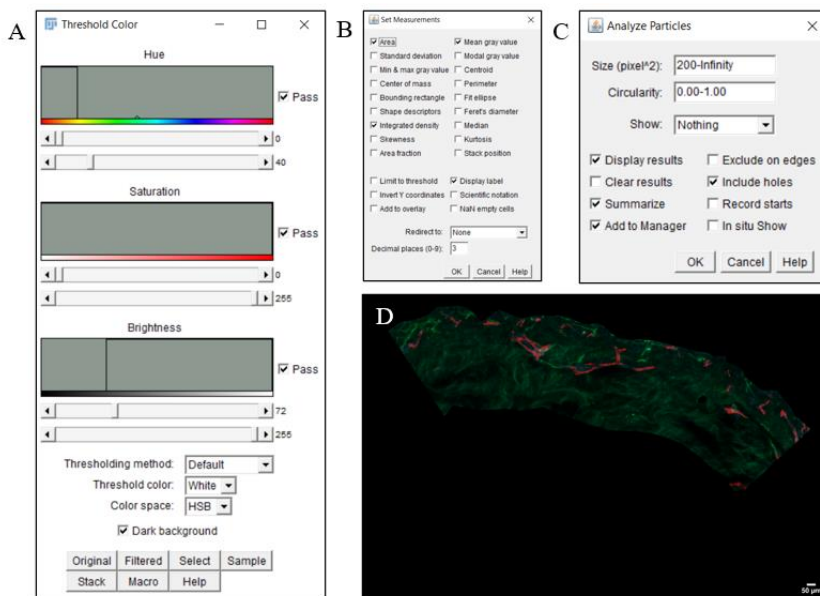
Die Messung der Gefäßfläche in dieser ROI orientierte sich an der Arbeit von Henze et al. (Henze et al., 2014). Um Gefäße von restlichem Gewebe darzustellen, wurde die Funktion Color Threshold mit ImageJ genutzt. Anhand eines Schwellwertes der Farbe, der Intensität und der Helligkeit wurde das Bild in „Gefäß“ und „nicht Gefäß“ getrennt. Die Fläche der Gefäße wurde dann gemessen (Abbildung 15).

Anschließend wurde die Fläche der „Gefäß“-Pixel gemessen und ins Verhältnis zur Pixelfläche des bestimmten Dermisbereichs gesetzt, wodurch die Flächendichte in Prozent errechnet wurde ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ ).

Für die gesamten Analysen wurden identische Schwellenwerte genutzt. Ausgewertet wurden sechs Schnitte pro Probe. Alle Messungen wurden von einem verblindeten Untersucher durchgeführt.



**Abbildung 14: Analyse der Gefäßdichte: Bestimmung der ROI.** Das Bild zeigt einen un bearbeiteten Schnitt mit subepidermalen Gefäßen (Pfeile) (A). Ausgewertet werden die Gefäße unterhalb der Epidermis (blau). Im ersten Schritt wird die Basalmembran, die untere Grenze der Epidermis manuell umfahren (B). Anschließend werden durch ImageJ automatisch Kreise um die Linie generiert (C). Der Radius der Kreise entspricht der Tiefe der ROI (hier 500 $\mu$ m). Die Kreise werden zu einer Gesamtfläche zusammengefügt und das Bild außerhalb der Fläche ausgeschnitten. Im letzten Schritt wird an beiden Seiten die Bereiche abgeschnitten, deren Tiefe kleiner als 500 $\mu$ m (225 $\mu$ m) ist. Hierfür wird senkrecht zur Basalmembran in die Tiefe gemessen (D). Es werden nun die seitlichen Flächen sowie auch die Epidermis ausgeschnitten. ROI = „region of interest“.



**Abbildung 15: Farbschwellwertmessungen mit ImageJ.** Das Bild zeigt die Einstellung des *Threshold Color* zur Detektion der Gefäße (A). Zur automatischen Auswertung des binären Bildes wurden die dargestellten Einstellungen festgelegt (B, C). Das dargestellte Bild zeigt die fertig geschnittene ROI (D).

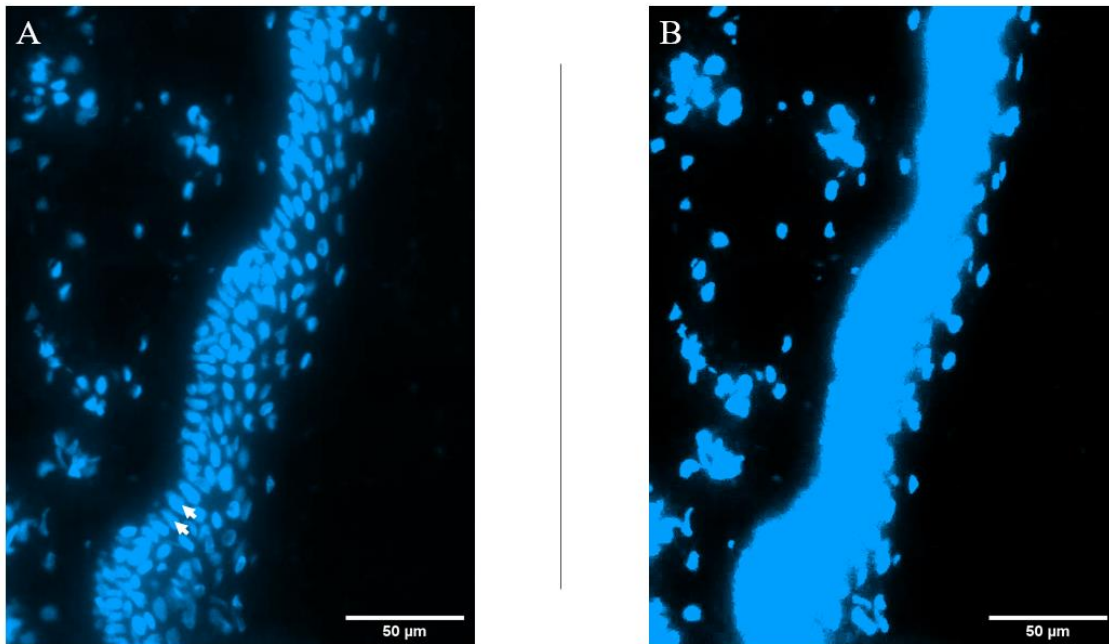
### 3.9.2.3 Analyse der der Langerhans-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden der Färbungen des Schnittes mit DAPI und Langerin zur Auswertung in ein jeweils getrenntes Bild exportiert.

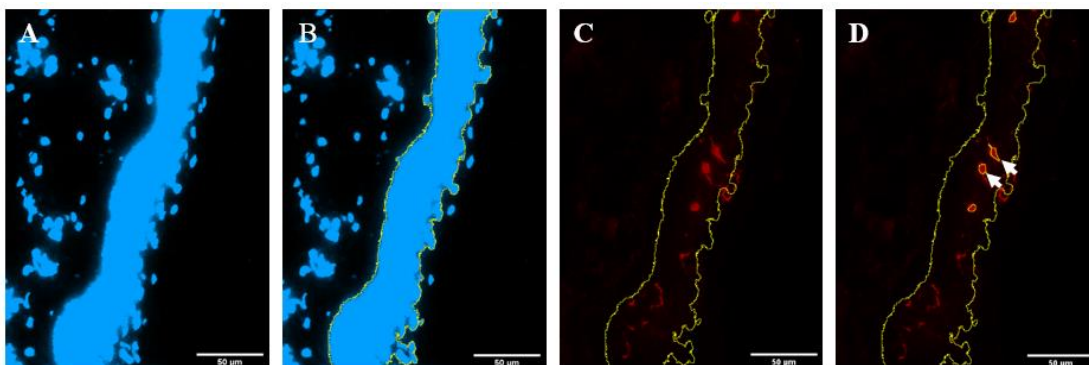
Durch DAPI wurde die Epidermis gefärbt. Beim Export des DAPI-Bildes wurde der Weiß-Wert herabgesetzt und der Gamma-Wert hochgesetzt. Dadurch visualisierte man die Epidermis als homogene blaue Fläche (Abbildung 16).

Zur Auswertung wurde zunächst die ROI bestimmt. Da durch DAPI die Zellen der Epidermis gefärbt werden, wurde DAPI zur automatischen Markierung der Epidermis genutzt. Mittels des Color Threshold konnte diese Fläche per Schwellwertsystem vom restlichen Bild abgegrenzt werden. Die Fläche wurde gemessen und die Markierung der Fläche gespeichert.

Die Markierung wurde nun auf das Bild des Langerin-Kanals übertragen. Der Bereich außerhalb der Markierung wurde ausgeschnitten. Um die Langerhans-Zellen zu zählen, wurde das Bild mittels Color Threshold Farbe, Intensität und Helligkeit in Langerhans-Zellen und nicht-Langerhans-Zellen binär getrennt. Für die Fläche, die als Langerhans-Zelle gewertet wurde, wurde 80  $\mu\text{m}$  als Mindestgröße festgelegt. Im Anschluss an die automatische Messung wurden manuell auf Artefakte kontrolliert. Flächen, die morphologisch keiner Langerhans-Zelle entsprachen oder durch Hintergrundfärbung bedingt waren, wurden von der Zählung ausgeschlossen (Abbildung 17).



**Abbildung 16: Einstellung der Epidermis zur automatischen Flächenerkennung.** Die einzelnen Zellen (Pfeile) (A) wurden durch Herabsenken des Weißwertes und Steigerung der Gamma-Werte zu einer homogenen Fläche (B). Dies ermöglicht dem Bildanalyse-Programm ImageJ die automatische Erfassung der epidermalen Fläche.



**Abbildung 17: Auswertung der Langerhans-Zell-Dichte mit ImageJ.** Im ersten Schritt werden vom DAPI-Bild (A) mittels der Schwellwertfunktion die epidermale Fläche markiert (B). Im nächsten Schritt wird die Markierung über das Langerin-Bild gelegt (C). Innerhalb dieser Fläche wird nun erneut mit der Schwellwertfunktion die Langerhans-Zellen (Pfeile) gezählt (D).

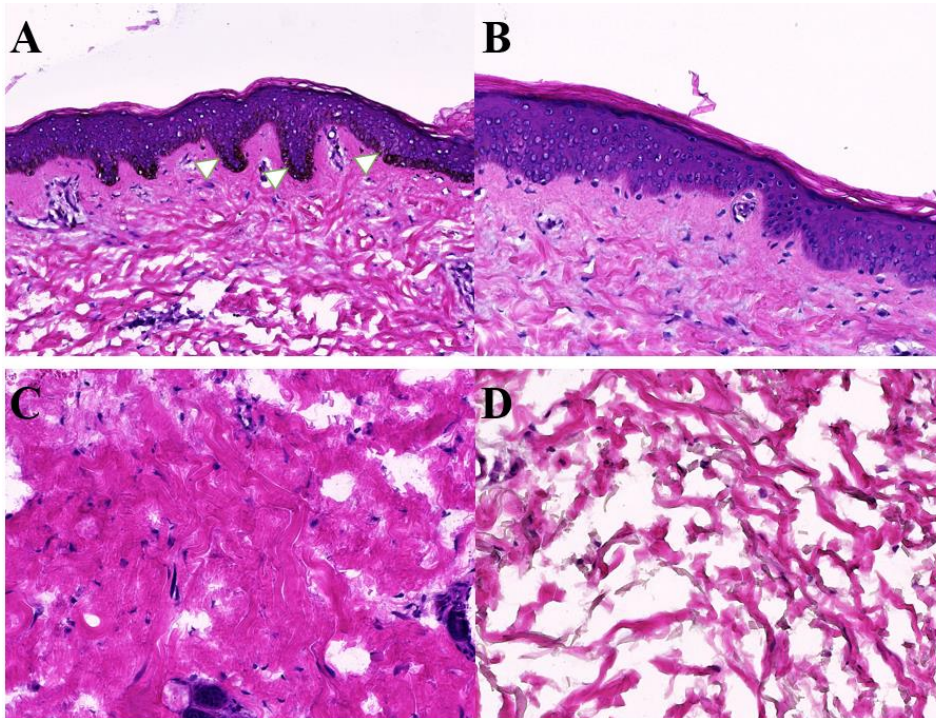
### 3.9.3 Histologische Analyse der Hautbeteiligung mit einem SSc-Hautscore

Die Auswertung der HE- und EvG-gefärbten Schnitte wurde an einem Nikon Eclipse 80i Lichtmikroskop durchgeführt.

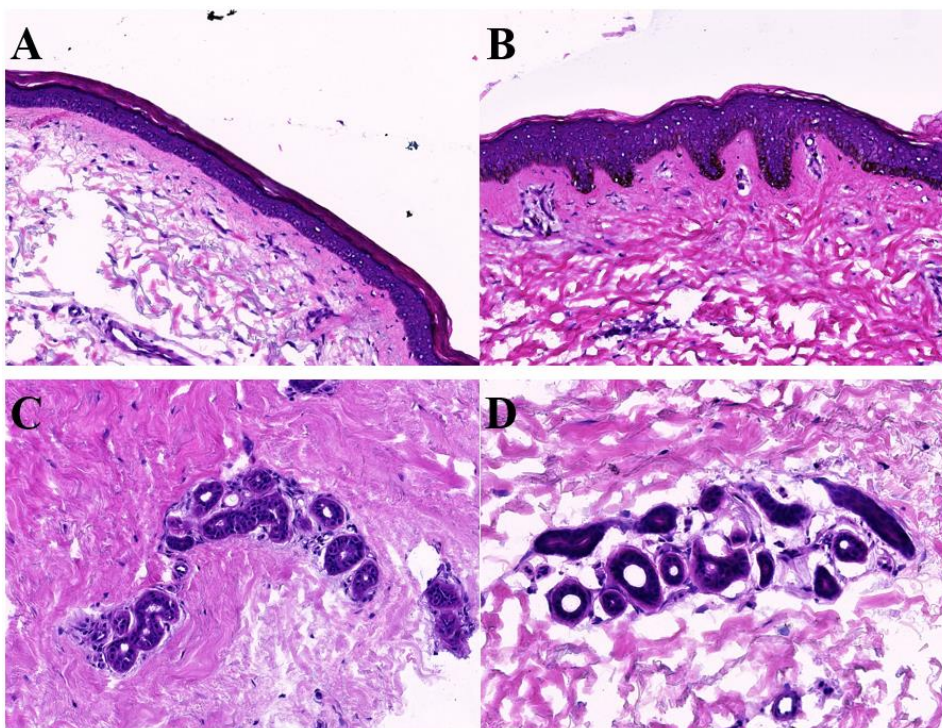
Bei der Auswertung des Krankheitsprogresses der Haut wurde sich an einer Publikation von Praet et al. (2011) orientiert, die Merkmale zur Evaluation des Hautprogresses untersuchten (Van Praet et al., 2011). Es wurde zum einen die Epidermis begutachtet. Auf einer visuellen Analogskala bis 10 (VAS-10) wurde die epidermale Pigmentation bewertet. Es wurde zudem geprüft, ob eine Pigmentinkontinenz vorlag. Die epidermale Dicke wurde anhand der Schichten zwischen zwei Reteleisten, die Ausstülpung der Epidermis in die Dermis, beurteilt. Die Beurteilung erfolgte semiquantitativ. Weniger als drei Schichten ergaben null Punkte, drei bis vier Schichten ergaben einen Punkt, fünf bis sechs Schichten ergaben zwei Punkte und mehr als sechs Schichten zählten drei Punkte. Weiterhin wurde beurteilt, ob die dermalen Papillen verstrichen waren oder Parakeratosen zu finden waren. Beurteilt wurden zum anderen die Schweißdrüsen. Es wurde auf Einschließung von Schweißdrüsen oder Verlust der Ausführungsgänge geachtet. Zur Beurteilung der Gefäße wurde geprüft, ob eine Proliferation der Intima tiefliegender dermaler Gefäße oder Teleangiectasien erkennbar waren. Bezüglich der inflammatorischen Komponente in der Haut wurden die mononukleären Infiltrate semiquantitativ beurteilt. Infiltrate kleiner als fünf Zellen wurde mit null Punkten bewertet, für fünf bis neun Zellen gab es einen Punkt, für zehn bis 50 Zellen zwei Punkte und für mehr als 50 Zellen drei Punkte.

Zusätzlich wurde die Hyalinisierung des Kollagens auf einer VAS-10 bewertet. Das Vorliegen von Kalzifikationen und Fibroplasien wurde geprüft. Bei der Fibroplasie wurde zusätzlich in drei Gruppen unterteilt, keine Fibroplasie, milde Fibroplasie und ausgeprägte Fibroplasie (Tabelle 6).

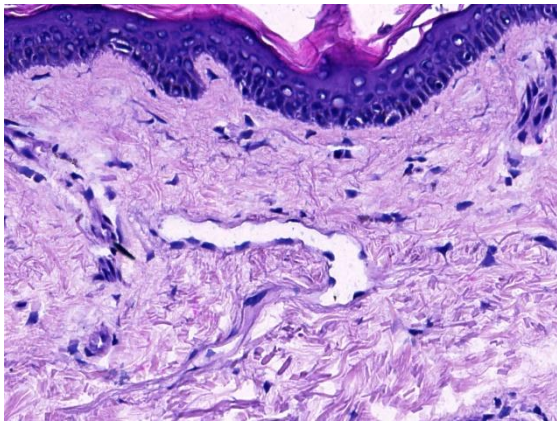
Die Untersuchungen wurden verblindet von drei Untersuchenden unter der Anleitung des Dermatopathologen Prof. Dr. Reginald Wolf durchgeführt.



**Abbildung 18: Hautpathologie I.** Histologisch wurde im Stratum basale (Pfeilspitzen) die Pigmentierung bewertet. Schnitt A weist im Vergleich zu Schnitt B eine hohe Pigmentierung auf. In der Dermis wurde eine Fibroplasie als gesteigerte Kollagenablagerung evaluiert. Schnitt C weist hier eine hohe Menge an Kollagen im Vergleich zu Schnitt D auf.



**Abbildung 19: Hautpathologie II.** Die dermal-epidermale Grenze wurde auf ihre Papillen untersucht. Schnitt A zeigt im Vergleich zu Schnitt B einen Verlust der Papillen und eine somit lineare dermale-epidermale Grenze. Im Vergleich zum lockeren Gewebe um die Schweißdrüse in Schnitt D zeigt sich die Schweißdrüse in Schnitt C dicht von Kollagen umgeben.



**Abbildung 20: Teleangiektasie.** In der Abbildung zeigt sich subepidermal ein aufgeweitetes Gefäß im Sinne einer Teleangiektasie.

<u>Kriterium</u>	<u>Färbung</u>	<u>Skala</u>
Epidermale Pigmentation	HE	Ordinal – VAS (0-10)
Hyalinisiertes Kollagen	EvG	Ordinal – VAS (0-10)
Anzahl der epidermalen Zellschichten	HE	Ordinal – Semiquantitativ (Zellschichten: <3; 3-4; 5-6; >6)
Mononukleäre Infiltrate	HE	Ordinal – Semiquantitativ (Anzahl der Zellen: <5; 5-9; 10-50; >50)
Fibroplasie	HE	Ordinal – keine, mild oder ausgeprägt
Einschluss der Schweißdrüsen durch Kollagen	HE	Nominal
Kalzifikation	HE	Nominal
Verlust der Anhangsgebilde	HE	Nominal
Verlust der epidermalen Papillen	HE	Nominal
Proliferation der tiefliegenden Arteriolen	HE	Nominal
Parakeratosen	HE	Nominal
Pigmentinkontinenz	HE	Nominal
Teleangiektasien	HE	Nominal

**Tabelle 6: Hautscore bei der systemischen Sklerose.** Anhand von 13 Kriterien wurde ein histologischer Score ermittelt, um den Krankheitsprogress zu quantifizieren. HE = Hämatoxylin/Eosin, VAS = Visuelle Analog Skala, EvG = Elastica-van-Gieson.

### 3.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism 9 (San Diego, California, USA). Zu Beginn wurden die Variablen mithilfe des Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Im Anschluss wurden die Variablen epidermale Nervenfaserdichte (END), Gefäßflächendichte mit 225  $\mu\text{m}$  Tiefe (VD225), Gefäßflächendichte mit 500  $\mu\text{m}$  Tiefe (VD500), Langerhans-Zell-Dichte sowie der Hautscore innerhalb der Gruppen auf ihre Mittelwertsunterschiede geprüft. Als weitere Variablen wurden Alter, Krankheitsdauer, der mRSS, die Werte der Nagelpfalzmikroskopie sowie das Antikörperprofil mit ausgewertet. Die Veränderung von vor zu nach Therapie wurde mittels des abhängigen t-Tests geprüft. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde der Wilcoxon-Test angewandt. Bei den Mittelwertsunterschieden zwischen SSc- und Kontrollkohorte wurde der unabhängige t-Test und bei nicht normalverteilten Variablen der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakteristika der Kohorten

Die Kontrollkohorte umfasste 7 gesunde Personen, im Schnitt mit einem Alter von 51,6 ( $\pm 18,35$ ) Jahre, zu 71% weiblich. Die mittlere Kapillardichte an der Nagelpfalz betrug 11,5 ( $\pm 4,6$ ) Kapillare/mm (Tabelle 7).

Probe	Alter bei Biopsie (Jahre)	Geschlecht	Nagelpfalzmikroskopie (Kapillare/mm)
15	58	männlich	13,375
16	58	weiblich	12
17	83	weiblich	12
18	56	weiblich	12,5
19	38	männlich	9,75
20	42	weiblich	n.a.
21	26	weiblich	9,125

**Tabelle 7: Kontrollkohorte ohne Systemische Sklerose.**

Dem gegenüber wurde eine Kohorte mit 24 Proband\*innen mit systemischer Sklerose gestellt. Das mittlere Alter bei der ersten Biopsie betrug 55,8 ( $\pm 11,5$ ) Jahre. 91,7 % sind weiblich. 91,7 % litten unter der limitierten Form der systemischen Sklerose, 8,3 % unter der diffusen Form. Die durchschnittliche Krankheitsdauer beträgt 13,2 ( $\pm 8,4$ ) Jahre. Die mittlere Kapillardichte der Nagelpfalz betrug 4,7 ( $\pm 2,9$ ) Kapillare/mm. Bei fünf Proband\*innen wurde keine erneute Biopsie durchgeführt. Bei drei Proband\*innen ist die Krankheitsdauer nicht bekannt. Bei einer Probandin ist das Alter nicht bekannt (Tabelle 8).

Probe	Alter (m/w)	Krankheits- dauer (Jahre)	Haut- biopsie	Serum- antikörper	SSc-Subtyp	Nagelpfalz- mikroskopie (mm <sup>-1</sup> )	mRSS
X0 01	72 (w)	3	rechts	-	ISSc	4	0
XX 02	63 (w)	14	rechts	Cenp A/B	ISSc	2,88	0
XX 03	57 (w)	n.a.	n.a.	n.a.	ISSc	n.a.	n.a.
XX 04	48 (m)	n.a.	links	n.a.	ISSc	n.a.	n.a.
XX 05	55 (w)	36	links	Cenp A/B	ISSc	3,38	3
X0 06	28 (w)	12	rechts	-	ISSc	0	0
XX 07	50 (w)	10	rechts	Cenp A/B	ISSc	5,5	0
XX 08	59 (m)	9	links	Cenp A/B	ISSc	5,88	6
XX 09	69 (w)	10	rechts	Cenp A/B	ISSc	7,25	0
XX 10	54 (w)	13	rechts	Cenp A/B	ISSc	3,88	2
X0 11	54 (w)	20	rechts	-	dSSc	8,38	9
X0 12	38 (w)	8	links	-	dSSc	0	0
X0 13	64 (w)	24	links	Cenp A/B	ISSc	3,75	0
X0 22	53 (w)	13	rechts	Topo- isomerase-I	ISSc	n.a.	9
X0 23	62 (w)	13	links	Cenp A/B	ISSc	4,88	4
X0 24	59 (w)	12	rechts	Cenp A/B	ISSc	2,13	0
XX 25	n.a. (w)	n.a.	n.a.	n.a.	ISSc	n.a.	n.a.
XX 26	63 (w)	7	rechts	-	ISSc	4	0
XX 27	35 (w)	7	links	Cenp A/B	ISSc	7,63	0
XX 28	57 (w)	11	links	-	ISSc	7,88	0
X0 29	73 (w)	26	links	Cenp A/B	ISSc	2,75	2
X0 30	43 (w)	2	links	Cenp B	ISSc	6,5	0
XX 31	59 (w)	4	links	Cenp A/B	ISSc	7,63	0
X0 32	68 (w)	24	links	-	ISSc	6,25	0

**Tabelle 8: Kohorte mit Systemische Sklerose.** mRSS = „modified Rodnan Skin Score“; m = männlich, w = weiblich; Cenp = Centromeric protein, n.a. = nicht angegeben; ISSc = limitierte systemische Sklerose, dSSc = diffuse systemische Sklerose.

## **4.2 Auswertung der Hautbiopsien**

### **4.2.1 Morphometrische Analyse**

In der folgenden Tabelle sind die erhobenen Werte der Nervenfasern-, Gefäß- und Langerhans-Zell-Dichte aufgeführt (Tabelle 9). Die Langerin-Färbung der ersten Hautbiopsie der Probe XX 07 hat keinen ausreichenden Kontrast erzielt, daher konnte die Langerhans-Zell-Dichte nicht ausgewertet werden.

Des Weiteren sind die Ergebnisse des SSc-Hautscores dargestellt (Tabelle 10 – 12). In der Arbeit von Van Praet et al. zeigten sich in betroffener Haut vermehrt hyalinisiertes Kollagen, mononukleäre Infiltrate und eine Verdickung der Epidermis (Van Praet et al., 2011). In unseren Untersuchungen konnte kein hyalinisiertes Kollagen gefunden werden. Aus der Anzahl der epidermalen Schichten und dem Grad der mononukleären Infiltraten wurde ein Hautscore zusammengefasst. Beide Parameter wurden in einen Einzelscore von 0-5 Punkten transformiert und anschließend aufaddiert.

<b>Hautbiopsien</b>	<b>END</b> (Fasern/mm)		<b>VD225</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )		<b>VD500</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )		<b>LC-Dichte</b> (LC/mm <sup>2</sup> )	
	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>
<b>X0 01</b>	11,17	15,07	3,64	3,06	3,11	2,49	140,14	443,13
<b>XX 02</b>	11,68	9,75	2,43	2,4	1,85	1,84	289,26	447,89
<b>XX 03</b>	11,59	n.a.	3,25	n.a.	2,87	n.a.	370,2	n.a.
<b>XX 04</b>	12,13	n.a.	2,6	n.a.	1,79	n.a.	319,56	n.a.
<b>XX 05</b>	12,39	19,2	2,83	1,58	1,58	2,48	478,8	254,75
<b>X0 06</b>	6,03	5,97	3,96	1,84	4,69	2,64	112,73	270,55
<b>XX 07</b>	11,47	6,17	1,61	1,68	2,13	1,67	n.a.	352,63
<b>XX 08</b>	7,4	4,6	5,01	1,84	4,03	0,97	377,4	482,86
<b>XX 09</b>	16,45	17,61	1,74	2,24	1,86	1,32	166,04	253,13
<b>XX 10</b>	11,95	11,25	3,05	2,33	2,84	1,59	224,66	348,23
<b>X0 11</b>	11,27	15,87	0,94	1,08	1,15	1,0	201,62	352,33
<b>X0 12</b>	7,87	6,98	5,28	2,53	5,55	1,99	148,64	251,95
<b>X0 13</b>	7,86	19,09	2,9	4,08	3,22	3,12	518,48	204,31
<b>X0 22</b>	17,94	n.a.	4,21	n.a.	3,89	n.a.	273,68	n.a.
<b>X0 23</b>	21,45	n.a.	2,4	n.a.	1,92	n.a.	203,89	n.a.
<b>X0 24</b>	15,08	18,83	2,75	2,45	2,36	2,71	238,92	303,68
<b>XX 25</b>	9,9	n.a.	2,29	n.a.	1,92	n.a.	161,64	n.a.
<b>XX 26</b>	17,37	14,39	2,03	2,58	1,75	2,13	223,44	188,43
<b>XX 27</b>	13,05	11,76	3,01	3,28	2,14	1,93	260,8	223,4
<b>XX 28</b>	12,76	10,71	2,45	2,77	1,79	2,15	371,44	408,32
<b>X0 29</b>	12,76	18,37	2,22	2,14	1,94	1,79	249,86	286,89
<b>X0 30</b>	10,15	8,96	4,83	2,64	3,18	1,69	162,92	240,34
<b>XX 31</b>	23,83	23,39	2,71	3,5	2,43	2,78	363,19	376,91
<b>X0 32</b>	10,59	3,57	4,13	3,82	1,91	2,86	117,1	112,03
<b>15</b>	7,71		1,55		0,91		614,68	
<b>16</b>	14,09		1,76		1,79		274,51	
<b>17</b>	7,63		4,35		3,84		299,14	
<b>18</b>	12,44		2,48		1,75		250,1	
<b>19</b>	10,39		0,75		0,67		305,24	
<b>20</b>	8,25		2,4		1,85		310,11	
<b>21</b>	15,08		1,99		1,68		294,14	

**Tabelle 9: Analyse der Immunfluoreszenzschnitte.** END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, LC = Langerhans-Zellen, n.a. = nicht angegeben.

<b>Haut- biopsien</b>	<b>Epidermale Pigmentierung VAS (0-10)</b>		<b>Hyalinisiertes Kollagen VAS (0-10)</b>		<b>Mononukleäre Infiltrate (0-3)</b>		<b>Kalzifikation +/-</b>	
	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>
<b>Biopsie</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>
X0 01	2	0	0	0	0	1	-	-
XX 02	0	1	0	0	1	1	-	-
XX 03	1	n.a.	0	n.a.	0	n.a.	-	n.a.
XX 04	2	n.a.	0	n.a.	1	n.a.	-	n.a.
XX 05	1	1	0	0	1	1	-	-
X0 06	0	0	0	0	1	1	-	-
XX 07	0	0	0	0	1	1	-	-
XX 08	3	0	0	0	1	1	-	-
XX 09	0	1	0	0	1	1	-	-
XX 10	2	0	0	0	2	1	-	-
X0 11	2	2	0	0	1	1	-	-
X0 12	8	7	0	0	2	1	-	-
X0 13	2	0	0	0	3	1	-	-
X0 22	2	n.a.	0	n.a.	2	n.a.	-	n.a.
X0 23	1	n.a.	0	n.a.	1	n.a.	-	n.a.
X0 24	1	0	0	0	1	1	-	-
XX 25	1	n.a.	0	n.a.	1	n.a.	-	n.a.
XX 26	1	1	0	0	2	1	-	-
XX 27	1	1	0	0	1	1	-	-
XX 28	3	6	0	0	2	1	-	-
X0 29	2	1	0	0	2	1	-	-
X0 30	2	1	0	0	2	1	-	-
XX 31	1	1	0	0	3	2	-	-
X0 32	0	1	0	0	1	1	-	-
<b>15</b>	0		0		1		-	
<b>16</b>	1		0		1		-	
<b>17</b>	0		0		1		-	
<b>18</b>	1		0		2		-	
<b>19</b>	0		0		1		-	
<b>20</b>	0		0		2		-	
<b>21</b>	1		0		1		-	

**Tabelle 10: Bestimmung des histologischen SSc-Hautscores.** „+“ = vorhanden, „-“ = nicht vorhanden, n.a. = nicht angegeben.

<b>Haut- biopsien</b>	<b>Schweißdrüsen- einschluss</b>		<b>Fibroplasia</b>		<b>Verlust der Anhangsgebilde</b>		<b>Verlust epidermaler Papillen</b>	
	+/-		++/+/-		+/-		++/+/-	
<b>Biopsie</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>
X0 01	n.a.	-	+	-	++	++	n.a.	-
XX 02	-	-	-	-	++	++	+	-
XX 03	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	++	n.a.	-	n.a.
XX 04	+	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	++	n.a.
XX 05	+	n.a.	-	-	-	++	+	+
X0 06	n.a.	+	-	-	-	++	+	n.a.
XX 07	-	n.a.	-	-	++	++	+	-
XX 08	+	n.a.	-	-	+	++	++	-
XX 09	+	n.a.	-	-	++	++	+	-
XX 10	+	n.a.	-	-	++	++	+	-
X0 11	-	n.a.	-	n.a.	++	++	-	-
X0 12	+	-	-	-	-	-	++	+
X0 13	+	n.a.	-	-	++	++	++	-
X0 22	n.a.	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	+	n.a.
X0 23	+	n.a.	-	n.a.	++	n.a.	-	n.a.
X0 24	-	+	-	-	++	++	-	++
XX 25	+	n.a.	-	n.a.	++	n.a.	++	n.a.
XX 26	+	-	-	-	++	++	++	-
XX 27	n.a.	+	n.a.	-	-	-	n.a.	++
XX 28	+	-	-	-	-	-	-	++
X0 29	+	+	-	-	++	++	++	++
X0 30	+	n.a.	-	-	-	-	++	++
XX 31	+	-	-	-	-	-	++	-
X0 32	+	n.a.	-	-	++	++	++	-
15	n.a.		+		n.a.		-	
16	-		-		-		-	
17	n.a.		-		-		-	
18	n.a.		-		-		++	
19	+		++		-		-	
20	+		++		-		++	
21	+		++		-		-	

**Tabelle 11: Bestimmung des histologischen SSc-Hautscores.** „+“ = vorhanden, „-“ = nicht vorhanden, „++“ = ausgeprägt, n.a. = nicht angegeben.

<b>Haut- biopsien</b>	<b>Proliferation tiefdermaler Arteriolen</b>		<b>Para- keratose</b>		<b>Pigment- inkontinenz</b>		<b>Teleangi- ektasien</b>		<b>Epidermale Schichten</b>	
	+/-		+/-		+/-		+/-			
<b>Biopsie</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>1.</b>	<b>2.</b>
X0 01	-	-	-	-	-	-	-	+	4	4,6
XX 02	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	4,2
XX 03	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	3,8	n.a.
XX 04	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	6,6	n.a.
XX 05	-	-	-	-	-	-	-	+	4	4
X0 06	n.a.	-	-	-	-	-	+	-	4,4	5,2
XX 07	-	-	-	-	-	-	-	-	4,2	4,2
XX 08	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	4,4
XX 09	-	n.a.	-	-	-	-	-	-	5	4,6
XX 10	-	n.a.	-	-	-	-	+	-	5	5,2
X0 11	-	n.a.	-	-	-	-	+	-	5,8	5,6
X0 12	-	-	-	-	+	+	n.a.	-	5,6	6,4
X0 13	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4,6
X0 22	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	4,8	n.a.
X0 23	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	4	n.a.
X0 24	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	4,8
XX 25	-	n.a.	-	n.a.	-	n.a.	+	n.a.	4	n.a.
XX 26	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	4,4
XX 27	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	4,4
XX 28	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5,2
X0 29	-	-	-	-	-	-	-	-	3,6	3,8
X0 30	-	-	-	-	-	-	-	-	5,6	4,8
XX 31	-	-	-	-	-	-	-	-	5,8	5
X0 32	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	4,2
15	-		-		-		-		4,6	
16	-		-		-		-		4,6	
17	-		-		-		-		5,2	
18	-		-		-		-		4,6	
19	-		-		-		-		4,4	
20	-		-		-		-		5,4	
21	-		-		-		-		4,6	

**Tabelle 12: Bestimmung des histologischen SSc-Hautscores.** „+“ = vorhanden, „-“ = nicht vorhanden, n.a. = nicht angeben.

<u>Haut- biopsien</u>	Mononukleäre Infiltrate (0-3)		Epidermale Schichten		Mononukleäre Infiltrate transformiert (0-5)		Epidermale Schichten transformiert (0-5)		Gemeinsamer Hautscore (0-10)	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
Biopsie	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
X0 01	0	1	4	4,6	0	1,67	2,4	3	2,4	4,67
XX 02	1	1	3,6	4,2	1,67	1,67	2	0	3,67	1,67
XX 03	0	n.a.	3,8	n.a.	0	n.a.	2,2	n.a.	2,2	n.a.
XX 04	1	n.a.	6,6	n.a.	1,67	n.a.	5	n.a.	6,67	n.a.
XX 05	1	1	4	4	1,67	1,67	2,4	2,4	4,07	4,07
X0 06	1	1	4,4	5,2	1,67	1,67	2,8	3,6	4,47	5,27
XX 07	1	1	4,2	4,2	1,67	1,67	2,6	2,6	4,27	4,27
XX 08	1	1	4,6	4,4	1,67	1,67	3	2,8	4,67	4,47
XX 09	1	1	5	4,6	1,67	1,67	3,4	3	5,07	4,67
XX 10	2	1	5	5,2	3,33	1,67	3,4	3,6	6,73	5,23
X0 11	1	1	5,8	5,6	1,67	1,67	4,2	4	5,87	5,67
X0 12	2	1	5,6	6,4	3,33	1,67	4	4,8	7,33	6,47
X0 13	3	1	4	4,6	5	1,67	2,4	3	7,4	4,67
X0 22	2	n.a.	4,8	n.a.	3,33	n.a.	3,2	n.a.	6,53	n.a.
X0 23	1	n.a.	4	n.a.	1,67	n.a.	2,4	n.a.	5,07	n.a.
X0 24	1	1	4,6	4,8	1,67	1,67	3	3,2	4,67	4,87
XX 25	1	n.a.	4	n.a.	1,67	n.a.	2,4	n.a.	4,07	n.a.
XX 26	2	1	4,4	4,4	3,33	1,67	2,8	2,8	6,13	4,47
XX 27	1	1	4,4	4,4	1,67	1,67	2,8	2,8	4,47	4,47
XX 28	2	1	5	5,2	3,33	1,67	3,4	3,6	6,73	5,37
X0 29	2	1	3,6	3,8	3,33	1,67	2	2,2	5,33	3,87
X0 30	2	1	5,6	4,8	3,33	1,67	4	3,2	7,33	4,87
XX 31	3	2	5,8	5	5	3,33	4,2	3,4	9,2	6,73
X0 32	1	1	3,8	4,2	1,67	1,67	2,2	2,6	3,87	4,27
15	1		4,6		1,67		3		4,67	
16	1		4,6		1,67		3		4,67	
17	1		5,2		1,67		3,6		5,27	
18	2		4,6		3,33		3		6,33	
19	1		4,4		1,67		2,8		4,47	
20	2		5,4		3,33		3,8		7,13	
21	1		4,6		1,67		3		4,67	

Tabelle 13: Transformation des histologischen SSc-Hautscores. n.a. = nicht angegeben.

### 4.3 Korrelation der Variablen

Die Variablen der Ergebnisse wurden untereinander auf signifikante Korrelation geprüft. Genutzt wurde hierfür der Spearman Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$ . Analysiert wurden epidermale Nervenfaserdichte, Gefäßdichten mit 225  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, Langerhans-Zell-Dichte und der Hautscore der Proben vor Therapie.

Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der Langerhans-Zell-Dichte mit der epidermalen Nervenfaserdichte (Spearman'sches  $Rho = 0,44$ ;  $p = 0,04$ ) sowie eine signifikante positive Korrelation von beiden Gefäßdichten (Spearman'sches  $Rho = 0,75$ ;  $p < 0,01$ ).

<u>SSc-Kohorte</u>	END	VD225	VD500	LC-Dichte	Hautscore
END	1	-0,38 (p = 0,07)	-0,28 (p=0,19)	<b>0,44*</b> <b>(p = 0,04)</b>	0,36 (p = 0,08)
VD225	-0,38 (p = 0,07)	1	<b>0,75*</b> <b>(p &lt; 0,01)</b>	-0,08 (p = 0,73)	0,05 (p = 0,82)
VD500	-0,28 (p = 0,19)	<b>0,75*</b> <b>(p &lt; 0,01)</b>	1	-0,13 (p = 0,56)	0,16 (p = 0,45)
LC-Dichte	<b>0,44*</b> <b>(p = 0,04)</b>	-0,08 (p = 0,73)	-0,13 (p = 0,56)	1	0,18 (p = 0,4)
Hautscore	0,36 (p = 0,08)	0,05 (p = 0,82)	0,16 (p = 0,45)	0,18 (p = 0,4)	1

**Tabelle 14: Korrelationen der histologischen Parameter der prätherapeutischen SSc-Kohorte.** Angegeben ist das Spearman'sche  $Rho$ . Bei einem  $\alpha$ -Wert von 0,05 korrelierten die Gefäßdichten untereinander sowie die epidermale Nervenfaserdichte und die Langerhans-Zell-Dichte signifikant. END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, LC = Langerhans-Zellen.

Des Weiteren evaluierten wir die Korrelation der Variablen mit dem Alter, der Krankheitsdauer, dem mRSS und der nagelpfalzmikroskopischen Kapillardichte.

Es konnte keine signifikante Korrelation der histologischen Variablen mit Alter, Krankheitsdauer sowie auch mit dem mRSS und der nagelpfalzmikroskopischen Kapillardichte gefunden werden.

<b><u>SSc-Kohorte</u></b>	<b>END</b>	<b>VD225</b>	<b>VD500</b>	<b>LC-Dichte</b>	<b>Hautscore</b>
<b>Alter</b>	0,32 (p = 0,14)	-0,31 (p = 0,15)	-0,25 (p = 0,24)	0,05 (p = 0,84)	-0,19 (p = 0,38)
<b>Krankheitsdauer</b>	0,01 (p = 0,68)	-0,23 (p = 0,33)	-0,35 (p = 0,12)	0,27 (p = 0,26)	-0,18 (p = 0,45)
<b>mRSS</b>	0,07 (p = 0,77)	-0,02 (p = 0,94)	-0,09 (p = 0,71)	0,25 (p = 0,29)	0,05 (p = 0,84)
<b>Kapillardichte</b>	0,19 (p = 0,41)	-0,26 (p = 0,27)	-0,37 (p = 0,11)	0,01 (p = 0,7)	0,17 (p = 0,47)

**Tabelle 15: Korrelation der histologischen Variablen mit den klinischen Werten der SSc-Kohorte.** Angegeben ist das Spearman'sche Rho. Bei einem  $\alpha$ -Wert von 0,05 lag keine Korrelation im signifikanten Bereich. SSc = systemische Sklerose, END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu$ m Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu$ m Tiefe, LC = Langerhans-Zellen, mRSS = „modified Rodnan Skin Score“.

Ebenfalls auf Korrelation geprüft wurden die Parameter der Kontrollen. Genutzt wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient  $\rho$ . Analysiert wurden das Alter, die epidermale Nervenfaserdichte, die Gefäßdichten, die Langerhans-Zell-Dichte und der Hautscore.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation der Gefäßdichten untereinander (Spearman'sches  $Rho = 0,821$ ;  $p = 0,034$ ). Zwischen der Gefäßdichte in einer Tiefe von 225  $\mu\text{m}$  und des Hautscores konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation gefunden werden (Spearman'sches  $Rho = 0,815$ ;  $p = 0,036$ ).

<u>Kontrollkohorte</u>	END	VD225	VD500	LC-Dichte	Hautscore
<b>END</b>	1	-0,214 (p = 0,662)	-0,286 (p = 0,556)	-0,643 (p = 0,139)	-0,259 (p = 0,598)
<b>VD225</b>	-0,214 (p = 0,662)	1	<b>0,821*</b> (p = <b>0,034</b> )	-0,393 (p = 0,396)	<b>0,815*</b> (p = <b>0,036</b> )
<b>VD500</b>	-0,286 (p = 0,556)	<b>0,821*</b> (p = <b>0,034</b> )	1	-0,214 (p = 0,662)	0,741 (p = 0,071)
<b>LC-Dichte</b>	-0,643 (p = 0,139)	-0,393 (p = 0,396)	-0,214 (p = 0,662)	1	-0,111 (p = 0,84)
<b>Hautscore</b>	-0,259 (p = 0,598)	<b>0,815*</b> (p = <b>0,036</b> )	0,741 (p = 0,071)	-0,111 (p = 0,84)	1

**Tabelle 16: Korrelationen der histologischen Parameter der Kontrollen.** Angegeben ist das Spearman'sche  $Rho$ . Bei einem  $\alpha$ -Wert von 0,05 korrelierten die Gefäßdichten untereinander, sowie die VD225 und der Hautscore signifikant. END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, LC = Langerhans-Zellen.

Weiterhin untersuchten wir die Korrelation der histologischen Parameter mit Alter und Kapillardichte. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation.

<u>Kontrollkohorte</u>	END	VD225	VD500	LC-Dichte	Hautscore
<b>Alter</b>	-0,51 (p = 0,25)	0,18 (p = 0,7)	0,29 (p = 0,53)	-0,07 (p = 0,9)	-0,08 (p = 0,89)
<b>Kapillardichte</b>	-0,49 (p = 0,34)	0,06 (p = 0,94)	0,12 (p = 0,84)	0,09 (p = 0,85)	0,46 (p = 0,42)

**Tabelle 17: Korrelationen der histologischen Parameter mit den klinischen Werten der Kontrollen.** Angegeben ist das Spearman'sche  $Rho$ . Bei einem  $\alpha$ -Wert von 0,05 korrelierten die Gefäßdichten untereinander, sowie die VD225 und der Hautscore signifikant. END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, LC = Langerhans-Zellen.

#### 4.4 Prüfung auf Normalverteilung

Die Variablen wurden mit dem Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Mit Ausnahme der VD500 und der Krankheitsdauer in der prätherapeutischen SSc-Kohorte, der Langerhans-Zell-Dichte in der Kontrollkohorte und der Hautscores in der prä- und posttherapeutischen Gruppe zeigten sich bei allen Parametern eine Normalverteilung (Tabelle 18).

	<u>Kontrollkohorte</u>		<u>SSc-Kohorte</u> prätherapeutisch		<u>SSc-Kohorte</u> posttherapeutisch	
	n	p(H <sub>0</sub> )	n	p(H <sub>0</sub> )	n	p(H <sub>0</sub> )
<b>END</b>	7	0,243	24	0,097	19	0,477
<b>VD225</b>	7	0,414	24	0,42	19	0,928
<b>VD500</b>	7	0,07	24	<b>0,005</b>	19	0,742
<b>LC-Dichte</b>	7	<b>&lt;0,001</b>	23	0,136	18	0,749
<b>Hautscore</b>	7	<b>0,043</b>	24	0,71	19	<b>0,035</b>
<b>Kapillarmikroskopie</b>	6	0,408	20	0,359	-	-
<b>Alter</b>	7	0,372	23	0,26	-	-
<b>Krankheitsdauer</b>	-	-	21	<b>0,034</b>	-	-

**Tabelle 18: Shapiro-Wilk-Test der Variablen der unabhängigen Stichproben.** Bei der Berechnung des Shapiro-Wilk wird als H<sub>0</sub> angenommen, die Variable sei normalverteilt. Sowohl bei der VD500 der SSc-Kohorte als auch bei der LC-Dichte der Kontrollkohorte müssen die Nullhypothesen verworfen werden. Somit darf nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden. SSc = systemische Sklerose, n = Stichprobengröße, p(H<sub>0</sub>) = Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese, END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225 µm Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500 µm Tiefe, LC = Langerhans-Zellen.

#### 4.5 Unterschiede zwischen der gesunden und der erkrankten Gruppe

Die einzelnen Variablen der gesunden und der erkrankten Gruppe wurden auf Unterschiede bezüglich ihrer Mittelwerte untersucht. Bei den normalverteilten Variablen wurde dies mit unabhängigen zweiseitigen T-Tests analysiert. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt (Tabelle 19).

Zusammenfassend zeigt sich eine signifikante höhere Gefäßdichte der SSc-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte in einer Tiefe von 500  $\mu\text{m}$  ( $p = 0,015$ ).

Parameter	Kontrolle $\mu (\pm \sigma)$ n	Systemische Sklerose (prätherapeutisch) $\mu (\pm \sigma)$ n	Test	p(H <sub>0</sub> )
<b>END</b> (Fasern/mm)	10,8 ( $\pm 3,11$ ) n = 7	13,36 ( $\pm 4,48$ ) n = 24	Unabhängiger zweiseitiger T- Test	0,198
<b>VD225</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )	2,18 ( $\pm 1,12$ ) n = 7	3,05 ( $\pm 1,16$ ) n = 24	Unabhängiger zweiseitiger T- Test	0,092
<b>VD500</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )	1,79 ( $\pm 1,01$ ) n = 7	2,64 ( $\pm 1,12$ ) n = 24	Mann-Whitney-U	<b>0,015*</b>
<b>LC-Dichte</b> (LC/mm <sup>2</sup> )	335,4 ( $\pm 124,9$ ) n = 7	256,1 ( $\pm 124,8$ ) n = 23	Mann-Whitney-U	0,096
<b>Hautscore</b> (0-10)	5,32 ( $\pm 1,02$ ) n = 7	5,49 ( $\pm 1,61$ ) n = 24	Mann-Whitney-U	0,899
<b>Kapillarmikroskopie</b> (Kapillar/mm)	11,46 ( $\pm 4,59$ ) n = 6	4,73 ( $\pm 2,89$ ) n = 20	Unabhängiger zweiseitiger T- Test	<b>&gt;0,001</b>

**Tabelle 19: Mittelwertvergleiche zwischen der prätherapeutischen SSc-Kohorte und den Kontrollen.**

Aufgrund der Normalverteilung der epidermalen Nervenfaserdichte, der Gefäßdichte mit der Messtiefe von 225  $\mu\text{m}$  sowie bei der Kapillardichte konnte bei diesen Parametern ein t-Test angewendet werden. Bei den restlichen Parametern wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die Nullhypothese war stets, dass sich die Gruppen nicht voneinander unterscheiden. Bei der Gruppe der Erkrankten zeigte sich die Gefäßdichte mit Messtiefe von 500  $\mu\text{m}$  signifikant erhöht.  $\mu$  = arithmetisches Mittel,  $\sigma$  = Standardabweichung, n = Stichprobengröße, p(H<sub>0</sub>) = Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese, END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, LC = Langerhans-Zellen.

## 4.6 Unterschiede zwischen der SSc-Kohorte prä- und posttherapeutisch

Von allen 24 Proband\*innen mit systemischer Sklerose wurde vor Therapie eine Hautbiopsie durchgeführt. Bei 19 Proband\*innen wurde im Abstand von drei Monaten eine erneute Biopsie durchgeführt. Die einzelnen Variablen wurden auf Unterschiede der Mittelwerte bevor und nach der Therapie geprüft. Bei normalverteilten Variablen wurde der abhängige zweiseitige t-Test genutzt. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde der Wilcoxon-Rangtest verwendet.

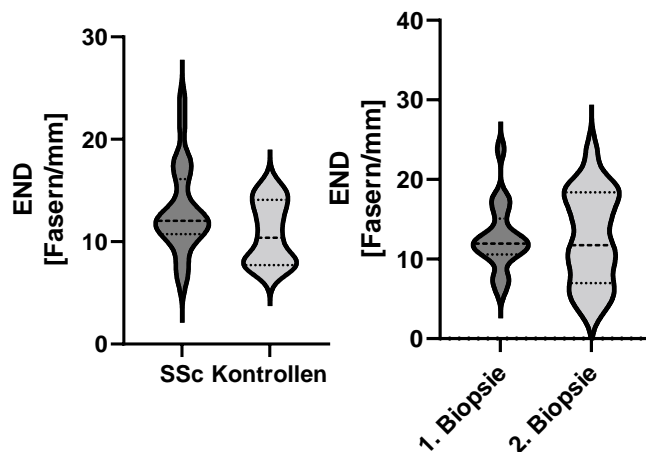
Zusammenfassend zeigt sich eine signifikante Reduktion des histologischen SSc-Hautscores nach Iloprost-Therapie ( $p = 0,026$ ).

Parameter	Prätherapeutisch: $\mu (\pm \sigma)$	Posttherapeutisch: $\mu (\pm \sigma)$	Test	p(H <sub>0</sub> )
<b>END (n = 19)</b> (Fasern/mm)	12,69 ( $\pm$ 4,13)	12,71 ( $\pm$ 5,82)	Abhängiger zweiseitiger T-Test	0,979
<b>VD225 (n = 19)</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )	3,03 ( $\pm$ 1,19)	2,52 ( $\pm$ 0,78)	Abhängiger zweiseitiger T-Test	0,088
<b>VD500 (n = 19)</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )	2,61 ( $\pm$ 1,14)	2,06 ( $\pm$ 0,62)	Wilcoxon- Rangtest	0,134
<b>LC-Dichte (n = 18)</b> (LC/mm <sup>2</sup> )	258,1 ( $\pm$ 131)	305,4 ( $\pm$ 98,5)	Abhängiger zweiseitiger T-Test	0,197
<b>Hautscore (n = 19)</b> (0-10)	5,46 ( $\pm$ 1,68)	4,74 ( $\pm$ 1,06)	Wilcoxon- Rangtest	<b>0,026*</b>

**Tabelle 20: Mittelwertvergleiche zwischen der prätherapeutischen SSc-Kohorte und den Kontrollen.** Aufgrund der Normalverteilung der epidermalen Nervenfaserdichte, der Gefäßdichte mit der Messtiefe von 225  $\mu\text{m}$  und der Langerhans-Zell-Dichte konnte bei diesen Parametern ein t-Test angewendet werden. Bei den restlichen Parametern wurde auf den Wilcoxon-Rangtest zurückgegriffen. Die Nullhypothese war stets, dass sich die Gruppen nicht voneinander unterscheiden. Es zeigte sich, dass der Hautscore posttherapeutisch signifikant reduziert war.  $\mu$  = arithmetisches Mittel,  $\sigma$  = Standardabweichung, n = Stichprobengröße, p(H<sub>0</sub>) = Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese, END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, LC = Langerhans-Zellen.

## 4.7 Epidermale Nervenfaserdichte (END)

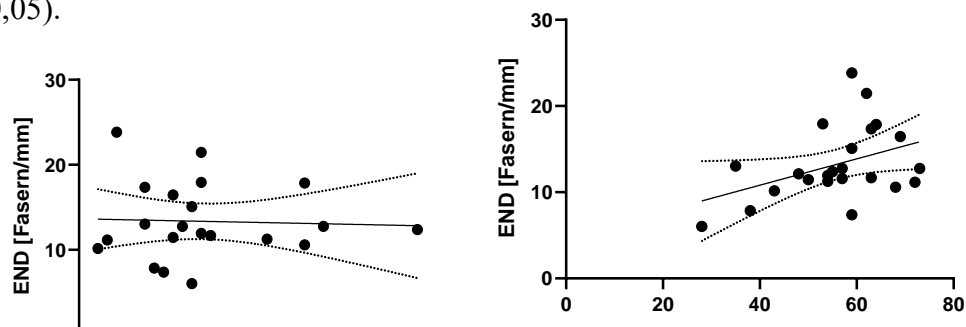
Bei der Analyse der Nervenfaserdichte zeigte sich in der Gruppe mit systemischer Sklerose eine mittlere epidermale Nervenfaserdichte von  $13,36 \pm 4,48$  Fasern/mm, wobei sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollkohorte zeigt ( $10,8 \pm 3,11$  Fasern/mm;  $p = 0,198$ ).



**Abbildung 2121: Analyse der END.** Die END zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich zwischen Erkrankten und Kontrollkohorte ( $p > 0,05$ ). Nach Therapie zeigte sich keine signifikante Veränderung ( $p > 0,05$ ). END = Epidermale Nervenfaserdichte, SSc = Systemische Sklerose.

Bei den 19 Proband\*innen mit systemischer Sklerose, die eine zweite Biopsie erhalten haben, zeigte sich vor Therapie eine mittlere epidermale Nervenfaserdichte von  $12,69 \pm 4,13$  Fasern/mm. Nach Therapie zeigte sich keine signifikante Veränderung (Abbildung 17).

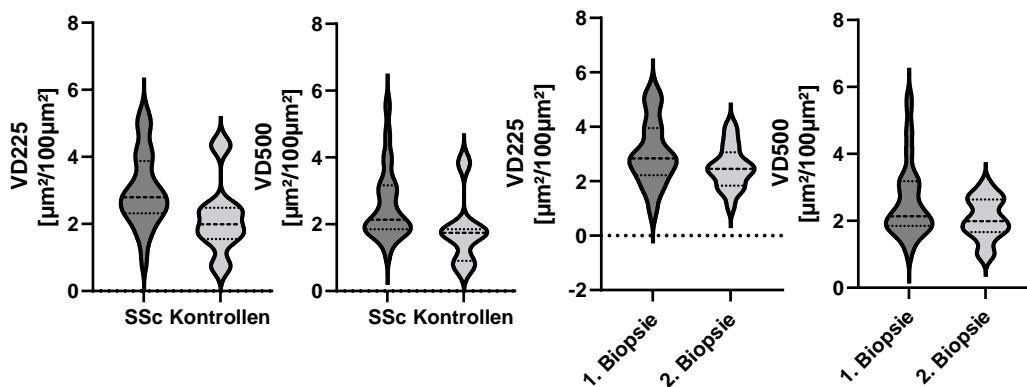
Die epidermale Nervenfaserdichte zeigte zum Alter sowie zur Krankheitsdauer keine signifikante Korrelation mit einem Spearman'schen  $\rho$  von 0,32 ( $p > 0,05$ ) und 0,1 ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 222: Korrelation der END.** Die END zeigte keine Korrelation zu Alter (A) und Krankheitsdauer (B) (Alter:  $\rho = 0,32$ ;  $p > 0,05$ ; Krankheitsdauer:  $\rho = 0,1$ ;  $p > 0,05$ ). END = Epidermale Nervenfaserdichte.

## 4.8 Gefäßdichte (VD)

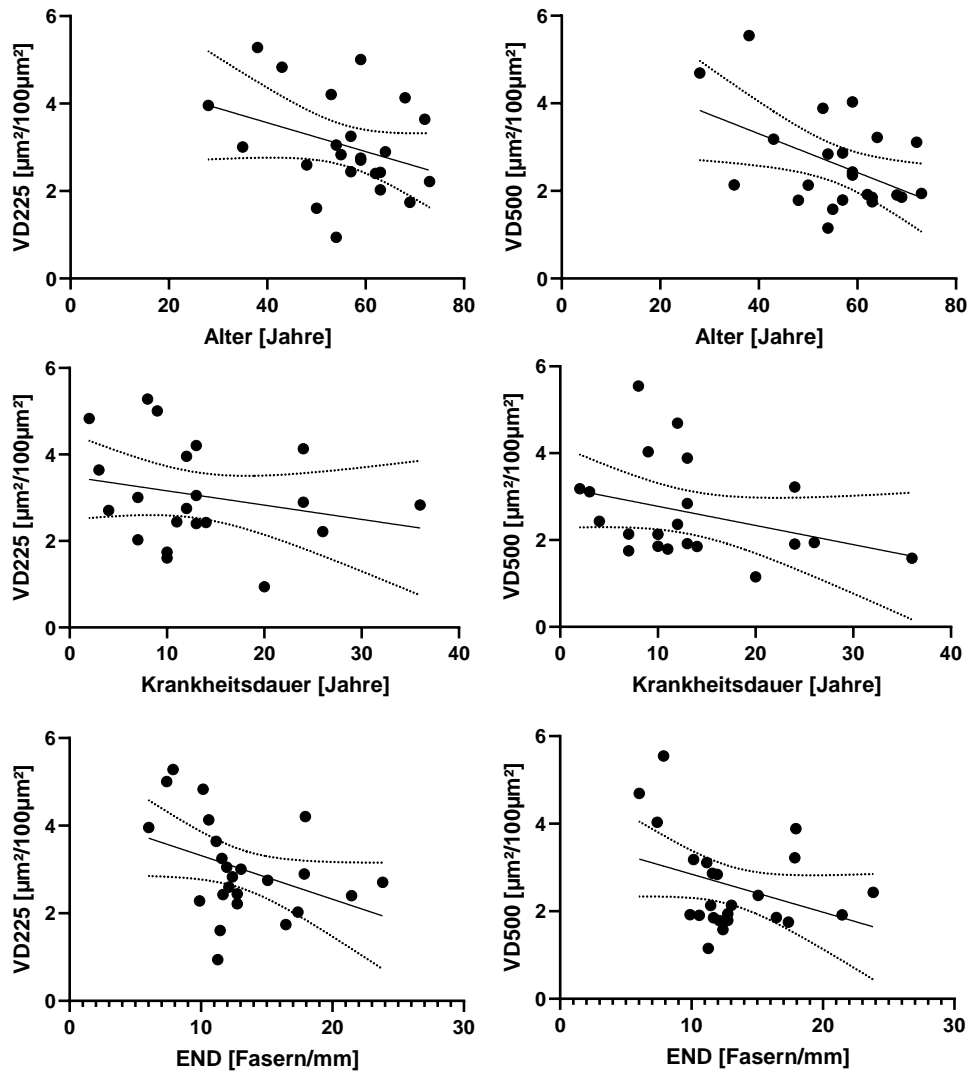
Die mittlere Gefäßdichte der Testpersonen mit systemischer Sklerose betrug  $3,05 \pm 1,16 \mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$  bei der Messtiefe von 225  $\mu\text{m}$  (VD225). Die Kontrollkohorte zeigte eine Gefäßdichte von  $2,18 \pm 1,12 \mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ . Bei einer Messtiefe von 500  $\mu\text{m}$  (VD500) betrug die Gefäßdichte  $2,64 \pm 1,12 \mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$  bei der SSc-Kohorte und  $1,79 \pm 1,01 \mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$  bei den Kontrollen. Im unabhängigen zweiseitigen t-Test zeigte sich bei einer Messtiefe von 225  $\mu\text{m}$  keine signifikante Mittelwertsabweichung ( $p = 0,092$ ). Bei einer Messtiefe von 500  $\mu\text{m}$  war die Abweichung signifikant ( $p = 0,015$ ).



**Abbildung 2323: Analyse der Gefäßdichte.** Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich bei SSc der VD225 keine signifikante Veränderung ( $p > 0,05$ ). Die VD500 war in der SSc-Gruppe signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Nach Therapie konnte sowohl bei der VD225 als auch bei der VD500 keine signifikante Veränderung gemessen werden (VD225:  $p > 0,05$ ; VD500:  $p > 0,05$ ). VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, SSc = Systemische Sklerose.

Die Gefäßdichte zeigte keine signifikante Korrelation zum Alter und zur Krankheitsdauer (VD225: Alter: Spearman'sches  $\rho = -0,31$ ;  $p = 0,148$ ; Krankheitsdauer: Spearman'sches  $\rho = -0,22$ ;  $p = 0,328$ ; VD500: Alter: Spearman'sches  $\rho = -0,25$ ;  $p = 0,243$ ; Krankheitsdauer: Spearman'sches  $\rho = -0,35$ ;  $p = 0,123$ ). Zur epidermalen Nervenfaserdichte zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation (VD225: Spearman'sches  $\rho = -0,38$ ;  $p = 0,067$ ; VD500: Spearman'sches  $\rho = -0,28$ ;  $p = 0,191$ ).

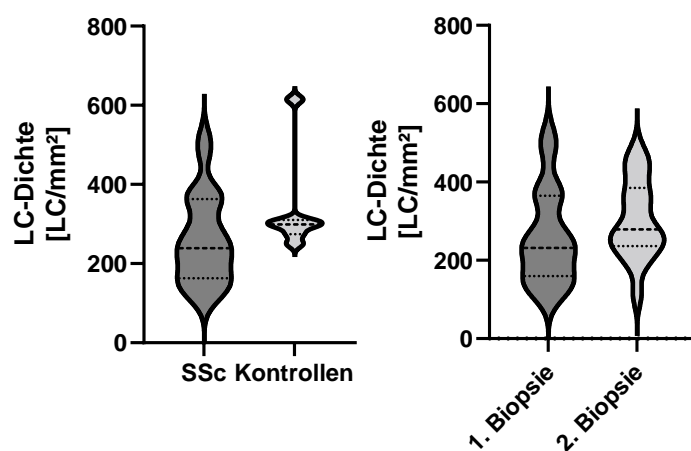
Die Kapillardichte in der Nagelpfalzmikroskopie betrug bei der SSc-Kohorte im Mittel  $4,73 \pm 2,48 /\text{mm}$ . Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zu den histologisch gemessenen Gefäßflächendichten (VD225: Spearman'sches  $\rho = -0,26$ ;  $p = 0,27$ ; VD500: Spearman'sches  $\rho = -0,37$ ;  $p = 0,11$ ).



**Abbildung 2424: Korrelation der Gefäßdichte mit der END.** Sowohl die VD225 als auch die VD500 zeigten keine signifikante Korrelation zu Alter (VD225:  $\rho = -0,31$ ;  $p > 0,05$ ; VD500:  $\rho = -0,25$   $p > 0,05$ ), Krankheitsdauer (VD225:  $\rho = -0,22$ ;  $p > 0,05$ ; VD500:  $\rho = -0,35$ ;  $p > 0,05$ ) sowie auch der END (VD225:  $\rho = -0,38$ ;  $p > 0,05$ ; VD500:  $\rho = -0,28$ ;  $p > 0,05$ ). VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, END = Epidermale Nervenfaserdichte.

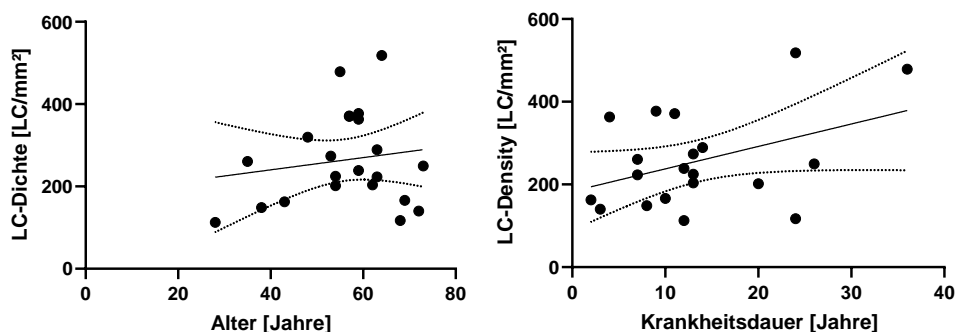
## 4.9 Langerhans-Zell-Dichte (LC-Dichte)

Die mittlere Langerhans-Zell-Dichte in der SSc-Kohorte ( $256,1 \pm 124,8 \text{ LC/mm}^2$ ) zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollkohorte ( $335,4 \pm 124,9 \text{ LC/mm}^2$ ). Die gepaarten Proben zeigten vor Therapie eine mittlere Langerhans-Zell-Dichte von  $258,1 \pm 131 \text{ LC/mm}^2$ . Nach Therapie lag dieser Wert bei  $305,4 \pm 98,5 \text{ LC/mm}^2$ . Der Unterschied stellte sich im abhängigen zweiseitigen t-Test als nicht signifikant dar ( $p = 0,197$ ).



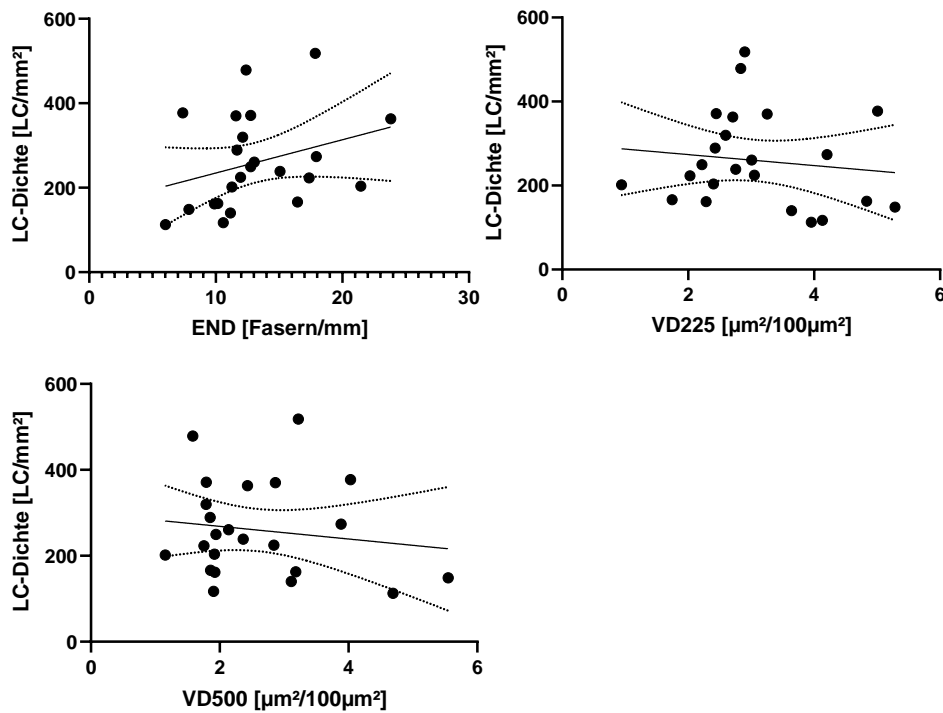
**Abbildung 2525: Analyse der LC-Dichte.** Die LC-Dichte der Erkrankten zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Gesunden ( $p > 0,05$ ). Nach Therapie veränderte sich die LC-Dichte nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). LC = Langerhans-Zellen, SSc = Systemische Sklerose.

Die Langerhans-Zell-Dichte in der SSc-Kohorte zeigte weder zum Alter noch zur Krankheitsdauer eine signifikante Korrelation (Alter: Spearman'sches  $\rho = 0,04$ ;  $p = 0,843$ ; Krankheitsdauer: Spearman'sches  $\rho = 0,27$ ;  $p = 0,258$ ).



**Abbildung 2626: Korrelation der LC-Dichte mit Alter und Krankheitsdauer.** Die LC-Dichte zeigten keine signifikante Korrelation zu Alter und Krankheitsdauer (Alter:  $\rho = 0,04$ ;  $p > 0,05$ ; Krankheitsdauer:  $\rho = 0,27$ ;  $p > 0,05$ ).

Zur epidermalen Nervenfaserdichte zeigte sich in Bezug auf die Langerhans-Zell-Dichte eine signifikante positive Korrelation (Spearman'sches  $\rho = 0,44$ ;  $p = 0,036$ ). Die Korrelation zur Gefäßdichte zeigte keine Signifikanz (VD225: Spearman'sches  $\rho = -0,08$ ;  $p = 0,73$ ; VD500: Spearman'sches  $\rho = -0,13$ ;  $p = 0,556$ ).

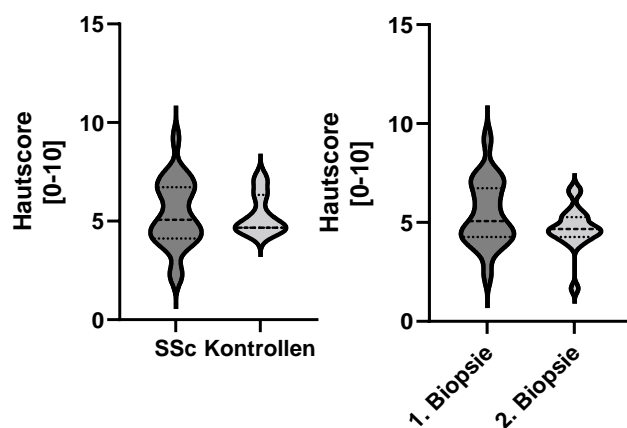


**Abbildung 2727: Korrelation der LC-Dichte mit END und VD.** Die END korrelierte signifikant positiv zur LC-Dichte ( $\rho = 0,44$ ;  $p < 0,05$ ). In Bezug zur Gefäßdichte zeigte sich keine signifikante Korrelation (VD225:  $\rho = -0,08$ ;  $p > 0,05$ ; VD500:  $\rho = -0,13$ ;  $p > 0,05$ ). LC = Langerhans-Zellen, END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225 µm Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500 µm Tiefe.

## 4.10 Hautscore

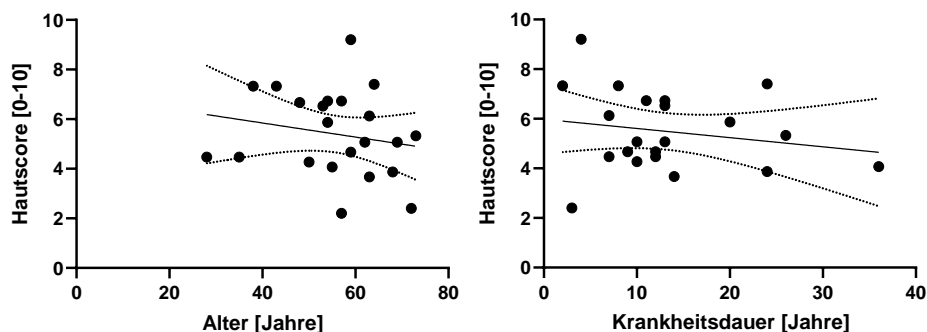
Die Gruppe mit systemischer Sklerose zeigte im Mittel einen Hautscore von  $5,49 \pm 1,61$ . Im Vergleich betrug der Hautscore bei der Kohorte der Gesunden  $5,32 \pm 1,02$ . Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich keine signifikante Veränderung ( $p = 0,899$ ).

In der SSc-Kohorte wurde vor Therapie im Mittel ein Hautscore von  $5,46 \pm 1,68$  bestimmt. Nach Therapie sank der Wert signifikant auf  $4,74 \pm 1,06$  ( $p = 0,026$ ).



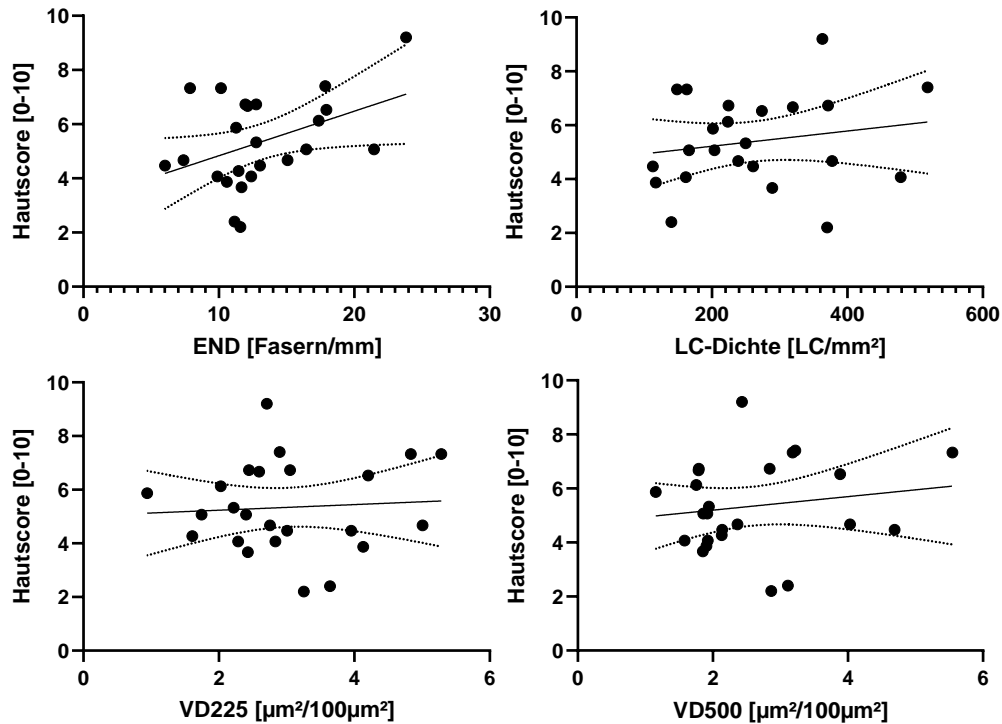
**Abbildung 2828: Analyse des Hautscores.** Im Vergleich zu den gesunden Proben zeigten die Erkrankten keinen signifikant erhöhten Hautscore ( $p > 0,05$ ). Nach der Therapie zeigte sich eine signifikante Reduktion des Hautscores ( $p < 0,05$ ). SSc = Systemische Sklerose.

Zu Alter und Krankheitsdauer korrelierte der Hautscore nicht signifikant (Alter: Spearman'sches  $\rho = -0,19$ ;  $p = 0,382$ ; Krankheitsdauer: Spearman'sches  $\rho = -0,18$ ;  $p = 0,445$ ).



**Abbildung 2929: Korrelation des Hautscores zu Alter und Krankheitsdauer.** Der Hautscore zeigte keine signifikante Korrelation zu Alter und Krankheitsdauer (Alter:  $\rho = -0,19$ ;  $p > 0,05$ ; Krankheitsdauer:  $\rho = -0,18$ ;  $p > 0,05$ ).

Zur epidermalen Nervenfaserdichte, zur Langerhans-Zell-Dichte sowie auch zu den Gefäßdichten zeigte sich keine signifikante Korrelation (END: Spearman'sches  $\rho = 0,36$ ;  $p = 0,082$ ; LC-Dichte: Spearman'sches  $\rho = 0,18$ ;  $p = 0,4$ ; VD225: Spearman'sches  $\rho = 0,05$ ;  $p = 0,823$ ; VD500: Spearman'sches  $\rho = 0,16$ ;  $p = 0,447$ ).



**Abbildung 3030: Korrelation des Hautscores mit den weiteren Parametern.** Weder in Bezug zur END, zur LC-Dichte noch zur Gefäßdichte zeigte sich beim Hautscore eine signifikante Korrelation (END:  $\rho = 0,36$ ;  $p > 0,05$ ; LC-Dichte:  $\rho = 0,18$ ;  $p > 0,05$ ; VD225:  $\rho = 0,05$ ;  $p > 0,05$ ; VD500:  $\rho = 0,16$ ;  $p > 0,05$ ). END = Epidermale Nervenfaserdichte, LC = Langerhans-Zellen, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225 µm Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500 µm Tiefe.

## 4.11 Centromer-Antikörper

Wir teilten die SSc-Kohorte in zwei Subkohorten: eine Centromer-Antikörper-positive Kohorte und eine Kohorte ohne nachgewiesene Centromer-Antikörper. Wir verglichen die Gruppen hinsichtlich der Mittelwertsunterschiede bezüglich der histologischen Parameter. Mit dem Shapiro-Will-Test zeigten sich die VD225-Werte nicht normalverteilt. Hier wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die übrigen Werten wurden mit dem unabhängigen zweiseitigen t-Test geprüft.

Parameter	Centromer-positiv $\mu (\pm \sigma)$ n = 13	Centromer-negativ $\mu (\pm \sigma)$ n = 8	Test	p(H <sub>0</sub> )
<b>END</b> (Fasern/mm)	14,27 ( $\pm$ 4,59) n = 13	11,87 ( $\pm$ 4,15) n = 8	Unabhängiger zweiseitiger T-Test	0,244
<b>VD225</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )	2,88 ( $\pm$ 1,01) n = 13	3,33 ( $\pm$ 1,41) n = 8	Mann-Whitney-U	0,414
<b>VD500</b> ( $\mu\text{m}^2/100\mu\text{m}^2$ )	2,42 ( $\pm$ 0,71) n = 13	2,98 ( $\pm$ 1,59) n = 8	Unabhängiger zweiseitiger T-Test	0,281
<b>LC-Dichte</b> (LC/mm <sup>2</sup> )	294,5 ( $\pm$ 116,3) n = 13	198,6 ( $\pm$ 89,5) n = 8	Unabhängiger zweiseitiger T-Test	0,065
<b>Hautscore</b> (0-10)	5,53 ( $\pm$ 1,63) n = 13	5,42 ( $\pm$ 1,68) n = 8	Unabhängiger zweiseitiger T-Test	0,875

**Tabelle 21: Vergleich der Befunde in Abhängigkeit der Centromer-Antikörper.** Bis auf die VD225 konnte bei allen Kohorten eine Normalverteilung angenommen werden und somit der t-Test angewendet werden. Es konnte kein signifikanter Mittelwertsunterschied gefunden werden.  $\mu$  = arithmetisches Mittel,  $\sigma$  = Standardabweichung, n = Stichprobengröße, p(H<sub>0</sub>) = Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese, END = Epidermale Nervenfaserdichte, VD225 = Gefäßdichte innerhalb 225  $\mu\text{m}$  Tiefe, VD500 = Gefäßdichte innerhalb 500  $\mu\text{m}$  Tiefe, LC = Langerhans-Zellen.

## 4.12 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es zeigte sich, dass in unserer Studie der prätherapeutische Hautscore der SSc-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte höher war, jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Nach Therapie mit Iloprost kam es in der SSc-Kohorte zu einer signifikanten Reduktion des Hautscores.

Im Vergleich zur Kontrollkohorte ergab sich bei der SSc-Kohorte eine erhöhte Gefäßflächendichte in 500 µm (VD500) unter der Basalmembran. In 225 µm unter der Basalmembran konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden. Die Gefäßflächendichten in den unterschiedlichen Messtiefen korrelierten jeweils miteinander, sowohl in Gruppe der Gesunden als auch der Erkrankten.

Die Gefäßflächendichte korrelierte nicht mit den Werten der Nagelpfalzmikroskopie. Allerdings zeigte sich im Gegensatz zur Gefäßflächendichte eine signifikant reduzierte Kapillardichte bei der SSc-Kohorte.

Die epidermale Nervenfaserdichte der Patienten mit systemischer Sklerose betrug im Mittel  $13,36 \pm 4,48$  Fasern/mm. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollkohorte konnte nicht gezeigt werden. Die Therapie mit Iloprost zeigte keinen signifikanten Effekt.

Die Langerhans-Zell-Dichte zeigte eine positive Korrelation zur epidermalen Nervenfaserdichte in der SSc-Kohorte.

Bezüglich des Alters, der Krankheitsdauer sowie der Centromer-Antikörper konnten keine signifikanten Korrelationen zu den restlichen Parametern festgestellt werden.

## 5 Diskussion

Die systemische Sklerose ist eine entzündlich-rheumatologische Erkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Charakteristische Klinik ist die massive Kollagenablagerung in der Haut, die zur chronischen Fibrosierung führt (Ferrel et al., 2017). Weiterhin kommt es zur Fibrose in den Organsystemen, in denen sich das Kollagen abgelagert, beispielsweise des Gastrointestinaltrakts, des Herzens, der Niere und der Lunge (Bose et al., 2015; Denton & Khanna, 2017; McFarlane et al., 2018). Die Lungenfibrose ist hierbei die Hauptursache für die erhöhte Mortalität bei Erkrankten (Fischer et al., 2019). Neben der eingeschränkten Lebenserwartung führt die systemische Sklerose jedoch häufig auch zur eingeschränkten Lebensqualität, die unter anderem durch die durch Fibrose bedingten Einschränkungen, beispielsweise der Funktion der Hände, im Alltag hervorgerufen werden (Almeida et al., 2015).

Neben der Fibrose sind die Gefäßveränderungen ein zentraler Punkt der Pathophysiologie, welche in der klinischen Praxis mit der Nagelpfalzmikroskopie dargestellt werden können. Anfangs zeigt sich eine reduzierte Anzahl an Kapillaren. Im Verlauf zeigen sich vermehrt vergrößerte Kapillaren mit veränderter Struktur. Es kommt zu Einblutungen ins Kapillarbett. Im finalen Stadium gehen die Kapillaren verloren (Cutolo et al., 2004; Koenig et al., 2008).

Die Vaskulopathie ist einer der Angriffspunkte für die medikamentöse Intervention. Neben Kalzium-Antagonisten vom Nifedipin-Typ, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten wird Iloprost, ein intravenös appliziertes Prostacyclin-Analogon eingesetzt (Kowal-Bielecka et al., 2017). Iloprost ist ein synthetisches Prostacyclin-Analogon der zweiten Generation. Es führt zur Vasodilatation und Aggregationshemmung (Della Bella et al., 2001; Negrini et al., 2019). Neben den direkten Effekten am Gefäßsystem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Iloprost das Immunsystem modulieren kann, was sogar für einen Monat nachweisbar ist (D'Amelio et al., 2010; Della Bella et al., 2001; Mazzone et al., 1996).

Eine Hauptursache zur Minderung der Lebensqualität Betroffener stellen neuropathische Schmerzen dar, ein Indiz für eine Schädigung des peripheren Nervensystems (Cuzdan et al., 2018; Predrag Ostojic et al., 2019; Sousa-Neves et al., 2018). Obwohl schon früh eine Assoziation zwischen systemischer Sklerose und des peripheren Nervensystems

angenommen wurde, so gelten die neurologischen Manifestationen als seltene Komplikationen der Krankheit (Amaral et al., 2013; Richter, 1954).

Eine Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei Autoimmunerkrankungen ist jedoch keine Seltenheit. So wiesen in einer Studie zur Kleinfaserneuropathie 19 % der 921 Testpersonen immunologische Auffälligkeiten auf (De Greef et al., 2018). Bei der Fibromyalgie weisen die Hälfte der Erkrankten eine Kleinfaserpathologie auf (Grayston et al., 2018). Beim Sjögren-Syndrom (Sène et al., 2013), dem systemischen Lupus erythematodes (Omdal et al., 2002) und der Sarkoidose (M. Bakkers et al., 2010) sind ebenfalls Beteiligungen der kleinen Nervenfasern beschrieben.

Langerhans-Zellen kommen primär epidermal vor. Aufgrund der Struktur nahm Paul Langerhans an, es würde sich um Zellen des Nervensystems handeln (Ruco et al., 1989). Die Funktion ist aktuell noch nicht vollständig verstanden, es besteht jedoch die Hypothese, dass die Langerhans Zellen physiologisch regulierend auf das Immunsystem der Haut wirken (Clayton et al., 2017). In Bezug auf die systemische Sklerose könnten die Langerhans-Zellen möglicherweise eine Rolle in der Pathophysiologie spielen. Bisher wurden jedoch wenige Studien zu Langerhans-Zellen in Bezug zur systemischen Sklerose durchgeführt (Andrews et al., 1986; Goobar et al., 1987).

Ziel dieser Studie ist, den Zusammenhang zwischen den kleinen Nervenfasern und der systemischen Sklerose zu prüfen. Weiterhin soll der Effekt von Iloprost, einem vasoaktiven Medikament zur Förderung der akralen Durchblutung, auf die kleinen Nervenfasern untersucht werden (Scorza et al., 2001). Der Grad der Hautbeteiligung wurde mittels eines publizierten SSc-Hautscores bewertet (Van Praet et al., 2011). Für die Analyse der Gefäßdichte führten wir eine digital-automatisiertes Verfahren zur Evaluierung des Gefäßstatus der Haut in Form einer Gefäßflächendichtemessung. Weiterhin wurde die Langerhans-Zell-Dichte mit einem digital-automatisiertem Verfahren gemessen.

## **5.1 Hautveränderungen bei Systemischer Sklerose**

Ein Hauptmerkmal der systemischen Sklerose sind die Veränderungen der Haut. In der Regel gibt es drei Stadien: (1) Verdickung der Haut, (2) Verhärtung und (3) Atrophie. Erkrankte leiden häufig unter Ulzera und Nekrosen an den betroffenen Stellen (Ferrel et al., 2017). Eine etablierte Methode zur klinischen Bewertung der Hautbeteiligung ist der modifizierte Rodnan Skin Score (mRSS). Dabei wird die Haut an 17 verschiedenen Stellen untersucht (Czirjak et al., 2007). Der mRSS gibt Auskunft über die Aktivität der Erkrankung und korreliert als unabhängiger Faktor mit der Mortalität (Kumánovics et al., 2017). In unserer Studie zeigte die SSc-Kohorte mit einem durchschnittlichen mRSS von 1,67 Punkten von 51 möglichen Punkten eine geringe klinische Hautbeteiligung auf.

Histologisch zeigt sich in Hautbiopsien bei systemischer Sklerose eine Ansammlung von Kollagen in der Dermis und der Subkutis. Strukturen wie Haarfollikel oder Schweißdrüsen werden durch Bindegewebe ummauert (Laga, Larson, & Granter, 2017). Trotz der beschriebenen Veränderungen ist bisher kein standardisiertes Verfahren zur histologischen Beurteilung der Haut etabliert worden (Kumánovics et al., 2017). In der Arbeit von Van Praet et al. (2011) konnte gezeigt werden, dass einige histologische Merkmale der systemischen Sklerose vermehrt auftreten und mit der lokalen Hautbeteiligung korrelierten.

In der Arbeit von Van Praet et al. (2011) wurden die Biopsien am dorsalen Unterarm am Übergang zwischen zweiten und dritten proximalen Drittel und am inneren Oberarm entnommen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei einzelnen Parametern zwischen betroffener und gesunder Haut bei SSc-Erkrankten. Im Vergleich zur Kontrollkohorte ergab sich in genannter Studie kein signifikanter Unterschied bei jeglichen Parametern (Van Praet et al., 2011). Anhand dieser Merkmale nutzen wir in unserer Studie einen modifizierten Hautscore zur Beurteilung der Hautbeteiligung. Unsere Biopsien wurden an nicht betroffenen Hautbereichen des volaren Unterarms, 15 Zentimeter proximal des Processus styloideus ulnaris, entnommen.

### **5.1.1 SSc-Hautscore bei Erkrankten**

Unsere Studie zeigte einen höheren Hautscore in der SSc-Gruppe im Vergleich zur Kontrollkohorte, jedoch ohne statistische Signifikanz. Dementsprechend zeigte auch der klinisch erhobene Hautscore mRSS, dass lediglich drei Proband\*innen einen Score über

null zeigten. Somit ist im generellen von einer geringen Krankheitsaktivität auszugehen.

### **5.1.2 Hautbeteiligung unter Iloprost-Therapie**

Iloprost ist ein Standardmedikament in der Therapie zur Behandlung von digitalen Ulzera, von schwerer Raynaud-Symptomatik und pulmonalarteriellen Hypertonus (Kowal-Bielecka et al., 2017). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass bei Proband\*innen mit systemischer Sklerose unter Iloprost-Therapie eine Reduktion des mRSS erzielt werden konnte (Bettoni et al., 2002; Foti et al., 2017; Scarsi et al., 2011; Scorza et al., 2001; Stratton, 2002). Der mRSS ist unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität und zeigt außerdem eine negative Korrelation zur Lebensqualität (Kumánovics et al., 2017; Park, Strand, Oh, Song, & Lee, 2019; Van Leeuwen, Ciaffi, Liem, Huizinga, & De Vries-Bouwstra, 2021).

Der Hautscore unserer SSc-Kohorte sank signifikant unter Therapie ( $p = 0,026$ ). Bei bereits klinisch mittels mRSS nachgewiesener Wirkung von Iloprost auf die Hautbeteiligung decken sich unserer Ergebnisse somit mit der Literatur (Bettoni et al., 2002; Foti et al., 2017; Scarsi et al., 2011). Der posttherapeutische Wert unterschreitet jedoch ebenfalls den Wert der Kontrollkohorte. Interessant wäre hier der posttherapeutische Wert von Gesunden. Möglicherweise führt die Therapie mit Iloprost zur generellen Verbesserung des Hautscores. Eine Aussage hierüber konnte jedoch aufgrund unseres Studiendesigns nicht getroffen werden.

## **5.2 Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei der systemischen Sklerose**

In einer Metaanalyse wurde eine Prävalenz für periphere Neuropathien bei 27,37 % aller Patient\*innen mit systemischer Sklerose beschrieben (Almehmadi et al., 2021). Ätiologisch wird angenommen, dass der fibrotische Umbau des Bindegewebes der Nerven sowie die vaskulopathische Malnutrition der versorgenden Gefäße zur Nervenschädigung führt (Di Trapani et al., 1982; Richter, 1954).

Klinisch leiden bis zu einer Hälfte der Patient\*innen mit systemischer Sklerose unter neuropathischen Schmerzen (Cuzdan et al., 2018; Ostojic et al., 2018; Sousa-Neves et al., 2018). In quantitativen sensorischen Testungen weisen Testpersonen mit systemischer Sklerose erhöhte Schwellenwerte auf taktile Reize und Temperaturreize auf (Schady et al., 1991). Darüber zeigen sich bei der systemischen Sklerose verlängerte Latenzen und reduzierte Amplituden in der sympathischen Hautreaktion im Sinne einer autonomen Dysfunktion (Badry et al., 2018; Schady et al., 1991; Zakrzewska-Pniewska et al., 1999). Unter Berücksichtigung der inter- und intraindividuellen Variabilität sowie der fehlenden Differenzierungsmöglichkeit zwischen zentraler und peripherer Läsion kann dies Hinweis für eine Kleinfaserpathologie sein (Baum, 2018; Hijazi et al., 2020; Illigens & Gibbons, 2009). Zudem weisen SSc-Erkrankte erhöhte COMPASS31-Werte auf, einem Screening-Fragebogen für verschiedene Symptome der autonomen Dysfunktion (Adler et al., 2018). In der Metaanalyse zu peripheren Neuropathien wurde der Großteil der Neuropathien als Kleinfaserneuropathien beschrieben, hauptsächlich durch klinische Untersuchung, Anamnese oder quantitative sensorische Testung diagnostiziert (Almehmadi et al., 2021). In Hautbiopsien wurde eine Kleinfaserbeteiligung der systemischen Sklerose jedoch bisher nur in einer Studie gefunden (Provitera et al., 2005). Ziel unserer Studie ist es, die Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei der systemischen Sklerose in Hautbiopsien zu untersuchen.

### **5.2.1 Epidermale Nervenfaserdichte**

Bei der Diagnostik zur Abklärung einer Kleinfaserneuropathie wird die Biopsie am Unterschenkel abgenommen. Für die Entnahme am Unterschenkel bestehen Referenzdaten der epidermalen Nervenfaserdichte, die einen Vergleich mit der gesunden Durchschnittsbevölkerung ermöglichen. Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Normwerte

von Alter und Geschlecht (Collongues et al., 2018; Görlach et al., 2020; Lauria, Bakkers, et al., 2010; Provitera et al., 2016). Die Proben in unserer Studie wurden jedoch vom volaren Unterarm, 15 Zentimeter proximal des Processus styloideus ulna entnommen. Bei der systemischen Sklerose sind die Unterarme in der Regel am stärksten betroffen (Ferrelli et al., 2017). Neben Gefäß- und Hautbeteiligung ist möglicherweise auch eine Schädigung der Nerven hier am ehesten festzustellen, wenn es sich um einen lokalen Prozess handelt. Allerdings bringt die Biopsieentnahme am Unterarm den Nachteil, dass für den Vergleich nur kleine Datensätze zur Verfügung stehen, bei denen Alters- und Geschlechtsabhängigkeit bisher nicht untersucht wurde (Chien et al., 2001; Weyer-Menckhoff et al., 2019).

Im Vergleich zu den publizierten Daten von Chien et al. (2001) und Weyer-Menckhoff et al. (2019) wies unsere SSc-Kohorte im Schnitt eine geringere epidermale Nervenfaserdichte auf. Das Alter unserer SSc-Kohorte lag im Schnitt über dem Mittelwert der Kohorten der beiden Publikationen. Obwohl eine Altersabhängigkeit der epidermalen Nervenfaserdichte am Unterarm bisher nicht beschrieben wurde, ist dies jedoch in Analogie zu den Werten am Unterschenkel wahrscheinlich (Collongues et al., 2018; Lauria, Bakkers, et al., 2010; Provitera et al., 2016).

In unserer Studie zeigte die SSc-Kohorte keinen signifikanten Unterschied der epidermalen Nervenfaserdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Analyse der Hautbiopsien weist daher nicht darauf hin, dass eine Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei systemischer Sklerose vorliegt.

In der Publikation von Provitera et al. (2005) wurde eine Reduktion der epidermale Nervenfaserdichte bei SSc-Erkrankten im Vergleich zur Kontrollkohorte beschrieben. Die Erkrankten äußerten keine Symptome einer Neuropathie. Im Unterschied zu unserer Studie wurden die Biopsien aus Unterschenkel und Hüfte entnommen. Im Vergleich zu unserer Studie zeigten in der Studie von Provitera et al. (2005) ein höherer Anteil der Proband\*innen eine diffuse Form der systemischen Sklerose. Bei Betrachtung der Einzelwerte von Provitera et al. (2005) fällt auf, dass vor allem Proband\*innen, die unter der diffusen Form der systemischen Sklerose leiden, eine reduzierte epidermale Nervenfaserdichte aufweisen (Provitera et al., 2005). Dagegen haben in unserer Kohorte lediglich zwei Patientinnen eine diffuse Form der systemischen Sklerose. Möglicherweise

spielt die Beteiligung der kleinen Nervenfasern vor allem bei der diffusen Form der systemischen Sklerose eine Rolle. Vor allem Erkrankte mit diffuser Form beschreiben neuropathische Schmerzen und zeigen pathologische sympathische Hautreaktionen (Sousa-Neves et al., 2018; Zakrzewska-Pniewska et al., 1999).

In unserer Studie wurden keine weiteren Untersuchungen zur Eingrenzung einer Pathologie der kleinen Nervenfasern, wie z.B. QST, Testung autonomer Funktionen oder Schmerzfragebögen, durchgeführt.

Wenn man die pathologischen Veränderungen der Haut betrachtet, zeigte sich in unserer Kohorte ein geringer durchschnittlicher klinischer mRSS unserer SSc-Kohorte. In anderen Studien konnte vor allem bei einem erhöhten mRSS eine reduzierte epidermale Nervenfaserdichte sowie neuropathische Schmerzen nachgewiesen werden (Provitera et al., 2005; Sousa-Neves et al., 2018). Möglicherweise ist die unserer Studie gezeigte normale epidermale Nervenfaserdichte auf den geringen Grad der Erkrankungsaktivität unserer SSc-Kohorte bei einem durchschnittlichen mRSS 1,67 ( $\pm 2,8$ ) zurückzuführen.

In einer Studie von 2018 wurden mittels Antikörper gegen Growth-associated Proteine 43 (GAP43) regenerierende Nervenfasern dargestellt. In einer Doppelfärbung mit PGP 9.5 wurde sowohl die Nervenfaserdichte der PGP 9.5-positiven Fasern als auch der GAP43-positiven Fasern ausgewertet und ins Verhältnis gesetzt. Brennende Schmerzen gingen vermehrt einher mit einem höheren Verhältnis von GAP43-positiven Fasern zu PGP 9.5-positiven Fasern (Galosi et al., 2018). In unserer Studie sollte dieses Verhältnis analysiert werden mit der Fragestellung, ob es in der systemischen Sklerose und vor allem nach Gabe von Iloprost zur vermehrten Regeneration von Nervenfasern kommt. Jedoch konnte der Antikörper an den Dickschnitten der Studie nicht so etabliert werden, dass eine morphometrische Analyse möglich war.

### **5.2.2 Epidermale Nervenfaserdichte unter Iloprost-Therapie**

Als Ursache der peripheren Nervenschädigung im Rahmen der systemischen Sklerose wird unter anderem eine vaskuläre Malnutrition der Nervenfasern angenommen (Matucci-Cerinic et al., 1996). In den aktuellen Leitlinien wird die Therapie mit dem vasoaktiven Medikament Iloprost empfohlen, zur Behandlung schwerwiegender

Raynaud-Symptomatiken sowie auch digitaler Ulzera (Kowal-Bielecka et al., 2017). Iloprost fördert die Weitstellung der Gefäße und hemmt die Proliferation der Gefäßmuskelzellen (Negrini et al., 2019). Es wirkt somit der Gewebsmalnutrition und damit verbundenen Nervenschädigung entgegen und könnte eine Regeneration der Nervenfasern induzieren (Provitera et al., 2007).

In unserer Studie fanden wir in der SSc-Kohorte nach Therapie mit Iloprost jedoch keine signifikante Steigerung der epidermalen Nervenfaserdichte. Gegensätzlich hierzu zeigte Provitera et al. (2007) einen signifikanten Anstieg der epidermalen Nervenfaserdichte bei einzelnen Proband\*innen mit systemischer Sklerose unter Iloprost-Therapie. Die Ausgangswerte vor Therapie waren bei den entsprechenden Proband\*innen jedoch sehr niedrig (Provitera et al., 2007).

### 5.3 Gefäßflächendichte

Pathologische Veränderungen der Gefäße spielen bei der systemischen Sklerose eine zentrale Rolle (Fleming et al., 2009). Als klinische Untersuchungsmethode wird vor allem die Nagelpfalzmikroskopie zur Beurteilung der kleinen Gefäße genutzt. Durch die Nagelpfalzmikroskopie können bereits frühzeitig die morphologischen Veränderungen an den Gefäßen nachgewiesen werden (Koenig et al., 2008). In der Praxis unterscheidet man zwischen drei Mustern. Beim frühen Muster kommt es zur Erweiterung der Kapillarschlingen und kleinen Einblutungen. Im aktiven Stadium steigt die Anzahl an Megakapillaren und Blutungen. Im späten Stadium sind die Ordnung der Kapillaren aufgehoben und die Dichte an Kapillaren nimmt stark ab (Lambova & Müller-Ladner, 2019). Das späte Stadium korreliert mit einer langen Krankheitsdauer. Zudem korreliert kapillarmikroskopisch das späte Stadium mit der diffusen Form der systemischen Sklerose, die limitierte Form weist eher ein frühes oder aktives Muster auf (Cutolo et al., 2004).

In unserer Arbeit war das Ziel, die Gefäßveränderungen histologisch darzustellen und zu quantifizieren. Methodisch existiert zur histologischen Auswertung der kleinen Gefäße der Haut zurzeit kein standardisiertes Verfahren in der Literatur. Daher etablierten wir ein digital-automatisiertes Verfahren, das die Gefäßflächendichte in der Haut in einer bestimmten Messtiefe misst. Mit den Messtiefen unterhalb der Basalmembran von 225  $\mu\text{m}$  und 500  $\mu\text{m}$  orientierten wir uns an den Arbeiten von Provitera et al. (2005) und Sohn et al. (2020).

#### 5.3.1 Gefäßflächendichte der systemischen Sklerose

In der Literatur weisen Hautbiopsien bei systemischer Sklerose eine reduzierte dermale Gefäßflächendichte auf (de-Sá-Earp et al., 2013; Provitera et al., 2005). In unserer Studie können wir diesen Zusammenhang nicht bestätigen. Bei einer Messtiefe von 500  $\mu\text{m}$  zeigte sich gegenteilig die Gefäßdichte der SSc-Kohorte im Vergleich zur gesunden Kohorte signifikant erhöht. Bei 225  $\mu\text{m}$  verfehlte diese Erhöhung jedoch die Signifikanz. Diese Befunde könnten möglicherweise ein Ausdruck der Megakapillaren in der frühen oder aktiven Phase sein. Unsere SSc-Kohorte besteht zu einem großen Teil an Erkrankungen der limitierten Form, welche vermehrt kapillarmikroskopisch das aktive

Muster aufweisen (Cutolo et al., 2004). Die Kohorten der bisherigen Studien wiesen mit 73 und 55 Prozent einen wesentlich höheren Anteil an diffuser Form der systemischen Sklerose auf (de-Sá-Earp et al., 2013; Provitera et al., 2005). So zeigen beispielweise Proband\*innen mit diffuser systemischer Sklerose in der Arbeit von Provitera et al. (2005) eine stark reduzierte Gefäßflächendichte im Vergleich zur limitierten Form.

Kapillarmikroskopisch zeigt sich das aktive Muster ebenfalls vermehrt bei einer mittleren Krankheitsdauer (Cutolo et al., 2004). In unserer Studie wurde der Zusammenhang Krankheitsdauer und Gefäßdichte untersucht, eine signifikante Korrelation konnte jedoch nicht gezeigt werden.

In unserer Studie wurden bei der SSc-Kohorte sowie der Kontrollkohorte vor Therapie eine Nagelpfalzmikroskopie durchgeführt. Die durchschnittlich gemessene niedrigere Kapillardichten der SSc-Kohorte entspricht den typischen Veränderungen der systemischen Sklerose. Sie steht jedoch im Gegensatz zur erhöhten Gefäßflächendichte, welche wir Hautbiopsien gefunden haben. Dieser Widerspruch könnte durch die charakteristischen morphologischen Veränderungen der kleinen Gefäße in der systemischen Sklerose bedingt sein. Während sich Anzahl der Gefäße durch die Erkrankung reduziert, bilden sich Megakapillaren, die eine höhere Gefäßfläche aufweisen (Lambova & Müller-Ladner, 2019; Shenavandeh, Sepaskhah, Dehghani, & Nazarinia, 2022). Somit steigt die Gefäßfläche der einzelnen Gefäße. Kapillarmikroskopisch wurde jedoch nur die Anzahl der Kapillaren untersucht. Auf das Vorhandensein und die Anzahl von Megakapillaren wurden unsere SSc-Kohorte leider nicht untersucht.

In unserer Studie konnten die bisherigen Ergebnisse zur Gefäßflächendichte bei der systemischen Sklerose nicht bestätigt werden. In Bezug zur Pathophysiologie gehen wir davon aus, dass die gesteigerte Gefäßflächendichte durch die Megakapillaren der aktiven Phase der systemischen Sklerose bedingt ist. Unsere Werte sind im Vergleich zu den publizierten Daten ein Indiz für Unterschiede der Vaskulopathie von limitierter und diffuser Form der systemischen Sklerose. In unserer Studie litten lediglich zwei Patientinnen unter der diffusen Form.

Unter den verschiedenen antinukleären Antikörpern sind die Zentromer-Antikörper mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines pulmonalarteriellen Hypertonus assoziiert

(Denton & Khanna, 2017). Auch mikrovaskulär zeigt sich eine Assoziation zur Ausbildung von aufgetriebenen Kapillaren sowie Kapillarverlust bei den Zentromer-Antikörpern (Koenig et al., 2008). In unserer Studie konnten wir jedoch keinen Einfluss der Zentromer-Antikörper auf die Gefäßdichte erkennen und diese These somit nicht bekräftigen.

### **5.3.2 Gefäßflächendichte unter Iloprost-Therapie**

Laut den aktuellen Empfehlungen zur systemischen Sklerose wird die Iloprost-Therapie zur Heilung akraler Ulzera genutzt. Bei schweren Verläufen der Raynaud-Symptomatik kann ebenfalls eine Iloprost-Therapie erwogen werden (Kowal-Bielecka et al., 2017). Neben der Vasodilatation und Thrombozytenaggregationshemmung konnten Veränderungen der kleinen Gefäße beobachtet werden (Cestelli et al., 2017; Provitera et al., 2007). Ziel unserer Studie ist die Veränderungen der kleinen Gefäße durch Iloprost mithilfe der Gefäßflächendichte-Messung zu quantifizieren.

Nagelpfalzmikroskopisch wurde unter Iloprost-Therapie eine signifikante Reduktion der Megakapillaren beschrieben (Cestelli et al., 2017). Eine signifikante Reduktion der histologischen Gefäßflächendichte konnte jedoch in unsere Studie nicht gezeigt werden. Eine erneute Nagelpfalzmikroskopie nach Iloprost-Therapie wurde jedoch in unserer Studie nicht durchgeführt.

In einer Publikation konnte bei drei Proband\*innen ein signifikanter Anstieg der Gefäßflächendichte unter Iloprost-Therapie gezeigt werden. Hier zeigten sich jedoch bereits die Ausgangswerte der entsprechenden Proband\*innen vor Therapie sehr niedrig (Provitera et al., 2007).

In beiden Vergleichsstudien ist das Intervall zwischen den Untersuchungen mindestens ein Jahr (Cestelli et al., 2017; Provitera et al., 2007). In unserer Studie wurde die zweite Biopsie bereits nach drei Monaten entnommen. In einer weiteren klinischen Studie zeigt sich ebenfalls keine Reduktion der Megakapillaren nach Therapie mit Iloprost nach 4 Wochen (Shenavandeh et al., 2022). Möglicherweise benötigen die strukturellen Veränderungen der Gefäße eine längere Zeitspanne.

## 5.4 Langerhans-Zellen

Als dendritische Zellen der Epidermis sind die Langerhans-Zellen in der Lage, Antigene zu präsentieren, die die Hautschanke nicht passieren können (Kitashima et al., 2018). Langerhans-Zellen greifen regulativ in das Immunsystem ein und hemmen so überschießende Immunreaktionen (Kitashima et al., 2018; Van Der Aar et al., 2013). Zudem spielen Langerhans-Zellen bei der Heilung von chronischen Wunden eine Rolle (Stojadinovic et al., 2013).

Bei der systemischen Sklerose finden sich zu Langerhans-Zellen Publikationen mit unterschiedlichen Ergebnissen. Goobar et al. (1987) zeigte eine reduzierte Anzahl von Langerhans-Zellen bei Hautbiopsien mit systemischer Sklerose, jedoch nur in pathologische veränderter Haut (Goobar et al., 1987). Andrews et al. (1986) fand zusätzlich in nicht veränderter Haut eine Reduktion der Langerhans-Zellen (Andrews et al., 1986). Dem entgegen wurde in einer neueren Publikation eine erhöhte Langerhans-Zell-Dichte beschrieben wurde (Xie et al., 2008).

In unserer Studie konnten wir keinen Unterschied der Langerhans-Zell-Dichte in der Haut der SSc-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte feststellen. Es zeigte sich allerdings, dass in der SSc-Kohorte die Langerhans-Zell-Dichte signifikant mit der epidermalen Nervenfaserdichte korrelierte.

Die These einer Beteiligung der Langerhans-Zellen in der Pathophysiologie der systemischen Sklerose können wir daher nicht bekräftigen. Über die Funktion können wir anhand unserer Methoden keine Aussage treffen. Weitere Studien sind nötig, um die generelle Funktion der Langerhans-Zellen, insbesondere auf autoimmune Phänomene genauer beschreiben zu können.

## 5.5 Limitationen

Der gesamten SSc-Kohorte wurde im Rahmen unserer Studie eine Iloprost-Therapie verabreicht. Da keine Kohorte ohne Iloprost-Therapie parallel untersucht wurde, können die gemessenen Veränderungen nicht eindeutig dem Einfluss der Iloprost-Therapie zugeordnet werden. Eine spontane Veränderung ist ebenfalls möglich. Weiterhin erhielt die Kontrollkohorte keine Iloprost-Therapie oder eine zweite Biopsie.

Gemessen am mRSS-Hautscore wies SSc-Kohorte lediglich eine geringe Hautbeteiligung auf. Erkrankte mit einem schweren Verlauf konnten somit durch unsere Studienpopulation nicht ausreichend repräsentiert werden. Zudem wurden die Biopsien ausschließlich an nicht betroffenen Hautstellen entnommen. Es ist möglich, dass besonders an betroffenen Hautstellen und bei erhöhter kutaner Krankheitsaktivität pathologische Veränderungen stärker ausgeprägt sind.

Die systemische Sklerose wird in verschiedene Subtypen unterschieden: eine limitierte und eine diffuse Form. In Publikationen werden vermehrt neuropathische Schmerzen, auffällige sympathische Hautreaktionen, eine reduzierte Gefäßflächendichte sowie auch vermehrt späte Muster in der Kapillarmikroskopie beschrieben (Cutolo et al., 2004; de-Sá-Earp et al., 2013; Sousa-Neves et al., 2018; Zakrzewska-Pniewska et al., 1999). In unserer Studie hatten nur zwei Proband\*innen eine diffuse Form. Weitere Studien zur diffusen Form sowie einer größeren Hautbeteiligung wären hier interessant, um die verschiedenen Unterformen der systemischen Sklerose besser voneinander abzugrenzen.

In unserer Studie wurde die „Free-Floating“-Methode zur Färbung der Nervenfasern durchgeführt (Nolano et al., 2015). Nachteil dieser Methode ist jedoch die Ablösung des subkutanen Fettgewebes der Schnitte. Tiefe Strukturen wie Schweißdrüsen oder tiefliegende Blutgefäße konnten wir daher nicht in unserer Studie analysieren.

Durch die Entnahme der Biopsien am volaren Unterarm existieren zu den epidermalen Nervenfasern nur kleine Datensätze zum Vergleich. Die Entnahmestelle liegt jedoch so den primären Manifestationsstellen der systemischen Sklerose näher (Ferrel et al., 2017). Im Vergleich zu den standardisierten Entnahmestellen ist somit ein Vergleich mit Referenzwerten abhängig von Alter und Geschlecht nicht möglich.

Der Vergleich unserer SSc-Kohorte zur gesunden Population ist durch die Repräsentation die geringe Stichprobengröße unserer Kontrollkohorte nur eingeschränkt möglich.

Die Gefäßdichte wurde in unserer Studie mit einer Messung der Gefäßflächendichte an digitalisierten Schnitten quantifiziert. Vorteil unserer automatisierten Gefäßdichtemessung ist im Vergleich zur manuellen Chalkley-Zählung eine schnellere und einfachere Auswertung der Schnitte. Als standardisierte Methode ist mit der automatisierten Gefäßflächendichte-Messung eine einfache objektive Messung des histologischen Gefäßstatus möglich. Klinische Routine stellt jedoch die weniger invasive Kapillarmikroskopie dar.

Bezüglich der digitalen Gefäßdichtemessung ist weiterhin zu beachten, dass eine einheitliche Färbeintensität der Gefäße aufgrund unterschiedlicher individueller Färbereigenschaften nicht immer gegeben ist (Potts et al., 2014). Eine individuelle Anpassung der Exportiereinstellungen zum Ausgleich der individuellen Farbunterschiede wurde zwar vorgenommen, ermöglicht jedoch die subjektive Verzerrung durch den Untersucher (Potts et al., 2014).

CD31 ist ein sensibler Marker zur Darstellung von Gefäßen, jedoch exprimieren Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten ebenfalls CD31 (Horak et al., 1992). Die chronische Inflammation mit leukozytären Infiltraten in der systemischen Sklerose könnte den Anteil der CD31-positiven Fläche erhöhen (Fleischmajer, Perlish, & Reeves, 1977). Dieser Fehler wurde versucht, systematisch mit einer Mindestflächengröße der Gefäße im Grafikanalyseprogramm zu vermeiden.

Aufgrund der Ergebnisse gehen wir von erweiterten Kapillarschlingen bei unserer SSc-Kohorte aus. Eine morphologische Untersuchung mittels Kapillarmikroskopie wurde jedoch nicht durchgeführt, wodurch diese Hypothese nur angenommen werden kann. Weiterhin wurde keine erneute Kontrolle der Kapillarmikroskopie nach Therapie durchgeführt, um die Entwicklung der Kapillaren bei der systemischen Sklerose unter Iloprost darzustellen. Hier wurde sich in dieser Arbeit auf die verfügbaren Publikationen zu diesem Thema bezogen.

Für die Darstellung der Langerhans-Zellen stehen mehrere Antikörper zur Verfügung, jedoch stellt Langerin in aktuellen Studien den spezifischsten Marker dar (Casanova-Molla et al., 2012; Séguier et al., 2003; Stojadinovic et al., 2013).

Auch bei der Messung der Langerhans-Zellen stellt unsere automatisierte Messung eine zeiteffiziente und genaue Methode dar. Die Fehlzählung von Artefakten sowie die Epidermisselektion wurde durch den Untersucher kontrolliert und unterliegt somit seinem subjektiven Einfluss.

## 5.6 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Hautbiopsien von SSc-Erkrankten auf allgemeine Hautveränderungen sowie auf die epidermale Nervenfaserdichte, Gefäßflächendichte und die Langerhans-Zellen untersucht.

Bei der systemischen Sklerose gilt die Gefäßveränderung als zu Grunde liegende Pathologie. Die Nagelpfalzmikroskopie stellt hier die gängige klinische Untersuchung da. Unsere SSc-Kohorte wiesen entsprechend der Literatur eine reduzierte Kapillardichte in der Nagelpfalz auf. Histologisch zeigte sich allerdings eine signifikant erhöhte Gefäßflächendichte. Die erhöhte Fläche bei erniedrigter Anzahl von Gefäßen interpretieren wir als vergrößerte Gefäßfläche im Rahmen der charakteristischen Megakapillaren bei systemischer Sklerose. Ein signifikanter Effekt der Therapie in Form einer Reduktion der Gefäßflächendichte unter intravenösem Iloprost konnte nicht gezeigt werden. Möglicherweise ist mit einer längeren Therapiedauer ein signifikanter Effekt zu erreichen.

Die epidermale Nervenfaserdichte bei der SSc-Kohorte deckte sich mit den bisher publizierten Daten zu Hautbiopsien am Unterarm gesunder Personen. Im Vergleich zu unserer Kontrollkohorte ohne systemische Sklerose konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. In der Literatur wird beschrieben, dass neuropathische Schmerzen vermehrt bei der diffusen Form sowie einer erhöhten Hautbeteiligung vorkommen (Sousa-Neves et al., 2018). Unsere SSc-Kohorte enthielt einen sehr geringen Anteil an Proband\*innen mit diffuser Form sowie eine geringe Hautbeteiligung. Es sind daher weitere Studien zur Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei höherer Krankheitsaktivität sowie der diffusen Form notwendig. Weiterhin wurden die Hautbiopsien von gesunden Hautbereichen entnommen, sodass wir über die epidermale Nervenfaserdichte in erkrankten Hautabschnitten keine Aussage treffen können.

Bei bereits prätherapeutisch normaler epidermalen Nervenfaserdichte zeigte sich auch nach Iloprost-Therapie keine signifikante Veränderung der Werte.

Die Langerhans-Zellen sind in den Hautproben der SSc-Kohorte im Vergleich zur Kontrollkohorte reduziert, wenn auch nicht auf signifikantem Niveau. Mehrere Studien zeigen ein ähnliches Bild der systemischen Sklerose. Iloprost nahm auf die Langerhans-Zell-Dichte keinen Einfluss. Die mögliche Funktion der Langerhans-Zellen in der systemischen Sklerose sowie die Beteiligung in den Pathomechanismus der systemischen

Sklerose konnte somit nicht bekräftigt werden. Entsprechend den anderen Parametern können wir hier ebenfalls keine Aussage zu stärker betroffenen Erkrankten sowie der diffusen Form treffen.

In dieser Studie wurde ein histologischer SSc-Hautscore für die systemische Sklerose erstellt und angewendet. Unter dem Einfluss von intravenösem Iloprost konnten wir eine signifikante Reduktion des Hautscores darstellen. Alternativ zum therapeutischen Effekt des Iloprost muss jedoch ebenfalls eine spontane Reduktion des Hautscores in Erwägung gezogen werden. Durch das Design ohne Kontrollgruppe ohne Iloprost-Therapie ist hier keine eindeutige Aussage zu treffen.

Zusammenfassend zeigte sich in unserer Studie eine erhöhte Gefäßflächendichte bei reduzierter Kapillarzahl der SSc-Kohorte, die wir auf die charakteristischen Megakapillaren in der systemischen Sklerose zurückführen. Die restlichen Parameter, epidermale Nervenfaserdichte, Langerhans-Zell-Dichte und Hautscore zeigten nur geringe Veränderungen, passend zur geringen Krankheitsaktivität bei unserer SSc-Kohorte. Eine Beteiligung der kleinen Nervenfasern in der systemischen Sklerose können wir somit nicht bestätigen.

## 6 Zusammenfassung

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch fortschreitende Fibrosierung der Haut und weiterer Organsysteme gekennzeichnet ist. Durch die charakteristische Vaskulopathie kommt es zur Gewebsunterversorgung, die zu Atrophie der Haut sowie Ulzera und Nekrosen führt. Unklar ist, ob die kleinen epidermalen Nervenfasern im Rahmen der Erkrankung geschädigt werden. Eine Beteiligung von Langerhans-Zellen (LC) als epidermale Immunzellen ist nicht bekannt.

Medikamentös kann Iloprost, ein Prostazyklin-Analogen der Vaskulopathie entgegenwirken und klinisch die Fibrosierung hemmen sowie die akrale Perfusion verbessern.

Fragestellung unserer Studie war, ob es bei der SSc zu einer Beteiligung der der kleinen Hautnervenfasern kommt (1). Weiter sollte histologisch die Hautbeteiligung und der Gefäßstatus sowie die LC analysiert und in Bezug zu den klinischen Parametern gesetzt werden (2). Schließlich sollte der Einfluss von intravenösem Iloprost auf die Histologie der Haut untersucht werden (3). Hierzu wurden Hautbiopsien von 24 SSc-Erkrankten histologisch auf epidermale Nervenfaserdichte (END), dermale Gefäßflächendichte (VD), die Hautbeteiligung sowie die LC-Dichte untersucht und mit sieben gesunden Kontrollen verglichen. Klinisch wurden die Parameter mit dem mRSS (engl.: „*modified Rodnan Skin Score*“) und der Kapillarmikroskopie der Nagelpfalz verglichen. Nach einem Zyklus intravenösem Iloprost wurde der SSc-Kohorte erneut Biopsien entnommen und untersucht.

END und LC-Dichte zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die SSc-Kohorte wies eine signifikant erhöhte VD bei kapillarmikroskopisch reduzierter Kapillardichte auf, was wir als SSc-typisch aufgetriebene Kapillaren werten. Unter Iloprost-Therapie kam es zu keiner signifikanten Abnahme der VD.

Eine Beteiligung der kleinen Nervenfasern im Krankheitsbild der systemischen Sklerose kann somit in unserer Studie nicht bestätigt werden. Unsere SSc-Kohorte wies im mRSS sowie im histologischen Hautscore eine geringe Hautbeteiligung auf. Weiterhin litten 91,7 % an der limitierten SSc-Form. Studien bezüglich eines höheren mRSS sowie der diffusen Form sind hier zum besseren Verständnis der SSc notwendig.

## 7 Summary

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease that causes fibrosis of the skin. As the disease progresses, blood vessels degenerate, leading to poor circulation in the affected areas. This leads to skin atrophy and, in some cases, ulceration and necrosis. It is still unclear whether the small epidermal nerve fibres are damaged by the disease. The involvement of Langerhans cells as epidermal immune cells is also poorly understood.

A well-established medical therapy for vasculopathy in SSc is iloprost, a prostacyclin analogue, which clinically reduces fibrosis and improves vascular status.

The aim of our study was (1) to determine whether small cutaneous nerve fibres are affected in systemic sclerosis. (2) To measure histologically skin involvement and vascular status as well as Langerhans cells and to relate them to clinical parameters. (3) Finally, to investigate the influence of intravenous iloprost therapy on skin histology.

For this purpose, skin biopsies from 24 patients\* with SSc were histologically examined for epidermal nerve fibre density (END), dermal vascular density (VD), skin involvement and Langerhans cell density (LC density) and compared with a control group of seven healthy subjects. Clinical parameters were compared with the modified Rodnan Skin Score (mRSS) and nailfold videocapillaroscopy. After one cycle of intravenous iloprost, a biopsy was taken from the SSc cohort and analysed for the above parameters.

Our study showed no significant differences in END and LC density between the healthy and SSc cohorts. Compared to the healthy control, the SSc cohort showed significantly increased VD with decreased capillary density by capillary microscopy, which we believe is most likely a phenomenon of megacapillaries in the context of the disease pattern. There was no significant reduction in VD with iloprost therapy.

Thus, the involvement of small nerve fibres in the clinical picture of systemic sclerosis cannot be confirmed in our study. However, our SSc cohort showed low skin involvement in both mRSS and histological skin score. Also, our SSc cohort consisted almost exclusively of the limited form. Studies of SSc patients\* with higher disease activity or diffuse form are needed for a better understanding of SSc.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
ANA	Antinukleäre Antikörper
CCN-1	<i>Cellular communication network factor 1</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cenp	<i>Centromeric protein</i>
CKMNF116	Kreatinkinase MNF 116, engl.: „ <i>creatine kinase MNF 116</i> ”
COMPASS 31	<i>Composite Autonomic Symptom Score 31</i>
CZI	<i>Carl Zeiss Image Data File</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLCO	Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität, engl.: „ <i>diffusion capacity of the lung for carbon monoxid</i> ”
dSSc	Diffuse systemische Sklerose
EFNS	<i>European Federation of Neurological Societies</i>
END	Epidermale Nervenfaserdichte
EULAR	<i>European League against Rheumatism</i>
EvG	Elastika-van-Gieson
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GAP43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible transcription factor 1</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
LC	Langerhans-Zellen, engl.: „ <i>Langerhans cells</i> “
lSSc	Limitierte systemische Sklerose
mRSS	modifizierter Rodnan Skin Score
n.a.	nicht angegeben
Nr.	Nummer
PAH	Pulmonalerterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalerterieller Blutdruck
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PGP9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
PNG	<i>Portable Network Graphics</i>
PNS	<i>Peripheral Nerve Society</i>
QST	Quantitative Sensorische Testung
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: „ <i>ribonucleic acid</i> ”
ROI	<i>Region of Interest</i>
SFN	Kleinfaserneuropathie, engl.: „ <i>small-fiber neuropathy</i> “
SSc	Systemische Sklerose, engl.: „ <i>systemic sclerosis</i> ”
SSR	Sympathische Hautreaktion, engl.: „ <i>sympathetic skin response</i> “
v.a.	Vor allem
VAS	Visuelle Analogskala
VD	Gefäßdichte, engl.: „ <i>vessel density</i> ”

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign.....	24
Abbildung 2: Gewinnung und Bearbeitung der Proben. ....	25
Abbildung 3: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz (nach Im et al. 2019). ....	26
Abbildung 4: Epidermale Nervenfasern bei 40-facher Vergrößerung. 27	
Abbildung 5: Darstellung der Hautgefäße mit Immunfluoreszenzfärbung. ....	29
Abbildung 6: Darstellung der Langerhans-Zellen mit Immunfluoreszenzfärbung.....	29
Abbildung 7: Darstellung von Nervenfaserverregeneration.....	30
Abbildung 8: Ausmessung der Epidermislänge an PGP9.5 gefärbten Hautschnitten. ...	33
Abbildung 9: Auswertung der intraepidermalen Nervenfasern (modifiziert nach Lauria et al., 2005).....	34
Abbildung 10: Manuelle Markierung der IF-Schnitte.....	36
Abbildung 11: Autofokus.....	36
Abbildung 12: Fluoreszenzkanäle. ....	37
Abbildung 13: z-Stack. ....	37
Abbildung 14: Analyse der Gefäßdichte: Bestimmung der ROI. ....	39
Abbildung 15: Farbschwellwertmessungen mit ImageJ.....	39
Abbildung 16: Einstellung der Epidermis zur automatischen Flächenerkennung. ....	41
Abbildung 17: Auswertung der Langerhans-Zell-Dichte mit ImageJ. ....	41
Abbildung 18: Hautpathologie I.....	43
Abbildung 19: Hautpathologie II. ....	43
Abbildung 20: Teleangiektasie.....	44
Abbildung 21: Analyse der END. ....	60
Abbildung 22: Korrelation der END. ....	60
Abbildung 23: Analyse der Gefäßdichte.....	61
Abbildung 24: Korrelation der Gefäßdichte mit der END. ....	62
Abbildung 25: Analyse der LC-Dichte.....	63
Abbildung 26: Korrelation der LC-Dichte mit Alter und Krankheitsdauer. ....	63
Abbildung 27: Korrelation der LC-Dichte mit END und VD. ....	64
Abbildung 28: Analyse des Hautscores. ....	65
Abbildung 29: Korrelation des Hautscores zu Alter und Krankheitsdauer.....	65
Abbildung 30: Korrelation des Hautscores mit den weiteren Parametern. ....	66

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organbeteiligungen bei systemischer Sklerose (Jaeger et al., 2016). .....	5
Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose einer systemischen Sklerose nach ACR/EULAR. ...	12
Tabelle 3: Fasertypen nach Erlanger und Gasser (Pape, Kurtz, & Silbernagl, 2019). ...	15
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper.....	31
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper.....	32
Tabelle 6: Hautscore bei der systemischen Sklerose.....	44
Tabelle 7: Kontrollkohorte ohne Systemische Sklerose. ....	46
Tabelle 8: Kohorte mit Systemische Sklerose.....	47
Tabelle 9: Analyse der Immunfluoreszenzschnitte.....	49
Tabelle 10: Bestimmung des histologischen SSc-Hautscores.....	50
Tabelle 11: Bestimmung des histologischen SSc-Hautscores.....	51
Tabelle 12: Bestimmung des histologischen SSc-Hautscores.....	52
Tabelle 13: Transformation des histologischen SSc-Hautscores.....	53
Tabelle 14: Korrelationen der histologischen Parameter der prätherapeutischen SSc-Kohorte. ....	54
Tabelle 15: Korrelation der histologischen Variablen mit den klinischen Werten der SSc-Kohorte. ....	55
Tabelle 16: Korrelationen der histologischen Parameter der Kontrollen. ....	56
Tabelle 17: Korrelationen der histologischen Parameter mit den klinischen Werten der Kontrollen. ....	56
Tabelle 18: Shapiro-Wilk-Test der Variablen der unabhängigen Stichproben.....	57
Tabelle 19: Mittelwertvergleiche zwischen der prätherapeutischen SSc-Kohorte und den Kontrollen. ....	58
Tabelle 20: Mittelwertvergleiche zwischen der prätherapeutischen SSc-Kohorte und den Kontrollen. ....	59
Tabelle 21: Vergleich der Befunde in Abhängigkeit der Centromer-Antikörper.....	67

# 11 Literatur

- Abbot, S., Bossingham, D., Proudman, S., De Costa, C., & Ho-Huynh, A. (2018). Risk factors for the development of systemic sclerosis: a systematic review of the literature. *Rheumatology Advances in Practice*, 2(2), 1-12.
- Adler, B. L., Russell, J. W., Hummers, L. K., & McMahan, Z. H. (2018). Symptoms of Autonomic Dysfunction in Systemic Sclerosis Assessed by the COMPASS-31 Questionnaire. *The Journal of Rheumatology*, 45(8), 1145-1152.
- Albelda, S. M., Muller, W. A., Buck, C. A., & Newman, P. J. (1991). Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *The Journal of Cell Biology*, 114(5), 1059-1068.
- Almehmadi, B. A., To, F. Z., Anderson, M. A., & Johnson, S. R. (2021). Epidemiology and Treatment of Peripheral Neuropathy in Systemic Sclerosis. *The Journal of Rheumatology*, 48(12), 1839-1849.
- Almeida, C., Almeida, I., & Vasconcelos, C. (2015). Quality of life in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 14(12), 1087-1096.
- Altork, N., Tsou, P.-S., Coit, P., Khanna, D., & Sawalha, A. H. (2015). Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(8), 1612-1620.
- Amaral, T. N., Peres, F. A., Lapa, A. T., Marques-Neto, J. F., & Appenzeller, S. (2013). Neurologic involvement in scleroderma: A systematic review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 43(3), 335-347.
- Ambrosius, H., & Lippa, H. (1987). *Immunohistochemie*. Berlin: Akademie-Verlag Berlin.
- Ames, P. R., Lupoli, S., Alves, J., Atsumi, T., Edwards, C., Iannaccone, L., . . . Brancaccio, V. (1997). The coagulation/fibrinolysis balance in systemic sclerosis: evidence for a haematological stress syndrome. *Rheumatology*, 36(10), 1045-1050.
- Andrews, B. S., Friou, G. J., Barr, R. J., Mirick, G. R., Berman, M., Sandborg, C., & Ross, P. A. (1986). Loss of epidermal Langerhans' cells and endothelial cell HLA-DR antigens in the skin in progressive systemic sclerosis. *The Journal of Rheumatology*, 13(2), 341-348.
- Arthur, R. P., & Shelley, W. B. (1959). The innervation of human epidermis. *J Invest Dermatol*, 32(3), 397-411.
- Asano, Y. (2018). Systemic sclerosis. *The Journal of Dermatology*, 45(2), 128-138.
- Badry, R., Gamal, R. M., Hassanien, M. M., El Hamed, M. A., Hammam, N., & El Fawal, B. M. (2018). Sympathetic skin response in patients with systemic sclerosis and rheumatoid arthritis. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 54(1), 1-5.
- Bakkers, M., Faber, C. G., Drent, M., Hermans, M. C. E., Nes, S. I., Lauria, G., . . . Merkies, I. S. J. (2010). Pain and autonomic dysfunction in patients with sarcoidosis and small fibre neuropathy. *Journal of Neurology*, 257(12), 2086-2090.
- Bakkers, M., Faber, C. G., Hoeijmakers, J. G. J., Lauria, G., & Merkies, I. S. J. (2014). Small fibers, large impact: Quality of life in small-fiber neuropathy. *Muscle & Nerve*, 49(3), 329-336.
- Barnes, J., & Mayes, M. D. (2012). Epidemiology of systemic sclerosis: incidence,

- prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Current Opinion in Rheumatology*, 24, 165-170.
- Barrel, K., & Smith, A. G. (2018). Peripheral Neuropathy. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 383-397.
- Bassel, M., Hudson, M., Taillefer, S. S., Schieir, O., Baron, M., & Thombs, B. D. (2011). Frequency and impact of symptoms experienced by patients with systemic sclerosis: results from a Canadian National Survey. *Rheumatology*, 50(4), 762-767.
- Baum, P. (2018). Neurophysiologische Diagnostik des autonomen Nervensystems. *Das Neurophysiologie-Labor*, 40(2), 95-110.
- Bellando-Randone, S., & Matucci-Cerinic, M. (2017). Very Early Systemic Sclerosis and Pre-systemic Sclerosis: Definition, Recognition, Clinical Relevance and Future Directions. *Current Rheumatology Reports*, 19(10), 1-6.
- Bettoni, L., Geri, A., Airò, P., Danieli, E., Cavazzana, I., Antonioli, C., . . . Cattaneo, R. (2002). Systemic Sclerosis Therapy with Iloprost: A Prospective Observational Study of 30 Patients Treated for a Median of 3 Years. *Clinical Rheumatology*, 21(3), 244-250.
- Bhatti, S. S., Kumar, L., Dinda, A. K., & Dawar, R. (2006). Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: Use of light microscopy as well as computerized image analyzer in the assessment of microvessel density and total vascular area in multiple myeloma and its correlation with various clinical. *American Journal of Hematology*, 81(9), 649-656.
- Birbeck, M. S., Breathnach, A. S., & Everall, J. D. (1961). An Electron Microscope Study of Basal Melanocytes and High-Level Clear Cells (Langerhans Cells) in Vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology*, 37(1), 51-64.
- Block, J. A., & Sequeira, W. (2001). Raynaud's phenomenon. *The Lancet*, 357(9273), 2042-2048.
- Bongi, S. M., Angela, d. R., Passalacqua, M., Miccio, S., & Matucci Cerinic, M. (2011). Manual Lymph Drainage Improving Upper Extremity Edema and Hand Function in Patients With Systemic Sclerosis in Edematous Phase. *Arthritis Care & Research*, 63(8), 1134-1141.
- Bose, N., Chiesa-Vottero, A., & Chatterjee, S. (2015). Scleroderma renal crisis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 44(6), 687-694.
- Casanova-Molla, J., Morales, M., Planas-Rigol, E., Bosch, A., Calvo, M., Grau-Junyent, J. M., & Valls-Solé, J. (2012). Epidermal Langerhans cells in small fiber neuropathies. *Pain*, 153, 982-989.
- Castelino, F. V., & Varga, J. (2014). Emerging cellular and molecular targets in fibrosis: implications for scleroderma pathogenesis and targeted therapy. *Current Opinion in Rheumatology*, 26, 607-614.
- Cestelli, V., Manfredi, A., Sebastiani, M., Praino, E., Cannarile, F., Giuggioli, D., & Ferri, C. (2017). Effect of treatment with iloprost with or without bosentan on nailfold videocapillaroscopic alterations in patients with systemic sclerosis. *Modern Rheumatology*, 27(1), 110-114.
- Chalkley, H. W. (1943). Method for the Quantitative Morphologic Analysis of Tissues. *Journal of the National Cancer Institute*, 4, 47-53.
- Chien, H.-F., Tseng, T.-J., Lin, W.-M., Yang, C.-C., Chang, Y.-C., Chen, R.-C., & Hsieh, S.-T. (2001). Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin. *Acta Neuropathologica*, 102(5), 455-461.
- Choi, M. Y., & Fritzler, M. J. (2016). Progress in understanding the diagnostic and pathogenic role of autoantibodies associated with systemic sclerosis. *Current*

- Opinion in Rheumatology*, 28(6), 586-594.
- Clayton, K., Vallejo, A. F., Davies, J., Sirvent, S., & Polak, M. E. (2017). Langerhans Cells - Programmed by the Epidermis. *Frontiers in Immunology*, 8(1676), 1-14.
- Collongues, N., Samama, B., Schmidt-Mutter, C., Chamard-Witkowski, L., Debouverie, M., Chanson, J.-B., . . . Boehm, N. (2018). Quantitative and qualitative normative dataset for intraepidermal nerve fibers using skin biopsy. *PLOS ONE*, 13(1), 1-14.
- Cutolo, M., Pizzorni, C., Tuccio, M., Burrioni, A., Craviotto, C., Basso, M., . . . Sulli, A. (2004). Nailfold videocapillaroscopic patterns and serum autoantibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology*, 43(6), 719-726
- Cuzdan, N., Turk, I., Sarpel, T., Erken, E., & Alparslan, Z. N. (2018). Neuropathic pain: is it an underestimated symptom in systemic sclerosis? *Clinical Rheumatology*, 37(7), 1845-1851.
- Czirjak, L., Nagy, Z., Aringer, M., Riemekasten, G., Matucci-Cerinic, M., & Furst, D. E. (2007). The EUSTAR model for teaching and implementing the modified Rodnan skin score in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 66(7), 966-969.
- D'Amelio, P., Cristofaro, M. A., D'Amico, L., Veneziano, L., Roato, I., Sassi, F., . . . Isaia, G. C. (2010). Iloprost modulates the immune response in systemic sclerosis. *BMC Immunology*, 11(62), 1-7.
- Dalsgaard, C.-J., Ryth, M., & Haegerstrand, A. (1989). Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. *Histochemistry*, 92, 385-389.
- de-Sá-Earp, A. P., Nascimento, A. P. d., Carneiro, S. C., Porto, L. C., & Monte-Alto-Costa, A. (2013). Dermal Dendritic Cell Population and Blood Vessels Are Diminished in the Skin of Systemic Sclerosis Patients: Relationship With Fibrosis Degree and Disease Duration. *American Journal of Neuropathology*, 35(4), 438-444.
- De Greef, B. T. A., Hoeijmakers, J. G. J., Gorissen-Brouwers, C. M. L., Geerts, M., Faber, C. G., & Merkies, I. S. J. (2018). Associated conditions in small fiber neuropathy - a large cohort study and review of the literature. *European Journal of Neurology*, 25(2), 348-355.
- Della Bella, S., Molteni, M., Mocellin, C., Fumagalli, S., Bonara, P., & Scorza, R. (2001). Novel mode of action of iloprost: in vitro downregulation of endothelial cell adhesion molecules. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 65, 73-83.
- Denton, C. P., & Khanna, D. (2017). Systemic sclerosis. *The Lancet*, 390(10103), 1685-1699.
- Depner, C., Zum Buttel, H., Böğürçü, N., Cuesta, A. M., Aburto, M. R., Seidel, S., . . . Acker-Palmer, A. (2016). EphrinB2 repression through ZEB2 mediates tumour invasion and anti-angiogenic resistance. *Nature Communications*, 7:12329, 1-15.
- Devigili, G., Rinaldo, S., Lombardi, R., Cazzato, D., Marchi, M., Salvi, E., . . . Lauria, G. (2019). Diagnostic criteria for small fibre neuropathy in clinical practice and research. *Brain*, 142, 3728-3736.
- Devigili, G., Tugnoli, V., Penza, P., Camozzi, F., Lombardi, R., Melli, G., . . . Lauria, G. (2008). The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain*, 131(7), 1912-1925.
- Di Trapani, G., Pocchiari, M., Masullo, C., Albanese, A., & Tulli, A. (1982). Peripheral neuropathy in the course of progressive systemic sclerosis: Light and ultrastructural study. *The Italian Journal of Neurological Sciences*, 3(4), 341-

- 348.
- Distler, O., Distler, J. H. W., Scheid, A., Acker, T., Hirth, A., Rethage, J., . . . Gay, S. (2004). Uncontrolled Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors Leads to Insufficient Skin Angiogenesis in Patients With Systemic Sclerosis. *Circulation Research*, *95*(109-116).
- Donaldson, J. G. (2015). Immunofluorescence Staining. *Current Protocols in Cell Biology*, *69*(1), 4.3.1-4.3.7.
- Elhai, M., Avouac, J., Kahan, A., & Allanore, Y. (2015). Systemic sclerosis: Recent insights. *Joint Bone Spine*, *82*(3), 148-153.
- Ellezam, B., Leclair, V., Troyanov, Y., Meyer, A., Hudson, M., & Landon-Cardinal, O. (2021). Capillary basement membrane reduplication in myositis patients with mild clinical features of systemic sclerosis supports the concept of 'scleromyositis'. *Acta Neuropathologica*, *142*(2), 395-397.
- Enax-Krumova, E. K., Dahlhaus, I., Görlach, J., Claeys, K. G., Montagnese, F., Schneider, I., . . . Schänzer, A. (2022). Small fiber involvement is independent from clinical pain in late-onset Pompe disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *17*(1), 1-10.
- Ferrel, C., Gasparini, G., Parodi, A., Cozzani, E., Rongioletti, F., & Atzori, L. (2017). Cutaneous Manifestations of Scleroderma and Scleroderma-Like Disorders: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *53*(3), 306-336.
- Fischer, A., Patel, N. M., & Volkmann, E. R. (2019). Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis: Focus on Early Detection and Intervention. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews*, *11*, 283-307.
- Fleischmajer, R., Perlsh, J. S., & Reeves, J. R. T. (1977). Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis & Rheumatism*, *20*(4), 975-984.
- Fleming, J. N., Nash, R. A., Mahoney, W. M., & Schwartz, S. M. (2009). Is scleroderma a vasculopathy? *Current Rheumatology Reports*, *11*(2), 103-110.
- Foti, R., Visalli, E., Amato, G., Benenati, A., Converso, G., Farina, A., . . . Di Gangi, M. (2017). Long-term clinical stabilization of scleroderma patients treated with a chronic and intensive IV iloprost regimen. *Rheumatology International*, *37*(2), 245-249.
- Fox, S., Leek, R. D., Weekes, M. P., Whitehouse, R. M., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (1995). Quantitation and prognostic Value of Breast Cancer Angiogenesis: Comparison of Microvessel Density, Chalkley Count, and Computer Image Analysis. *Journal of Pathology*, *177*, 275-283.
- Freyhagen, R., Baron, R., Gockel, U., & Tölle, T. R. (2006). painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Current Medical Research and Opinion*, *22*(10), 1911-1920.
- Galosi, E., La Cesa, S., Di Stefano, G., Karlsson, P., Fasolino, A., Leone, C., . . . Truini, A. (2018). A pain in the skin. Regenerating nerve sprouts are distinctly associated with ongoing burning pain in patients with diabetes. *European Journal of Pain*, *22*(10), 1727-1734.
- Gibbons, C. H., Illigens, B. M. W., Centi, J., & Freeman, R. (2008). QDIRT: Quantitative direct and indirect test of sudomotor function. *Neurology*, *70*(24), 2299-2304.
- Gibbons, C. H., Illigens, B. M. W., Wang, N., & Freeman, R. (2009). Quantification of sweat gland innervation: a clinical-pathologic correlation. *Neurology*, *72*, 1479-1486.
- Goobar, J. P., Fang, M., Weisman, M. H., Zvaifler, N., & Gigli, I. (1987). Langerhans

- Cells in Connective Tissue Diseases. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 16(4), 273-279.
- Görlach, J., Amsel, D., Kölbl, H., Grzybowski, M., Rutsch, F., Schlierbach, H., . . . Schänzer, A. (2020). Diagnostic utility of small fiber analysis in skin biopsies from children with chronic pain. *Muscle & Nerve*, 61(2), 173-181.
- Grayston, R., Czanner, G., Elhadd, K., Goebel, A., Frank, B., Üçeyler, N., . . . Alam, U. (2018). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Prevalence of Small Fiber Pathology in Fibromyalgia: Implications for a new Paradigm in Fibromyalgia Etiopathogenesis. *Seminars in Arthritis & Rheumatism*, 48(5), 933-940.
- Hachulla, E., Agard, C., Allanore, Y., Avouac, J., Bader-Meunier, B., Belot, A., . . . Kollegen. (2021). French recommendations for the management of systemic sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(332), 1-61.
- Henze, A.-T., Garvalov, B. K., Seidel, S., Cuesta, A. M., Ritter, M., Filatova, A., . . . Acker, T. (2014). Loss of PHD3 allows tumours to overcome hypoxic growth inhibition and sustain proliferation through EGFR. *Nature Communications*, 5(5582), 1-12.
- Hijazi, M. M., Buchmann, S. J., Sedghi, A., Illigens, B. M., Reichmann, H., Schackert, G., & Siepmann, T. (2020). Assessment of cutaneous axon-reflex responses to evaluate functional integrity of autonomic small nerve fibers. *Neurological Sciences*, 41, 1685–1696.
- Ho, Y. Y., Lagares, D., Tager, A. M., & Kapoor, M. (2014). Fibrosis - a lethal component of systemic sclerosis. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(7), 390-402.
- Horak, E. R., Klenk, N., Leek, R., Lejeune, S., Smith, K., Stuart, N., . . . Stepniowska, K. (1992). Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *The Lancet*, 340, 1120-1124.
- Hughes, M., & Herrick, A. L. (2017). Digital ulcers in systemic sclerosis. *Rheumatology*, 56, 14-25.
- Illigens, B. M. W., & Gibbons, C. H. (2009). Sweat testing to evaluate autonomic function. *Clinical Autonomic Research*, 19(2), 79-87.
- Itoh, M., Yanaba, K., Kobayashi, T., & Nakagawa, H. (2007). Taxane-induced scleroderma. *British Journal of Dermatology*, 156(2), 363-367.
- Jaeger, V. K., Wirz, E. G., Allanore, Y., Rossbach, P., Riemekasten, G., Hachulla, E., . . . Walker, U. A. (2016). Incidences and Risk Factors of Organ Manifestations in the Early Course of Systemic Sclerosis: A Longitudinal EUSTAR Study. *PLOS ONE*, 11(10), 1-15.
- Juche, A., Siegert, E., Mueller-Ladner, U., Riemekasten, G., Günther, C., Kötter, I., . . . Moynadeh, P. (2020). Versorgungsrealität der stationären vasoaktiven Therapie mit Prostazyklinderivaten bei Patienten mit akralen Durchblutungsstörungen bei systemischer Sklerose in Deutschland. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 79, 1057–1066.
- Jung, P., & Trautinger, F. (2013). Capillaroscopy. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11(8), 731-736.
- Kao, L., & Weyand, C. (2010). Vasculitis in Systemic Sclerosis. *International Journal of Rheumatology*, 2010, 1-9.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220-233.
- Kennedy, W. R., Wendelschafer-Crabb, G., & McArthur, M. P. J. C. (2005). Chapter 34

- Pathology and Quantitation of Cutaneous Innervation. *Peripheral Neuropathy (Fourth Edition)*, 1, 869-895.
- Khan, S., & Zhou, L. (2012). Characterization of non-length-dependent small-fiber sensory neuropathy. *Muscle & Nerve*, 45(1), 86-91.
- Khanna, D., Furst, D. E., Clements, P. J., Allanore, Y., Baron, M., Czirjak, L., . . . Denton, C. P. (2017). Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord*, 2(1), 11-18.
- Kitashima, D. Y., Kobayashi, T., Woodring, T., Idouchi, K., Doebel, T., Voisin, B., . . . Nagao, K. (2018). Langerhans Cells Prevent Autoimmunity via Expansion of Keratinocyte Antigen-Specific Regulatory T Cells. *EBioMedicine*, 27, 293-303.
- Koenig, M., Joyal, F., Fritzler, M. J., Roussin, A., Abrahamowicz, M., Boire, G., . . . Sénécal, J.-L. (2008). Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: A twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*, 58(12), 3902-3912.
- Korkolopoulou, P., Viniou, N., Kavantzias, N., Patsouris, E., Thymara, I., Pavlopoulos, P., . . . Yataganas, X. (2003). Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: a morphometric study. *Leukemia*, 17(1), 89-97.
- Kowal-Bielecka, O., Fransen, J., Avouac, J., Becker, M., Kulak, A., Allanore, Y., . . . Müller-Ladner, U. (2017). Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(8), 1327-1339.
- Kuhn, A., Brachtendorf, G., Kurth, F., Sonntag, M., Samulowitz, U., Metze, D., & Vestweber, D. (2002). Expression of Endomucin, a Novel Endothelial Sialomucin, in Normal and Diseased Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(6), 1388-1393.
- Kumánovics, G., Péntek, M., Bae, S., Opris, D., Khanna, D., Furst, D. E., & Czirják, L. (2017). Assessment of skin involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology*, 56, v53-v66.
- Kuwana, M., & Okazaki, Y. (2014). Brief Report: Impaired In Vivo Neovascularization Capacity of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Systemic Sclerosis. *66(5)*, 1300-1305.
- Lacomis, D. (2002). Small-Fiber Neuropathy. *Muscle & Nerve*, 26, 173-178.
- Laga, A. C., Larson, A., & Granter, S. R. (2017). Histopathologic Spectrum of Connective Tissue Diseases Commonly Affecting the Skin. *Surgical Pathology Clinics*, 10(2), 477-503.
- Lambova, S. N., & Müller-Ladner, U. (2019). Nailfold capillaroscopy in systemic sclerosis – state of the art: The evolving knowledge about capillaroscopic abnormalities in systemic sclerosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, 4(3), 200-211.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie Und Für Klinische Medicin*, 44(2-3), 325-337.
- Lau, S. K., Chu, P. G., & Weiss, L. M. (2008). Immunohistochemical Expression of Langerin in Langerhans Cell Histiocytosis and Non-Langerhans Cell Histiocytic Disorders. *The American Journal of Surgical Pathology*, 32(4), 615-619.
- Lauria, G., Bakkers, M., Schmitz, C., Lombardi, R., Penza, P., Devigili, G., . . . Merkies, I. S. J. (2010). Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide

- normative reference study. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 15, 202–207.
- Lauria, G., Cornblath, D. R., Johansson, O., McArthur, J. C., Mellgren, S. I., Nolano, M., . . . Sommer, C. (2005). EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *European Journal of Neurology*, 12, 747-758.
- Lauria, G., Holland, N., Hauer, P., Cornblath, D. R., Griffin, J. W., & McArthur, J. C. (1999). Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*, 164(2), 172-178.
- Lauria, G., Hsieh, S. T., Johansson, O., Kennedy, W. R., Leger, J. M., Mellgren, S. I., . . . Valls-Solé, J. (2010). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *European Journal of Neurology*, 17, 903-912.
- Lauria, G., Morbin, M., Lombardi, R., Borgna, M., Mazzoleni, G., Sghirlanzoni, A., & Pareyson, D. (2003). Axonal swellings predict the degeneration of epidermal nerve fibers in painful neuropathies. *Neurology*, 61(5), 631-636.
- Matucci-Cerinic, M., Generini, S., Pignone, A., & Casale, R. (1996). The Nervous System in Systemic Sclerosis (Scleroderma). *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 22(4), 879-892.
- Mazzone, A., Mazzucchelli, I., Fossati, G., Gritti, D., Girola, S., Canale, C., . . . G., R. (1996). Iloprost effects on phagocytes in patients suffering from ischaemic diseases: in vivo evidence for down-regulation of  $\alpha M\beta 2$  integrin. *European Journal of Clinical Investigation*, 26, 860-866.
- McArthur, J. C., Stocks, E. A., Hauer, P., Cornblath, D. R., & Griffin, J. W. (1998). Epidermal Nerve Fiber Density. *Archives of Neurology*, 55(12), 1513-1520.
- McFarlane, I. M., Bhamra, M. S., Kreps, A., Iqbal, S., Ani, F. A., Aponte, C. S., . . . Atluri, P. (2018). Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. *Rheumatology: Current Research*, 8(1), 1-15.
- Merz, E. L., Malcarne, V. L., Roesch, S. C., Nair, D. K., Salazar, G., Assassi, S., & Mayes, M. D. (2017). Longitudinal patterns of pain in patients with diffuse and limited systemic sclerosis: integrating medical, psychological, and social characteristics. *Quality of Life Research*, 26(1), 85-94.
- Minier, T., Guiducci, S., Bellando-Randone, S., Bruni, C., Lepri, G., Czirják, L., . . . Matucci-Cerinic, M. (2014). Preliminary analysis of the Very Early Diagnosis of Systemic Sclerosis (VEDOSS) EUSTAR multicentre study: evidence for puffy fingers as a pivotal sign for suspicion of systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(12), 2087-2093.
- Morgan-Rowe, L., Nikitorowicz, J., Shiwen, X., Leask, A., Tsui, J., Abraham, D., & Stratton, R. (2011). Thrombospondin 1 in hypoxia-conditioned media blocks the growth of human microvascular endothelial cells and is increased in systemic sclerosis tissues. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4(13), 1-9.
- Müller, A. M., Hermanns, M. I., Skrzynski, C., Nesslinger, M., Müller, K.-M., & Kirkpatrick, C. J. (2002). Expression of the Endothelial Markers PECAM-1, vWf, and CD34 in Vivo and in Vitro. *Experimental and Molecular Pathology*, 72(3), 221-229.
- Negrini, S., Magnani, O., Matucci-Cerinic, M., Carignola, R., Data, V., Montabone, E., . . . Beretta, L. (2019). Iloprost use and medical management of systemic sclerosis-related vasculopathy in Italian tertiary referral centers: results from the

- PROSIT study. *Clinical and Experimental Medicine*, 19(3), 357-366.
- Nolano, M., Biasiotta, A., Lombardi, R., Provitera, V., Stancanelli, A., Caporaso, G., . . . Lauria, G. (2015). Epidermal innervation morphometry by immunofluorescence and bright-field microscopy. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 20(4), 387-391.
- Omdal, R., Mellgren, S. I., Gøransson, L., Skjesol, A., Lindal, S., Koldingsnes, W., & Husby, G. (2002). Small nerve fiber involvement in systemic lupus erythematosus: A controlled study. *Arthritis & Rheumatism*, 46(5), 1228-1232.
- Ostojic, P., Jankovic, K., Djurovic, N., Stojic, B., Knezevic-Apostolski, S., & Bartolovic, D. (2019). Common Causes of Pain in Systemic Sclerosis: Frequency, Severity, and Relationship to Disease Status, Depression, and Quality of Life. *Pain Management Nursing*, 20(4), 331-336.
- Ostojic, P., Jovic, T., & Stojic, B. (2013). Restless legs syndrome in patients with systemic sclerosis. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 72(6), 590-593.
- Ostojic, P., Knezevic-Apostolski, S., Djurovic, N., Stojic, B., Jankovic, K., & Bartolovic, D. (2018). Neurological and electroneurography findings in patients with systemic sclerosis and symptoms of neuropathic pain in extremities. *Acta Neurologica Belgica*, 121, 205–209.
- Pape, H.-C., Kurtz, A., & Silbernagl, S. (2019). *Physiologie* (Vol. 9). Stuttgart: Thieme.
- Park, E. H., Strand, V., Oh, Y. J., Song, Y. W., & Lee, E. B. (2019). Health-related quality of life in systemic sclerosis compared with other rheumatic diseases: a cross-sectional study. *Arthritis Research & Therapy*, 21(1), 1-10.
- Pattanaik, D., Brown, M., Postlethwaite, B. C., & Postlethwaite, A. E. (2015). Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 6(272), 1-40.
- Pawlowski, A. (1963). The Nerve Network of the Skin in Diffuse Scleroderma and Clinically Similar Conditions. *Archives of Dermatology*, 88, 868-873.
- Potts, S. J., Eberhard, D. A., & Salama, M. E. (2014). Practical Approaches to Microvessel Analysis: Hotspots, Microvessel Density, and Vessel Proximity. *Methods in Pharmacology and Toxicology*.
- Prado, G. F., Allen, R. P., Trevisani, V. N. M. F., Toscano, V. G., & Earley, C. J. (2002). Sleep disruption in systemic sclerosis (scleroderma) patients: clinical and polysomnographic findings. *Sleep Medicine*, 3(4), 341-345.
- Prieto, V. G., Lugo, J., & McNutt, N. S. (1996). Intermediate- and low-molecular-weight keratin detection with the monoclonal antibody MNF116. An immunohistochemical study on 232 paraffin-embedded cutaneous lesions. *Journal of Cutaneous Pathology*, 23(3), 234-241.
- Provitera, V., Gibbons, C. H., Wendelschafer-Crabb, G., Donadio, V., Vitale, D. F., Stancanelli, A., . . . Nolano, M. (2016). A multi-center, multinational age- and gender-adjusted normative dataset for immunofluorescent intraepidermal nerve fiber density at the distal leg. *European Journal of Neurology*, 23, 333-338.
- Provitera, V., Nolano, M., Pappone, N., Girolamo, C. d., Stancanelli, A., Lullo, F., . . . Santoro, L. (2005). Distal degeneration of sensory and autonomic cutaneous nerve fibres in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(10), 1524-1526.
- Provitera, V., Nolano, M., Pappone, N., Lubrano, E., Stancanelli, A., Lanzillo, B., & Santoro, L. (2007). Axonal degeneration in systemic sclerosis can be reverted by factors improving tissue oxygenation. *Rheumatology*, 46(11), 1739-1741.
- Richter, R. B. (1954). Peripheral Neuropathy and Connective Tissue Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 13(1), 168-180.
- Ridley, A. (1969). Silver staining of nerve endings in human digital glabrous skin.

- Journal of Anatomy*, 104(1), 41-48.
- Rolke, R., Baron, R., Maier, C., Tölle, T. R., Treede, R.-D., Beyer, A., . . . Wasserka, B. (2006). Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): Standardized protocol and reference values. *Pain*, 123, 231-243.
- Rosas-Arellano, A., Villalobos-González, J. B., Palma-Tirado, L., Beltrán, F. A., Cárabez-Trejo, A., Missirlis, F., & Castro, M. A. (2016). A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochemistry and Cell Biology*, 146(4), 421-430.
- Ruco, L. P., Uccini, S., & Baroni, C. D. (1989). The Langerhans' cells. *Allergy*, 44, 27-30.
- Saigusa, R., Asano, Y., Taniguchi, T., Yamashita, T., Takahashi, T., Ichimura, Y., . . . Sato, S. (2015). A possible contribution of endothelial CCN1 downregulation due to Fli1 deficiency to the development of digital ulcers in systemic sclerosis. *Experimental Dermatology*, 24(2), 127-132.
- Samulowitz, U., Kuhn, A., Brachtendorf, G., Nawroth, R., Braun, A., Bankfalvi, A., . . . Vestweber, D. (2002). Human Endomucin : Distribution Pattern, Expression on High Endothelial Venules, and Decoration with the MECA-79 Epitope. *The American Journal of Pathology*, 160(5), 1669-1681.
- Scarsi, M., Rossi, M., Danieli, E., Frigè, A., Grotto, A., Zambruni, A., & Airò, P. (2011). Long-term effects of cyclic therapy with iloprost in systemic sclerosis. *Reumatismo*, 60(2), 114-119.
- Schady, W., Sheard, A., Hassell, A., Holt, L., Jayson, M. I. V., & Klimuk, P. (1991). Peripheral Nerve Dysfunction in Scleroderma. *Quarterly Journal of Medicine*, 80(292), 661-675.
- Schieir, O., Thombs, B. D., Hudson, M., Boivin, J.-F., Steele, R., Bernatsky, S., . . . Baron, M. (2010). Prevalence, severity, and clinical correlates of pain in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Care & Research*, 62(3), 409-417.
- Schlereth, T., e.V., D. G. f. N., e.V, D. S., -forschung, D. G. f. P. S. u., (ÖGN), Ö. G. f. N., Neurologie, S. G. f., . . . e.V., D. S. (2019). Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen, S2k-Leitlinie. in: *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*.
- Scorza, R., Caronni, M., Mascagni, B., Berruti, V., Bazzi, S., Micallef, E., . . . Vanoli, M. (2001). Effects of long-term cyclic iloprost therapy in systemic sclerosis with Raynaud's phenomenon. A randomized, controlled study. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 19, 503-508.
- Séguier, S., Bodineau, A., Godeau, G., Pellat, B., & Brousse, N. (2003). Langerin+ versus CD1a+ Langerhans cells in human gingival tissue: a comparative and quantitative immunohistochemical study. *Archives of Oral Biology*, 48(4), 255-262.
- Sène, D., Cacoub, P., Authier, F.-J., Haroche, J., Créange, A., Saadoun, D., . . . Lefaucheur, J.-P. (2013). Sjögren Syndrome-Associated Small Fiber Neuropathy. *Medicine*, 92(5), e10-e18. doi:10.1097/md.0000000000000005
- Sgonc, R., Gruschwitz, M. S., Böck, G., Sepp, N., Gruber, J., & Wick, G. (2000). Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis & Rheumatism*, 43(11), 2550-2562.
- Shenavandeh, S., Sepaskhah, M., Dehghani, S., & Nazarinia, M. (2022). A 4-week comparison of capillaroscopy changes, healing effect, and cost-effectiveness of

- botulinum toxin-A vs prostaglandin analog infusion in refractory digital ulcers in systemic sclerosis. *Clinical Rheumatology*, 41(1), 95-104.
- Siao, P., & Cros, D. P. (2003). Quantitative sensory testing. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 14, 261-286.
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *STEM CELLS*, 32(6), 1380-1389.
- Siegert, E., Uruha, A., Goebel, H. H., Preuße, C., Casteleyn, V., Kleefeld, F., . . . Stenzel, W. (2021). Systemic sclerosis-associated myositis features minimal inflammation and characteristic capillary pathology. *Acta Neuropathologica*, 141, 917-927.
- Sierra-Sepúlveda, A., Esquinca-González, A., Benavides-Suárez, S. A., Sordo-Lima, D. E., Caballero-Islas, A. E., Cabral-Castañeda, A. R., & Rodríguez-Reyna, T. S. (2019). Systemic Sclerosis Pathogenesis and Emerging Therapies, beyond the Fibroblast. *BioMed Research International*, 2019(Article ID 4569826), 1-15.
- Silberberg, I., Baer, R. L., & Rosenthal, S. A. (1976). The Role of Langerhans Cells in Allergic Contact Hypersensitivity. A Review of Findings in Man and Guinea Pigs. *The Journal of Investigative Dermatology*, 66(4), 210-217.
- Sobolewski, P., Maślińska, M., Wieczorek, M., Łagun, Z., Malewska, A., Roszkiewicz, M., . . . Walecka, I. (2019). Systemic sclerosis – multidisciplinary disease: clinical features and treatment. *Reumatologia*, 57(4), 221-233.
- Sohn, E., Suh, B. C., Wang, N., Freeman, R., & Gibbons, C. H. (2020). A novel method to quantify cutaneous vascular innervation. *Muscle & Nerve*, 62(4), 495-501.
- Sousa-Neves, J., Cerqueira, M., Santos-Faria, D., Afonso, C., & Teixeira, F. (2018). Neuropathic pain in Systemic Sclerosis patients: A cross-sectional study. *Rheumatologia Clínica*, 15(6), e99-e101.
- Steen, V. D. (2005). Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*, 35(1), 35-42.
- Stojadinovic, O., Yin, N., Lehmann, J., Pastar, I., Kirsner, R. S., & Tomic-Canic, M. (2013). Increased number of Langerhans cells in the epidermis of diabetic foot ulcers correlates with healing outcome. *Immunologic Research*, 57(1-3), 222-228.
- Stratton, R., Rajkumar, V., Ponticos, M., Nichols, B., Shiwen, X., Black, C. M., . . . Leask, A. (2002). Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF $\beta$ 2 by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *FASEB Journal*, 16(14), 1949-1951.
- Tavee, J., & Zhou, L. (2009). Small fiber neuropathy: A burning problem. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 76(5), 297-305.
- Terkelsen, A. J., Karlsson, P., Lauria, G., Freeman, R., Finnerup, N. B., & Jensen, T. S. (2017). The diagnostic challenge of small fibre neuropathy: clinical presentations, evaluations, and causes. *The Lancet*, 16, 934-944.
- Thaisetthawatkul, P., Fernandes Filho, J. A. M., & Herrmann, D. N. (2013). Contribution of QSART to the diagnosis of small fiber neuropathy. *Muscle & Nerve*, 48(6), 883-888.
- Treister, R., O'Neil, K., Downs, H. M., & Oaklander, A. L. (2015). Validation of the composite autonomic symptom scale 31 (COMPASS-31) in patients with and without small fiber polyneuropathy. *European Journal of Neurology*, 22(7), 1124-1130.
- Truchetet, M.-E., Allanore, Y., Montanari, E., Chizzolini, C., & Brembilla, N. C. (2012). Prostaglandin I2 analogues enhance already exuberant Th17 cell responses in

- systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(12), 2044-2050.
- Tyndall, A. J., Bannert, B., Vonk, M., Airo, P., Cozzi, F., Carreira, P. E., . . . Walker, U. A. (2010). Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(10), 1809-1815.
- Üceyler, N. (2016). Small fiber pathology—a culprit for many painful disorders? *Pain*, 157, 60-66.
- Van Den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S. R., Baron, M., Tyndall, A., . . . Pope, J. E. (2013). 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis & Rheumatism*, 65(11), 2737-2747.
- Van Der Aar, A. M. G., Picavet, D. I., Muller, F. J., De Boer, L., Van Capel, T. M. M., Zaat, S. A. J., . . . De Jong, E. C. (2013). Langerhans Cells Favor Skin Flora Tolerance through Limited Presentation of Bacterial Antigens and Induction of Regulatory T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(5), 1240-1249.
- Van Leeuwen, N. M., Ciaffi, J., Liem, S. I. E., Huizinga, T. W. J., & De Vries-Bouwstra, J. K. (2021). Health-related quality of life in patients with systemic sclerosis: evolution over time and main determinants. *Rheumatology*, 60(8), 3646-3655.
- Van Praet, J. T., Smith, V., Haspeslagh, M., Degryse, N., Elewaut, D., & De Keyser, F. (2011). Histopathological cutaneous alterations in systemic sclerosis: a clinicopathological study. *Arthritis Research & Therapy*, 13(R35).
- Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., & Folkman, J. (1991). Tumor Angiogenesis and Metastasis - Correlation in invasive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 324, 1-8.
- Weyer-Menkhoff, I., Pinter, A., Schlierbach, H., Schänzer, A., & Lötsch, J. (2019). Epidermal expression of human TRPM8, but not of TRPA1 ion channels, is associated with sensory responses to local skin cooling. *Pain*, 160(12), 2699-2709.
- Wilkinson, K., Lee, K., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J., & Pohl, J. (1989). The Neuron-Specific Protein PGP 9.5 Is a Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase. *Science*, 246(4930), 670-673.
- Xie, Y., Zhang, X., Inoue, Y., Wakasugi, S., Makino, T., & Ihn, H. (2008). Expression of CD1a and CD86 on scleroderma Langerhans cells. *European Journal of Dermatology*, 18(1), 50-54.
- Yang, J.-Q., Dou, T.-T., Chen, X.-B., Min, M., Cai, S.-Q., Zheng, M., & Man, X.-Y. (2015). Docetaxel-induced scleroderma: a case report and its role in the production of extracellular matrix. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 20, 1835-1837.
- Young, A., Namas, R., Dodge, C., & Khanna, D. (2016). Hand Impairment in Systemic Sclerosis: Various Manifestations and Currently Available Treatment. *Current Treatment Options in Rheumatology*, 2(3), 252-269.
- Zakrzewska-Pniewska, B., Jabłon´Ska, S., Kowalska-Olędzka, E., Błaszczuk, M., & Hausmanowa-Petrusewicz, I. (1999). Sympathetic Skin Response in Scleroderma, Scleroderma Overlap Syndromes and Inflammatory Myopathies. *Clinical Rheumatology*, 18(6), 473-480.

## 12 Anhang

### 12.1 Geräte

Axio Scan Z.1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Fluoreszenz-Mikroskop DM 2000	Leica, Wetzlar
Kamera DFC450C	Leica, Wetzlar
Kryostat Leica CM1950 Leica	Leica, Wetzlar
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P1000	Gilson Inc., Middletown, Ohio, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P2	Gilson Inc., Middletown, Ohio, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P20	Gilson Inc., Middletown, Ohio, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P200	Gilson Inc., Middletown, Ohio, USA
Nikon Eclipse 80i	Nikon, Tokio, Japan
Optilia Digital Capillaroscopy System	Optilia Inspection Systems AB, Vällingby Sweden
Schüttler Titramax 101	Heidolph, Schwabach
Slice Stainer TST44C	Medite GmbH, Burgdorf
Zentrifuge Mega Star 1.6	VWR, Radnor, Pennsylvania USA
Zentrifuge MiniSpin®	Eppendorf, Hamburg

### 12.2 Software

EndNote X9.3.3	Clarivate, London, UK
Fiji-ImageJ (Version 1.51n)	National Institute of Health, USA
GraphPad Prism (Version 9)	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Leica Application Suite (Version 4.7.1)	Leica, Wetzlar
ZEN 2.6	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

### 12.3 Verbrauchsmaterialien

24-Well-Platte	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Alexa Fluor 488 (Goat anti-rabbit IgG)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Alexa Fluor 555 (Donkey anti-Goat IgG)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Alexa Fluor 568 (Goat anti-mouse IgG)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Alexa Fluor 568 (Goat anti-rat IgG)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Alkohol	
Cytoseal XYL	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Deckglässchen (24x50 mm)	Engelbrecht, Edermünde
Eosin G	Merck KGaA, Darmstadt
Falcon-Röhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Fluoroshield Mounting Medium with DAPI 20 mL	Abcam, Cambridge, UK
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Goat-Serum	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Monoclonal mouse IgG anti-CD31	DAKO, Santa Clara, Kalifornien, USA
Monoclonal rabbit IgG anti-GAP43	DAKO, Santa Clara, Kalifornien, USA
Monoclonal rat IgG anti-Endomucin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mouse IgG anti-CD34	DCS, Hamburg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ~H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Objektträger Superfrost	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm M Verschlussfolie	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Pikrinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pipettenspitzen (10 µl)	Nerbe Plus, Winsen-Luhe

Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Polyclonal Goat IgG anti-Langerin/CD207	R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA
Polyclonal rabbit IgG anti-PGP 9.5	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Resorcin-Fuchsin-Lösung	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Saccharose-Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SafeSeal Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Vasco ® Nitril white	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## 12.4 Gebrauchsmaterialien

### 10x PBS-Stammlösung:

	<u>für 500ml</u>	<u>für 1L</u>
-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ~H <sub>2</sub> O	2,6g	5,2g
-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ~H <sub>2</sub> O	6,22g	12,44g
-NaCl	38g	76g

-In Aqua bidest. Lösen und pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,4 einstellen.

-1:10 mit Aqua bidest. verdünnen.

-Lagerung bei Raumtemperatur.

### Waschlösungen:

-100 ml 1x PBS auffüllen mit:

1 g Triton X-100 (für 1% Triton X-100/PBS-Lsg.)

0,1 g Triton X-100 (für 0,1% Triton X-100/PBS-Lsg.)

0,01 g Triton X-100 (für 0,01% Triton X-100/PBS-Lsg.)

0,5 g Triton X-100 und 5 ml NGS (für 0,1% Triton X-100/5% NGS/PBS-Lsg.)

1 g Glycin (für 1% Glycin/PBS-Lsg.)

1 g Glycin und 0,5 g Triton X-100 (für 1% Glycin/0,5% Triton X-100/PBS-Lsg.)

-Lagerung im Kühlschrank 4°C.

### Antikörper-Verdünnungslösung:

-1 g BSA (Kühlschrank)

-0,3 g Triton X-100

-0,1 g Tween 20

-mit 100 ml 1x PBS lösen und bei 4°C im Kühlschrank lagern

-Haltbarkeit ca.4 Wochen.

## 12.5 Protokolle

### 12.5.1 Färbungen

#### PGP9.5/CD31

6 Schnitte je Probe in einen Well einer 24-Well-Platte

##### Tag 1:

- 1 h mit 1% Triton X-100/PBS-Lsg. Waschen
- 10 min in 1% Glycin/PBS-Lsg. waschen
- 10 min mit 1% Glycin/0,5% Triton/PBS-Lsg. Waschen
- 1h mit 0,5% Triton/5% NGS/PBS-Lsg.
- Primärantikörper anti-PGP 9.5 und anti-CD31 in Antikörperverdünnungslösung auf jeweils 1:500 verdünnt
- Schnitte in Primärantikörperlösung für 2 Nächte bei 4°C auf dem Schüttler inkubieren

##### Tag 3:

- 3x 15 min mit 0,01% Triton X-100/PBS-Lsg. waschen
- 15 min in 1xPBS-Lsg. waschen
- Sekundärantikörper Alexa Fluor anti-Rabbit 488 und Alexa Fluor anti-Mouse 568 in Antikörperverdünnungslösung auf jeweils 1:1000 verdünnen (ab diesem Zeitpunkt unter minimalem Lichteinfluss arbeiten)
- Schnitte in Sekundärantikörperlösung für eine Nacht abgedunkelt auf dem Schüttler bei 4°C inkubieren

##### Tag 4:

- 3x 15 min mit 0,01% Triton X-100/PBS-Lsg. waschen
- 15 min in 1xPBS-Lsg. waschen
- Schnitte mittels einer Pasteurpipette auf jeweils einen Objektträger pro Probe legen
- Trockene Schnitte eindecken mit Fluoroshield Mounting Medium with DAPI

## **Langerin**

### **Tag 1:**

- 10µm dicke Kryoschnitte von fixierten Hautbiospien anfertigen und ca. 15 min trocknen lassen
- Schnitte in einer Küvette mit 1x PBS-Puffer für 5 min waschen auf dem Schüttler
- Abgießen und 2x mit 1xPBS + 0,1% Triton je 5 min auf dem Schüttler waschen
- Abgießen und etwas trocknen, die Proben auf dem Objektträger mit einem Pap-Pen umranden, kurz antrocknen lassen, die Schnitte in eine feuchte Kammer legen
- Erst-Antikörper 1:200 mit Antikörper-Verdünnungslösung verdünnen und auf die Proben pipettieren und über Nacht bei 4°C inkubieren im Kühlschrank

### **Tag 2:**

- 3x waschen mit 1xPBS (siehe oben)
- Schnitte kurz abtrocknen, eventuell den Pap-Pen erneuern, Objektträger wieder in die feuchte Kammer legen, Raum abdunkeln
- Sekundärantikörper mit Antikörper-Verdünnungslösung 1:200 verdünnen und kurz abzentrifugieren, auf die Proben pipettieren
- 2-4h bei Raumtemperatur in der geschlossenen Kammer inkubieren
- Im Dunklen 3x mit 1xPBS je 5-10min auf dem Schüttler waschen
- Schnitte etwas abtrocknen und mit Mounting Medium mit DAPI eindecken, eventuell die Ränder mit durchsichtigem Nagellack versiegeln. Die Schnitte im Kühlschrank abgedeckt lagern.

## **HE- und EvG-Färbungen**

Die HE und EvG-Färbungen wurden mit dem Färbeautomaten Medite Slide Stainer TST44C durchgeführt.

### 12.5.2 Digitalisierung der Schnitte mit Zeiss AxioScan

- Schnitte mit alkoholischer Lösung oberflächlich abwischen
- Jeweils 4 Objektträger in einen Tray einspannen und in die Vorrichtung des Scanners legen
- Software ZEN 2.6 starten
- Speicherort wählen
- „Preview Scans“ der Schnitte erstellen und bei den Schnitten individuell den „Advanced Scan Profile Wizard“ öffnen
- Im Reiter „Tissue Detecting Settings“ die Schnitte im „Preview Scan“ manuell markieren
- Autofokus anhand des Referenzkanal „DAPI“ einstellen – ggf. manuell nachjustieren
- Kanäle zum Scannen wählen
  - o PGP 9.5 – 488 nm
  - o CD31 – 555 nm
  - o DAPI
- Z-Stack einstellen mit 6 Schnitten im Bereich von 25  $\mu\text{m}$  in 5- $\mu\text{m}$ -Schritten

### 12.5.3 Morphometrische Analyse

(exemplarisch für 250  $\mu\text{m}$ )

- Bild in ImageJ öffnen
- 1. Ermittlung der ROI
  - die Basalmembran manuell nachgefahren
  - Macro 1 starten:

```
getSelectionCoordinates(xpoints, ypoints)
```

```
for (i = 0; i < 800; i=i+10) {
```

```
    makeOval(xpoints[i]-2198,ypoints[i]-2198,4396,4396);
```

```
    roiManager("Add");
```

```
}
```

- Macro 2 starten:

```
roiManager("Combine");
```

```
setBackground(0, 0, 0);
```

```
run("Clear Outside");
```

```
roiManager("delete");
```

- an beiden Seiten jeweils den Teil abschneiden, der nicht ausreichend breit ist
- manuelles Nachfahren der nun entstandenen ROI
  - o Messen der Fläche mittels *ROI Manager*
  - o Bereich Ausschneiden
- *Color Threshold* öffnen und einstellen:
  - o *Hue 0-40, Saturation 0-255, Brightness 72-255*
- Macro 3 starten:

```
run("Analyze Particles...", "size=200-Infinity display include summarize add");
```

```
getResult("Area", 0);
```

## 13 Publikationsverzeichnis

### Präsentation auf wissenschaftlichen Symposien:

**Luk Bajors**, Franziska Höcketstaller, Michaela Köhm, Sascha Seidel, Ronald Wolf, Angela Roth, Ulrich Drott, Anne Schänzer. Untersuchung von epidermalen Nervenfasern, Langerhanszellen und Gefäßdichte bei Patienten mit systemischer Sklerose unter Prostatykin. *4. Science Day des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität*

**Luk Bajors**, Franziska Höcketstaller, Michaela Köhm, Sascha Seidel, Ronald Wolf, Angela Roth, Ulrich Drott, Anne Schänzer. Effects of vasoactive therapy in patients with Systemic Sclerosis on dermal small nerve fibers, Langerhans-cells and vessel density. *Soc Neuropathol Neuroanat, G. (2021). 65th Annual Meeting of the German Society of Neuropathology and Neuroanatomy (DGNN) - Meeting Abstracts, September 1–3, 2021. Free Neuropathology, 2, 22, 41*

## 14 Ehrenwörtliche 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

---

Unterschrift

## 15 Danksagung

Für die stete Hilfe, die konstruktive Kritik wie auch die vielen Denkanstöße möchte ich meinen Dank Prof. Dr. med. Schänzer aussprechen. Mein Dank gilt ebenfalls dem Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität sowie dem Leiter Prof. Dr. med. Till Acker, das mich sehr freundlich aufgenommen hat und mir ihr Labor zur Verfügung gestellt haben. Besonders möchte ich hier Hannah Schlierbach und Angela Roth danken für die Einweisung in die praktische Handhabung der Laborgeräte und die Abläufe des Instituts sowie auch die tatkräftige Unterstützung.

Auch möchte ich Dr. med. Ulrich Drott für die viele Hilfe und die Expertise in rheumatologischen Fragen danken.

Zuletzt möchte ich vor allem bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken. Für die stetige Unterstützung und Motivation parallel zum Studium sowie zum Berufsstart die Arbeit weiter voranzutreiben.