

Aus der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Immunhistologie der Alopecia areata
Analyse der inflammatorischen Zellen des Immunsystems in Hautläsionen von
Patienten mit Alopecia areata

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Helena Kempkes
aus Andernach

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Für
meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
1. Ziel und Fragestellung der Arbeit	10
2. Literaturdiskussion	11
2.1. <i>Informationen zu Haut und Haaren</i>	11
2.1.1. Haut.....	11
2.1.2. Haare	11
2.1.3. Aufbau und Anatomie des Haarfollikels.....	11
2.1.4. Haarwachstumszyklus.....	13
2.2. <i>Allgemeine Informationen zur Alopecia areata</i>	13
2.2.1. Vorkommen/Epidemiologie.....	13
2.2.2. Ätiologie	13
2.2.3. Klinisches Bild	14
2.2.4. Pathogenese.....	16
2.2.5. Histologie/ Histopathologie	17
2.2.6. Diagnose & Differentialdiagnose	18
2.2.7. Komorbidität.....	20
2.2.8. Prognose	20
2.2.9. Therapie	20
2.2.10 Tiermodelle.....	23
3. Material	24
3.1. <i>Probenentnahme</i>	24
3.2. <i>Paraffinierung und Schnitthanfertigung</i>	24
3.3. <i>Immunhistochemische Färbung</i>	25
3.4. <i>Analyse der Biopsien</i>	27
4. Methode	27
4.1. <i>Kollektiv und Probenentnahme</i>	27
4.2. <i>Immunhistochemisches Verfahren (Laboruntersuchung)</i>	27
4.2.1. Herstellung der Paraffinschnitte	28
4.2.2. Deparaffinierung.....	28
4.2.3. Antigendemaskierung.....	28
4.2.4. Färbemethode	29
4.3. <i>Analyse der Biopsien</i>	32

4.3.1. Bilderstellung.....	32
4.3.2. Bildanalyse.....	32
5. Ergebnisse	35
5.1 Übersicht.....	35
5.2 Histologische Schnitte.....	36
5.2.1 Patient 1 (Weiblich, 74 Jahre, AA fere totalis).....	36
5.2.2 Patient 2 (Weiblich, 70 Jahre, AA fere totalis).....	38
5.2.3 Patient 3 (Weiblich, 51 Jahre, AA)	40
5.2.4 Patient 4 (Weiblich, 53 Jahre, AA fere totalis).....	42
5.2.5 Patient 5 (Weiblich, 51 Jahre, AA fere totalis).....	44
5.2.6 Patient 6 (Weiblich, 55 Jahre, AA totalis)	46
5.2.7 Patient 7 (Weiblich, 56 Jahre, AA)	48
5.2.8 Patient 8 (Weiblich, 59 Jahre, AA totalis)	50
5.2.9 Patient 9 (Weiblich, 35 Jahre, AA)	52
5.2.10 Patient 10 (Weiblich, 33 Jahre, AA).....	54
5.2.11 Patient 11 (Weiblich, 58 Jahre, AA).....	56
5.2.12 Patient 12 (Weiblich, 66 Jahre, AA totalis).....	58
5.2.13 Patient 13 (Weiblich, 18 Jahre, AA).....	60
5.2.14 Patient 14 (Männlich, 74 Jahre, Kontrollgruppe).....	62
5.2.15 Patient 15 (Weiblich, 80 Jahre, Kontrollgruppe).....	63
5.2.16 Patient 16 (Männlich, 76 Jahre, Kontrollgruppe).....	64
5.2.17 Patient 17 (Weiblich, 82 Jahre, Kontrollgruppe).....	65
5.2.18 Patient 18 (Weiblich, 77 Jahre, Kontrollgruppe).....	66
5.2.19 Patient 19 (Männlich, 29 Jahre, Kontrollgruppe).....	67
5.3 Antikörperverteilung: absolute Antikörper-Anzahl.....	68
5.4 Gegenüberstellung der Auszählungen: Alopecia areata vs. Kontrollgruppe.....	71
6. Diskussion	72
6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	72
6.2 Diskussion der Methoden	72
6.3 Diskussion der Ergebnisse.....	74
7. Zusammenfassung.....	81
8. Literaturverzeichnis	82
9. Anhang.....	86
Danksagung.....	97
Lebenslauf.....	98

Abkürzungsverzeichnis

AA	Alopecia areata
AU	Alopecia areata universalis
AT	Alopecia areata totalis
AAP	Alopecia areata vom patchy-Typ
CD	Cluster of Differentiation
DAB	Diaminobenzidine
DCP	Diphenylcyclopropenon
DEBR	Dundee experimental bald rat
Dest.	destilliert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
HE Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF	Haarfollikel
HLA	Human Leucozyte Antigene
IP	Immunprivileg
LZ	Langerhanszellen
MHC	Major histocompatibility complex
PUVA	Psoralen plus UV-A (Photochemotherapie)
SADBE	Quadratsäure-dibutylester
SALT	Severity of Alopecia Tool
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolettstrahlung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Terminalhaarfollikels (6).....	12
Abbildung 2: klassischer AA Patient aus dem Untersuchungskollektiv.....	15
Abbildung 3: Übersichtsaufnahmen mehrerer Haarfollikelanschnitte im Querschnitt und eines Haarfollikels im Vertikalschnitt (mit Lymphozyteninfiltrat aus CD4 und CD8-Zellen) (Patient 8).....	18
Abbildung 4: Polymerkonjugat-Methode (48).....	30
Abbildung 5: Fünf ausgewählte Areale (20-fache Vergrößerung).....	32
Abbildung 6: Beispiel einer Farbbearbeitung mit ImageJ - IHC Profiler.....	33
Abbildung 7: Beispiel einer Bildanalyse mit ImageJ.....	33
Abbildung 8: Auswertung mit ImageJ.....	34
Abbildung 9: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 1 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	36
Abbildung 10: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 1 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	37
Abbildung 11: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 2 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	38
Abbildung 12: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 2 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	39
Abbildung 13: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 3 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	40
Abbildung 14: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 3 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	41
Abbildung 15: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 4 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	42
Abbildung 16: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 4 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	43
Abbildung 17: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 5 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	44
Abbildung 18: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 5 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	45
Abbildung 19: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 6 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	46

Abbildung 20: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 6 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	47
Abbildung 21: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 7 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	48
Abbildung 22: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 7 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	49
Abbildung 23: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 8 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	50
Abbildung 24: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 8 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	51
Abbildung 25: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 9 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	52
Abbildung 26: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 9 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	53
Abbildung 27: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 10 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	54
Abbildung 28: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 10 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	55
Abbildung 29: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 11 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	56
Abbildung 30: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 11 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	57
Abbildung 31: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 12 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	58
Abbildung 32: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 12 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	59
Abbildung 33: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 13 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	60
Abbildung 34: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 13 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler	61
Abbildung 35: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 14 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler.....	62
Abbildung 36: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 15 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler.....	63

Abbildung 37: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 16 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler.....	64
Abbildung 38: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 17 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler.....	65
Abbildung 39: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 18 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler.....	66
Abbildung 40: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 19 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler.....	67
Abbildung 41: Häufigkeit der Antikörper bei n=13. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Vertikalschnitt.....	68
Abbildung 42: Heat-Map der Antikörperauszählung. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	68
Abbildung 43: Häufigkeit der Antikörper bei n=13. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Horizontalschnitt	69
Abbildung 44: Heat-Map der Antikörperauszählung. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler.....	69
Abbildung 45: Häufigkeit der Antikörper bei n=6. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit gesunder Haut (Kontrollgruppe)	70
Abbildung 46: Antikörperauszählung. Gegenübergestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA und der Kontrollgruppe mit gesunder Haut; Fehlerindikator: Standardfehler.....	71
Abbildung 47: T-Test (Signifikanz der Unterschiede bei Patienten mit Alopecia areata und gesunden Patienten).....	71

1. Ziel und Fragestellung der Arbeit

Die Erkrankung „Alopecia areata“ ist der Menschheit bereits seit über 2000 Jahren bekannt, schon der römische Medizinschriftsteller Celsus beschrieb sie in seinem Werk „de medicina“ um 50-60 n. Chr. (1, 2). Alopecia areata betrifft beide Geschlechter, alle Altersgruppen und Ethnien. In den meisten Fällen verursacht sie nur einen temporären Haarverlust, in ausgeprägteren Formen wie der Alopecia areata totalis und der Alopecia areata universalis kann sie bei den Betroffenen jedoch auch zu schwerwiegenden psychosozialen Problemen führen und durch ihren unvorhersehbaren Verlauf die Lebensqualität der Erkrankten beeinträchtigen.

Obwohl sie die zweithäufigste Haarerkrankung nach der androgenetischen Alopezie darstellt, ist die genaue Pathogenese und ein geeigneter Ansatzpunkt für eine Therapie und Heilung immer noch unbekannt.

In dieser Arbeit wurden entnommene Hautproben von Patienten mit Alopecia areata mittels immunhistochemischen Methoden angefärbt und die dabei gewonnenen Ergebnisse ausgewertet. Das Ziel dieser Untersuchung ist es festzustellen, welche Rolle die analysierten proinflammatorischen Zellen im Pathomechanismus der AA spielen und diesen besser zu verstehen. Dies könnte die Möglichkeit eröffnen neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Pharmaka für die Behandlung von Alopecia areata zu liefern.

Folgende Fragestellungen sollen erörtert werden:

1. Welche Entzündungszellen kommen in den Biopsien der Patienten mit AA am häufigsten vor und in welchem Verhältnis stehen die verschiedenen Entzündungszellen zueinander?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Entzündungsmarker und der klinischen Ausprägung der Erkrankung?
3. Welche Rückschlüsse können aus dem Vergleich der Biopsien der Patienten mit AA und den Biopsien der gesunden Patienten geschlossen werden?

2. Literaturdiskussion

2.1. Informationen zu Haut und Haaren

2.1.1. Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und aus drei Schichten aufgebaut: Der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subcutis (Unterhaut). Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel bestehend aus Keratinozyten (90%), Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkelzellen und Lymphozyten. Die darunter liegende Dermis besteht hauptsächlich aus gefäßreichem Bindegewebe und dient der Versorgung der Epidermis. In der Dermis befinden sich Talg- und Schweißdrüsen, die Haarfollikel, Gefäße, Nerven und Muskelzellen.

Darunter liegt die Subcutis, das Unterhautfettgewebe. (3)

2.1.2. Haare

Haare gehören neben den Nägeln und Hautdrüsen zu den Hautanhangsgebilden.

Die unterschiedlichen Funktionen der Haare umfassen u.a. Thermoregulation, physikalischen Schutz (z.B. vor UV-Strahlen), Transport von Schweiß und Talg an die Hautoberfläche, sowie sensorische und taktile Aktivität (z.B. Träger von Geruchs- und Sexualstoffen). Aber auch ihre psychosoziale Bedeutung in unserer Gesellschaft ist nicht zu verachten. (4, 5)

Der Mensch besitzt im Schnitt ca. 100.000 Kopfhare, die im Wesentlichen aus Keratin bestehen. Das Haar wird im Haarfollikel gebildet und unterliegt verschiedenen Wachstums- und Ruhephasen. Der Haarfollikel ist ein komplexes Miniorgan der Haut, das gemeinsam mit der Talgdrüse, dem Musculus arrector pili und der Apokrinndrüse die sogenannte Haartaldrüseneinheit bildet. (5)

2.1.3. Aufbau und Anatomie des Haarfollikels

Der Haarfollikel wird anatomisch in vier Anteile unterteilt:

- 1) *Bulbus*: Der Haarbulbus enthält Matrixkeratinozyten und die dermale Papille
- 2) *Suprabulbärer Anteil (Infrainfundibulum)*: Abschnitt zwischen Bulbus und Ansatzstelle des Musculus arrector pili
- 3) *Isthmus*: Abschnitt zwischen Ansatzstelle des Musculus arrector pili (Wulstregion) und der Talgdrüseneinmündung

4) *Infundibulum*: Abschnitt zwischen Einmündung der Talgdrüse in den Haarkanal und Öffnung des Haarbalgtrichters zur Hautoberfläche

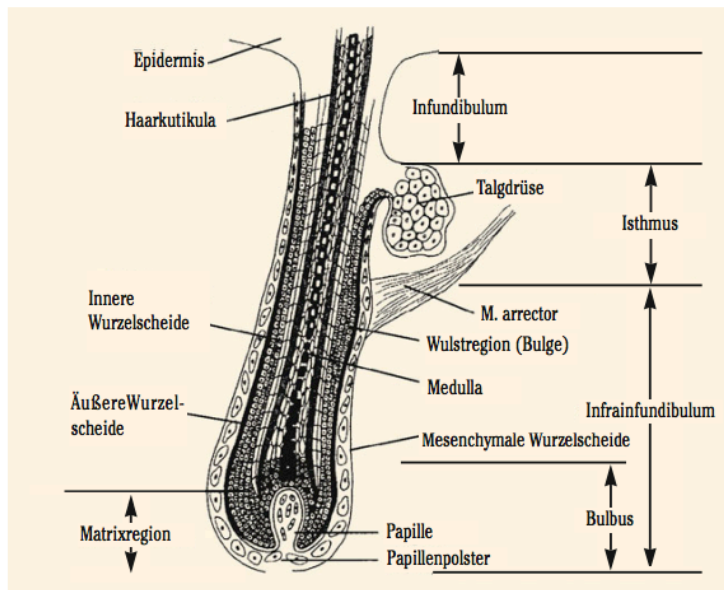


Abbildung 1: Aufbau eines Terminalhaarfollikels (6)

Das eigentliche Haar bzw. der Haarschaft entsteht im Haarfollikel durch Differenzierung aus den im Bulbus gelegenen Haarmatrixzellen. Der Kortex des Haarschaftes besteht aus Intermediärfilamenten und Proteinen. (6, 7)

In den Haarbulbus hinein wölbt sich die dermale Haarpapille aus mesenchymalen Bindegewebszellen. Sie bestimmt Größe und Wachstumsgeschwindigkeit des Haares. Umgeben wird der Haarfollikel von einer bindegewebigen Follikelhülle, dem Haarbalg. (5)

Der Haarschaft wiederum wird von der inneren und äußeren epithelialen Wurzelscheide umgeben: Die starre innere Wurzelscheide verankert das Haar im Follikel und gibt ihm seine Form indem die keratinreichen Zellen der Matrix innerhalb des Follikels nach oben bewegt und durch die innere Wurzelscheide in ihre finale Form verdichtet werden. Eingelagertes Melanin, das von zwischen den Matrixzellen verteilten Melanozyten stammt, gibt Pigment an das Haar ab. Die äußere Wurzelscheide geht in die Basalzellschicht der Epidermis über. In der Wulstregion grenzt die äußere Wurzelscheide an die Ansatzstelle des Musculus arrector pili, hier vermutet man den Sitz der epithelialen Stammzellen des Haarfollikels. Haarschaft, Haarwurzel, Wurzelscheiden und Haarbalg bilden zusammen den Haarfollikel. (5, 6)

2.1.4. Haarwachstumszyklus

In jedem Zyklus wird ein neues Haar gebildet, wobei jeder Haarfollikel dabei asynchron zu seinen Nachbarfollikeln drei Phasen durchläuft: In der Anagenphase wird das Wachstum eines neuen Haares eingeleitet. Hierbei bildet der Haarfollikel durch Teilung der Haarmatrixzellen und Keratinisierung ein neues Haar. Ca. 90% der Follikel befinden sich in der Anagenphase, die zwei bis fünf Jahre andauert. Während der darauf folgenden, wenige Wochen andauernden Katagenphase (Übergangsphase) stoppt das Haarwachstum und es kommt zur Verkürzung des Follikels. Nun tritt der Follikel in die Telogenphase (Ruhephase) ein, der Haarschaft reift zum abstoßungsfähigen Kolbenhaar heran. In dieser Phase von zwei bis drei Monaten bildet sich die Papille neu und die Anagenphase kann wieder eingeleitet werden. Die Bildung eines neuen Anagenhaares in der Tiefe treibt das Telogenhaar heraus. (3, 6, 8)

Innerliche und äußerliche Einflüsse wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder Medikamente können zu einem vorzeitigen Übergang vom Anagen ins Telogen und somit zu vermehrtem Haarausfall führen. (4)

2.2. Allgemeine Informationen zur Alopecia areata

Die Alopecia areata (AA) ist eine akut einsetzende, T-zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die zu kreisrundem Haarausfall unterschiedlicher Ausprägung führen kann. (1)

2.2.1. Vorkommen/Epidemiologie

AA betrifft 0,1- 0,2% der Weltbevölkerung (9) mit einer Lebenszeit-Inzidenz von 2,1% (10). Studien nach zu urteilen sind sowohl Männer als auch Frauen vermutlich gleich häufig betroffen. Sie kann in jedem Lebensalter auftreten, wobei sie ihren Häufigkeitsgipfel im zweiten und dritten Lebensjahrzent hat. (11)

2.2.2. Ätiologie

Die Ätiologie der AA ist immer noch unklar. Es wird vermutet, dass zu den Ursachen sowohl genetische, immunologische als auch psychische Faktoren zählen:

Genetische Faktoren

Es besteht eine genetische Prädisposition für AA mit einer positiven Familienanamnese in bis zu 27% der Fälle, wobei es sich vermutlich um einen komplexen polygenen Erbgang handelt. (2, 12, 13).

In genomweiten Assoziationsstudien wurden mehrere Genloci mit AA assoziiert, v.a. in der Region des Humanen Leukozytenantigens. (2, 14, 15).

Des Weiteren liefern die GWAS Hinweise darauf, dass sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem in die Pathogenese der AA involviert ist. Insbesondere ein Genlocus, der die Gene für den NKG2D-Rezeptor dekodiert wurde im Zusammenhang mit AA entdeckt und deutet auf eine Schlüsselrolle der CD8+NKG2D+T Zellen in der Pathogenese hin. (16)

Immunologische Faktoren

Der Haarfollikel, v.a. die Wulstregion, gehört bei gesunden Menschen zu den immunprivilegierten Orten, in denen Antigene keine Immunreaktion induzieren können. Es wird vermutet, dass AA ein Zusammenbrechen dieses Immunprivilegs der Haarfollikel herbeiführt, indem die Oberflächenmoleküle MHC-I und MHC-II Haarfollikelantigene präsentieren und somit Infiltrate aus entzündlichen Immunzellen (CD4⁺- und CD8⁺- Lymphozyten) die Apoptose der Matrixkeratinozyten auslösen. (2, 9, 12)

Psychische Faktoren

Mehrere Studien berichten, dass Patienten/Patientinnen ein emotionales Event oder eine Identitätskrise vor dem Ausbruch der Erkrankung angeben. Ob und wie die Beteiligung von Stresshormonen den Ausbruch der Erkrankung beeinflusst ist weiterhin fraglich. (17, 18)

2.2.3. Klinisches Bild

Typischerweise kommt es am behaarten Kopf zu einem oder mehreren kreisrunden Herden mit vollständigem Haarausfall ohne Zeichen einer Atrophie oder Vernarbung. Diese als patchy-type Alopecia areata (AAP) beschriebene Form kommt in 75% der Fälle vor. Die Erkrankung verläuft meist asymptomatisch, manche Patienten/Patientinnen beschreiben jedoch einen Juckreiz, sowie brennende oder schmerzende Kopfhaut bevor der Haarverlust beginnt. (19)

Vorwiegend sind die Okzipital- und Temporalregion betroffen, seltener die Bartgegend, Wimpern, Augenbrauen oder die übrigen behaarten Körperregionen. (3)
Im aktiven Randbereich der Kahlstellen lassen sich Haare büschelweise schmerzlos ausziehen (positiver Zupftest) und es finden sich dort abgebrochene Haare (point noirs) oder sogenannte Ausrufezeichenhaare. Diese 3-4 mm kurzen Ausrufezeichenhaare, deren Durchmesser sich zur Kopfhaut verengt und die in der akuten Entzündungsphase vorkommen, sind ein charakteristisches Merkmal der AA. (20)

Der Verlauf der Krankheit ist durch schubartiges Ausfallen und Wiederwachsen der Haare gekennzeichnet, sodass man nebeneinander frische Kahlstellen und alte Herde mit beginnendem Neuwachstum findet. Häufig konfluieren die Kahlstellen und nachwachsende Haare sind depigmentiert. (2)



Abbildung 2: klassischer AA Patient aus dem Untersuchungskollektiv

Es werden verschiedene klinische Subtypen der AA beobachtet: Die Erkrankung kann sich zum Beispiel zu einer Alopecia areata totalis (AT) mit komplettem Ausfall der Kopfbehaarung ausweiten. Aber auch ein Ausfall der gesamten Körperbehaarung ist möglich und wird als Alopecia areata universalis (AU)

bezeichnet. Eine weitere Sonderform der AA ist der Ophiasis-Typ (griechisch: Schlange) mit bandförmigen Herden in Bereichen der Kopfhhaarperipherie (Nacken-, Schläfen- oder Stirnbereich). Gegensätzlich zum Ophiasis-Typ verursacht der Sisaipho-Typ einen parietalen Haarverlust, ähnlich der androgenetischen Alopecie. Die Perinaevoide AA ist eine ungewöhnliche und seltene Form mit kahlen Herden um pigmentierte Naevi herum. Die Entfernung des Naevus führt jedoch nicht zum Nachwachsen der Haare. Die Alopecia areata diffusa wird als plötzlicher diffuser Haarverlust ohne typische Kahlstellen beschrieben. (21, 22)

Ein weiteres Phänomen ist, dass bei grau melierten Patienten die grauen Haare anfänglich vom Ausfall ausgespart bleiben und bei massiven Haarverlust der Anschein des „Ergrauens über Nacht“ (Marie Antoinette-Syndrom) entstehen kann. (2)

10-20% der Patienten mit AA weisen außerdem Nagelveränderungen wie raue Nägel (Trachyonychi), Grübchenbildung, Längsrillen und gerötete Lunulae auf. (9)

Der Schweregrad der AA kann mittels SALT Score (Severity of Alopecia Tool) gemessen werden: Dabei wird die Kopfhaut in vier Zonen eingeteilt und der Umfang des Haarverlustes visuell abgeschätzt. Der Salt Score dient so der Beurteilung des Behandlungsverlaufes. (23)

2.2.4. Pathogenese

Der genaue Mechanismus und die Ursache des Haarverlustes bei Alopecia areata ist immer noch unklar. Die Haupttheorien zur Pathogenese deuten darauf hin, dass es sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit handelt, ausgelöst durch die Störung des Haarfollikelimmunprivilegs. Wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wird außerdem eine genetische Prädisposition angenommen. Was den Zusammenbruch des Immunprivilegs genau herbeiführt wird diskutiert. Eine Theorie besagt, dass ein gestresster Haarfollikel die Antigenpräsentation triggert, andere Theorien deuten auf eine Dysregulation im zentralen Immunsystem hin. Diese wird herbeigeführt durch Antigenpräsentation mittels MHC-I- und MHC-II-Oberflächenproteinen und eine Interferon- γ Ausschüttung. (24) Der Haarfollikel ist bei gesunden Menschen ein immunprivilegiertes Organ und wird durch mangelnde MHC-Expression vor auto-inflammatorischen Vorgängen geschützt. (2)

Bei AA stört ein bisher noch unbekanntes Autoantigen den Haarzyklus, indem die Oberflächenmoleküle MHC-I, MHC-II im Haarfollikelepithel exprimiert werden und es zum Zusammenbruch des Immunprivilegs kommt: Autoantigene werden auf den Keratinozytenoberflächen präsentiert und führen zur perifollikulären Infiltration von Leukozyten. CD8⁺-T-Lymphozyten, CD4⁺-T-Zellen, dendritischen Zellen, natürliche Killerzellen, Langerhans-Zellen und Mastzellen umschwärmen den bulbären Anteil des Haarfollikels. Diese entzündlichen Immunzellen führen zu einem dystrophischen Haarzyklus mit vorzeitigem Eintritt der Haarfollikel in die Telogenphase. (9)

Die Lymphozytenattacke betrifft jedoch nicht die Stammzellen im Bereich der Wulst-Region, wodurch ein Wiederwachstum der Haare möglich bleibt. (25) Die Dichte an Infiltratzellen korreliert mit der Ausprägung der Erkrankung. (26)

Des Weiteren wurde beobachtet, dass pigmentierte Haare verstärkt ausfallen und nicht-pigmentierte Haare zuerst nachwachsen, was darauf hindeutet, dass melanin-assoziierte Antigene involviert sein könnten. Dafür spricht auch das Phänomen des „Ergrauens über Nacht“. (9)

Das konkrete Ereignis, dass die pathogenetische Kaskade der AA auslöst, ist noch unbekannt: Triggermechanismen wie psychische Stressfaktoren und Umwelteinflüsse (Impfungen, virale Infektionen, Medikamente) werden diskutiert. (15)

2.2.5. Histologie/ Histopathologie

Das histopathologische Bild der AA variiert je nach Stadium der Erkrankung.

Biopsien bei AA zeigen ein dichtes perifollikuläres Lymphozyteninfiltrat (aus CD8⁺ - und CD4⁺ T-Lymphozyten), das besonders die Follikel in der Anagenphase umgibt und charakteristisch für die Akutphase der AA ist. Durch das Infiltrat werden die Haarmatrixzellen geschädigt, was zur Unterbrechung der Anagenphase (Anagenarrest) führt: Der Haarschaft wird nicht regelrecht gebildet, bricht ab und zeigt sich klinisch als „Ausrufezeichenhaar“. Die Anzahl der Follikel verringert sich dabei nicht, sie verkleinern sich jedoch im weiteren Verlauf und gehen in die Katagen- und Telogenphase über, während sich das Entzündungsinfiltrat reduziert. (27)

Das chronische Stadium ist durch die „Miniatuurhaarfollikel“ im Telogenstadium gekennzeichnet. (2, 19)

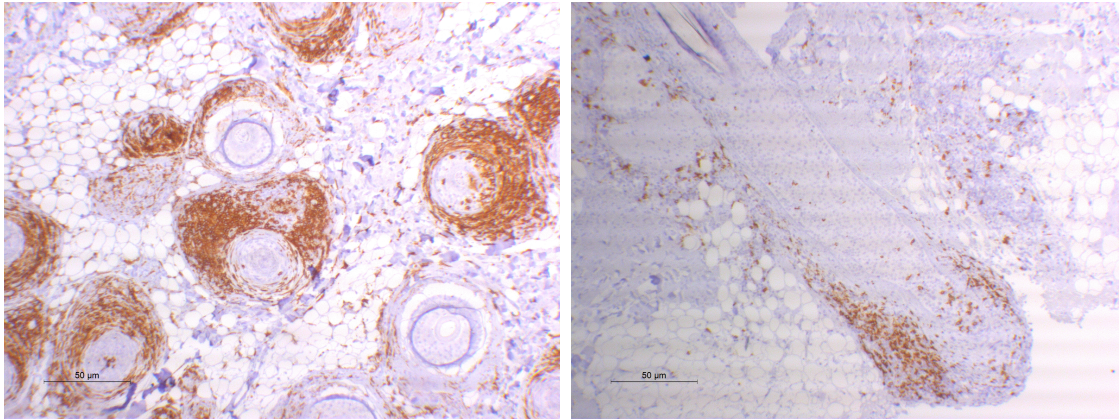


Abbildung 3: Übersichtsaufnahmen mehrerer Haarfollikelanschnitte im Querschnitt und eines Haarfollikels im Vertikalschnitt (mit Lymphozyteninfiltrat aus CD4 und CD8- Zellen) (Patient 8)

2.2.6. Diagnose & Differentialdiagnose

Die Diagnose der AA kann meist aufgrund des charakteristischen Erscheinungsbildes des Haarverlustes klinisch gestellt werden: Kreisrunde haarlose Areale, Ausrufezeichenhaare am Rande der Kahlstellen, positiver Zupftest mit Telogen- oder dystrophischen Anagenhaaren. Eine Dermatoskopie lässt sogenannte „yellow dots“ erkennen, d.h. leere erweiterte Follikelöffnungen mit weißlich-gelblicher Verfärbung. „Black dots“ oder Kadaverhaare zeigen sich ebenfalls bei starker Entzündungsaktivität.

Verschiedenste Haarerkrankungen können die AA imitieren. Im Zweifel kann eine Biopsie die Diagnose bestätigen. (22)

Folgende Differentialdiagnosen sind zu erwägen:

Trichotillomanie

Diese Erkrankung beschreibt das zwanghafte Ausreißen der Haare, meist im Kindesalter. Das klinische Bild zeigt unscharf begrenzte Kahlstellen im Bereich der Kopfhaare. Kurze Haarschäfte bleiben meist bestehen, da sie für den Patienten schwierig auszureißen sind. (1)

Tinea capitis

Eine infektiöse Pilzkrankung des Kopfes mit grau-schuppigen alopezischen Arealen, die fast ausschließlich bei Kindern auftritt. Rötung und Schuppung unterscheidet die Herde klinisch von der AA. Die Diagnose wird durch den Nachweis von Pilzkulturen bestätigt. (15)

Telogenes Effluvium

Ein Großteil der Haare findet sich in der Telogenphase des Haarzyklus. Ausgelöst durch besondere Lebensereignisse kommt es zu vermehrtem Haarausfall (z.B. Ende der Schwangerschaft, emotionaler Stress, schnelle Diäten). Das telogene Effluvium ist schwer vom diffusen Typ der AA zu unterscheiden. (15)

Alopecia syphilitica (Lues II)

Reversibler, kleinfleckiger Haarausfall, der als Symptom im zweiten Syphilisstadium auftritt. Die Haarfollikel im Anagenstadium werden durch syphilitische Infiltrate geschädigt. Nach Penicillintherapie heilen die Herde wieder ab. (3)

Vernarbende und atrophisierende Alopezien

Diese Erkrankungen führen zu einer irreversiblen Zerstörung der Haarfollikel, dazu zählen:

Folliculitis decalvans

Seltene follikuläre Entzündung der Kopfhaut mit entzündlichen Papeln, Pusteln und Krusten im Randbereich. An den Läsionsrändern finden sich oft Büschelhaare. Pathogenetisch werden Staphylokokken vermutet. Die Entzündung führt zu irreversibler Zerstörung der Haarfollikel. (4)

Lichen planopilaris

Durch T-Lymphozyten verursacht kommt es ebenfalls zu einer Zerstörung der Haarfollikel. Klinisch sichtbar wird eine kleinfleckige Alopezie mit randständigen follikulären Hyperkeratosen und um den Follikel angeordneten Erythemen. (4)

Chronisch kutaner Lupus erythematodes

Eine Form des kutanen Lupus erythematodes mit symptomatischen Flecken die sich zu schuppigen, roten Plaques entwickeln und allmählich im Zentrum Vernarbungen mit Teleangiektasien und Depigmentierungen bilden. Am Capillitium entstehen Alopezieherde. (15)

2.2.7. Komorbidität

AA-Patienten/-Patientinnen haben ein erhöhtes Risiko weitere Autoimmunerkrankungen zu entwickeln. So können folgende Krankheitsbilder bei Patienten mit AA vermehrt auftreten: Atopie, Schilddrüsenerkrankungen, Vitiligo, Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Morbus Crohn und Typ-I-Diabetes. Bei 25,5 % aller Patienten werden zudem Depressionen beobachtet, da die Krankheit oft eine enorme psychische Belastung darstellt. (28)

2.2.8. Prognose

Der Verlauf der AA ist unvorhersehbar. Ein Haarwiederwachstum ist möglich, jedoch zeigen mehrere Studien prognostisch ungünstige Faktoren, die das Nachwachsen der Haare beeinflussen. Dazu zählen ein ausgedehnter Haarverlust (AT, AU), AA vom Ophiasistyp, Nagelveränderungen, ein frühes Erkrankungsalter, eine positive Familienanamnese und das Vorhandensein weiterer Autoimmunerkrankungen. (20)

2.2.9. Therapie

Eine Behandlung der AA ist nicht zwingend notwendig, da es sich hauptsächlich um ein kosmetisches Problem handelt. Trotzdem leiden viele Patienten/Patientinnen v.a. Frauen und Kinder unter dem Haarverlust. Die Behandlung der AA ist immer noch schwierig, es existieren weder heilende noch präventive Therapeutika. Da es auch zu Spontanremissionen bei leichten Formen der AA kommen kann, ist die Bewertung der Therapieansätze erschwert. Das Rezidivrisiko ist hoch. Je nach Schweregrad der AA, Erkrankungsdauer und Alter des Patienten/der Patientin werden verschiedene Therapiemöglichkeiten beschrieben, von denen viele kaum in großen Studien untersucht wurden und deren Wirksamkeit nicht nachweislich bestätigt ist. Darum sollten die Patienten/Patientinnen vor individuellen Therapieversuchen über mögliche Risiken und Misserfolge aufgeklärt werden. (12, 29-31)

Folgende Therapien sind möglich:

Perücke/ Camouflage

Patienten/Patientinnen, deren Behandlung keine Erfolge zeigt oder die auf eine Therapie verzichten, bevorzugen oft kosmetische Produkte, um den anhaltenden Verlust der Kopfbehaarung, der Augenbrauen oder Wimpern zu kaschieren. Dazu

dienen Perücken, Kopftücher, Haarteile, Augenbrauentätowierung und falsche Wimpern.

Kortikosteroide

Sie haben entzündungs- und immunsuppressive Wirkung und kommen in verschiedenen Applikationsformen zum Gebrauch:

Topische Kortikosteroide

Topische Kortikosteroide werden sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen lokal zur Behandlung einzelner kleiner AA Areale verwendet. (32) Die Anwendung unter Folie erhöht die Wirksamkeit. Nebenwirkungen wie Hautatrophien, Teleangiektasien und Hypopigmentierung sind möglich. (33)

Intraläsional applizierte Kortikosteroide

Injektionen von Triamcinolon-Kristallsuspension gehören zur Therapie der ersten Wahl bei Patienten mit mildem Verlauf und führen zum Nachwachsen der Haare am Ort der Injektion. Sie sind somit nicht zur Behandlung einer ausgedehnten AA geeignet und können außerdem zu Atrophie führen. (32) In geringerer Dosierung werden sie auch beim Verlust der Augenbrauen genutzt. (31)

Systemische Kortikosteroide

Bei akuten Schüben der AA werden oral Prednisolon oder intravenös Methylprednisolon als hochdosierte Pulstherapie eingesetzt. (34, 35) Es kommt häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Schwäche, Gewichtszunahme, Vollmondgesicht, akneiformen Hautveränderungen und Hüftkopfnekrosen, selten zum nachhaltigen Wiederwachstum. Sie sind wegen einer hohen benötigten Dosis für die dauerhafte Anwendung nicht geeignet. (34)

Topische Immuntherapie

Die Behandlung der AA durch Induktion eines allergischen Kopfeckzems mit Kontaktallergen wird seit mehr als 40 Jahren durchgeführt. Dabei kommen heute Diphenylcyclopropanon (DCP) und Quadratsäure-Dibutylester (SADBE) zum Einsatz. Zunächst erfolgt eine einmalige Sensibilisierung mit 2%iger DCP-Lösung auf einem kleinen Kopfhautareal. Darauf folgt einmal wöchentlich die Behandlung mit geringer

konzentrierter DCP-Lösung (beginnend bei 0,001%), bis durch stetig steigende Konzentrationsänderung die individuelle zum Kontaktekzem führende DCP-Konzentration des Patienten ermittelt ist. Ein mäßiggradiges Kontaktekzem mit Rötung, Schuppung und Juckreiz der Kopfhaut gilt als ideal. Blasenbildung bei zu hoher DCP Konzentration ist eine unerwünschte Nebenwirkung und sollte den behandelnden Arzt zur Konzentrationsverringerng der DCP-Lösung veranlassen. Nach acht bis zwölf Wochen stabiler wöchentlicher Ekzemreaktion setzt bei erfolgreicher Therapie erstes Haarwachstum ein. Die Behandlungsintervalle werden vergrößert bis ein akzeptables Haarwachstum erreicht ist und die Therapie abgesetzt werden kann. Bei Rezidiverscheinungen wird sofort mit der vorher ermittelten individuellen DCP-Konzentration therapiert. Bei entstandener Toleranz des Patienten/ der Patientin gegen DCP wird auf SADBE ausgewichen. (2) Die Erfolgsrate der Therapie liegt bei 51%. (36) DCP ist nicht als Arzneimittel zugelassen, sondern wird als Chemikalie im individuellen Heilversuch eingesetzt. (37)

Dithranol (second-line Therapy)

Es wird u.a. in der Psoriasisbehandlung eingesetzt und verursacht eine lokale Reizung der Haut ohne gravierende Nebenwirkungen. (38) 1% Dithranol-Creme kann als Kurzkontakttherapie eingesetzt werden und wird aufgrund des geringen systemtoxischen Risikos bevorzugt bei Kindern angewandt. (39) Eine tägliche Anwendung ist nötig und eine Braunverfärbung von Wäsche und Haaren ist möglich. (31)

Minoxidil

Es dient als Haarwachstumsmittel und wird in 2%iger oder 5%iger Konzentration als lokale Zusatzmaßnahme angewendet. Kontaktdermatitis und Hypertrichiose sind mögliche Nebenwirkungen. (40)

Andere Therapien

Bimatoprost wird zum Wiederwachstum der Wimpern angewendet, die Studienlage zum Therapieerfolg ist jedoch widersprüchlich. (32)

Die Puva-Therapie bezeichnet die lokale oder systemische Gabe von Methoxsalen und nachfolgende UVA-Bestrahlung, die das perifollikuläre entzündliche Infiltrat reduzieren soll. (30) Da das Karzinomrisiko durch die Bestrahlung jedoch erhöht und

die Rezidivrate nach Therapie hoch ist, stellt die Behandlung keine zufriedenstellende Therapie dar. (41)

Eine UVB-Bestrahlung mit Excimer-Laser induziert T-Zell Apoptose, Langzeitstudien fehlen jedoch. (32)

Neue Therapieansätze

Januskinase-Inhibitoren (Ruxolitinib, Tofacitinib, Baricitinib) gehören zum neusten Therapieansatz für AA. Es handelt sich um Immunsuppressiva, deren Anwendung bei der Behandlung von Psoriasis-Patienten durch Zufall auch zum Wiederwachstum der Haare geführt hat. (42) Sie wirken an den T-Lymphozyten. Aufgrund der hohen Kosten und der ernstesten möglichen Nebenwirkungen (erhöhte Infektanfälligkeit, Gehirnblutungen, Lymphome) (37) der systemisch verabreichten Jak-Inhibitoren untersuchen neuste Studien die Wirksamkeit der Jak-Inhibitoren als 2%ige topische Lokalthherapie mit ersten Erfolgen. (43)

2.2.10 Tiermodelle

Alopecia areata tritt auch bei Tieren auf, zum Beispiel bei Hunden, Katzen, Mäusen, Ratten und Pferden. Untersuchungen zu neuen Therapieansätze bei AA sind aus ethischen Gründen am Menschen begrenzt. Darum mussten Tiermodelle entwickelt werden, die für die Laborhaltung geeignet und mit der humanen AA vergleichbar sind. Neben der C3H/HeJ-Maus und der Dundee experimental bald rat (DEBR) werden auch humanisierte SCID-Mäuse als Tiermodelle eingesetzt. Die T-Zell-vermittelte Autoimmunpathogenese konnte am Tiermodell bestätigt werden. (44) So führte u.a. die Depletion von CD8⁺-Zellen im Tiermodell zum Nachwachsen der Haare. (45)

3. Material

3.1. Probenentnahme

Geräte:

- Biopsy Punch, 5mm Durchmesser; Fa. Stiefel
- CombiSet Probe-Excisions-Set, Fa. Paul Hartmann AG
- Kleine Plastikbehälter zur Aufbewahrung der Hautprobe in Fixierlösung
- Fäden Resopren blau, 5/0 USP, DSM 16, 45cm
- Sterile Handschuhe Latex
- Schlinggazetupfer, Fa. Fuhrmann GmbH
- 5ml Spritzen
- Kanülen zum Injizieren

Chemikalien:

- Hautdesinfektionsmittel Octenisept
- Lokalanästhetikum MepiHexal sine 1% Infektionslösung
- ROTI-Histofix 4,5% säurefrei; pH=7, phosphatgepufferte Formaldehydlösung, Fa. Roth Karlsruhe

3.2. Paraffinierung und Schnittanfertigung

Geräte:

- Tissue-Tek III Vakuum-Infiltrationsprozessor Vogel Gießen
- Rotationsmikrotom MIKROTOM LEICA RM 2245
- Feather Microtome Blade A35
- Super-Frost® Plus Objektträger; Fa. Menzel, Braunschweig
- Brutschrank Horo Typ0383, Fa. Horo Dr. Hofmann GmbH

Chemikalien:

- ROTI-Histofix 4,5% säurefrei; pH=7, phosphatgepufferte Formaldehydlösung, Fa. Roth Karlsruhe
- Alkohol (1): 70 %; Alkopharm 70 Brüggemann Alcohol, Heilbronn
- Alkohol (2): 96 % Ethanol; Martin & Werner Mundo oHG, Mainz Kostheim
- Alkohol (3): 100% Isopropylalkohol; Hedinger, Stuttgart
- Xylol; AppliChem, Darmstadt
- Destilliertes Wasser

3.3. Immunhistochemische Färbung

Geräte:

- Leica ST5010 Autostainer XL
- Dampfgarer Typ 3216 (Fa. Braun)
- Eindeckmaschine Sigma Aldrich mounting medium CV5030
- Pipetten
- Spritzen
- Eppendorfgefäße
- Färbeküvetten

Chemikalien:

- Alkohol (1): 70 % Alkoharm 70 Brüggemann Alcohol, Heilbronn
- Alkohol (2): 96 % Ethanol vergällt Martin & Werner Mundo oHG, Mainz Kostheim
- Alkohol (3): 100% Isopropylalkohol Hedinger, Stuttgart
- Xylol AppliChem, Darmstadt
- Citrat-Puffer (pH= 6) zur Dampfgarerbehandlung von Paraffinschnitten (1:100 Verdünnung), Fa. Medac PMB 1-250
- Tris-Pufferstammlösung: EnVision Flex Dako
- Tris-Puffer- (Spülung): EnVision Flex Dako-Spülpuffer, 1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest.
- EDTA-Puffer: Envision Flex Target Retrieval Solution High PH für Dampfgarerbehandlung von Paraffinschnitten (1:50 Verdünnung), Fa. Dako
- Antikörpervedünnungspuffer: Dako S2022 Innvative Diagnostik-System, Hamburg
- Detektionskit K5007: Dako Real TM EnVision TM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse
 - Flasche A: Dako Real TM DAB+ Chromogen
 - Flasche B: Dako Real TM Substrate Buffer
 - Flasche C: Dako Real TM EnVision TM/HRP, Rabbit/Mouse Sekundärer (gebrauchsfertiger) Antikörper
- Gegenfärbung: Saures Hämalaun nach Meyer

Antikörper:

- Anti-Human CD1a
Monoclonal mouse antibody
Verdünnung 1:100
Vorbehandlung: EDTA-Puffer in Dampfgerat
Firma: Dako Deutschland, M3571
- Anti-Human CD3
Monoclonal mouse antibody
Verdünnung 1:100
Vorbehandlung: EDTA-Puffer in Dampfgerat
Firma: Novocastra, NCL-L-CD3-565
- Anti-Human CD4
Monoclonal rabbit antibody
Verdünnung 1:50
Vorbehandlung: EDTA-Puffer im Dampfgerat
Firma: Cellmarque, 104R-24
- Anti-Human CD8
Monoclonal mouse antibody
Verdünnung: 1:100
Vorbehandlung: EDTA-Puffer in Dampfgerat
Firma: Dako Deutschland, M7103
- Anti-Human CD68
Monoclonal mouse antibody
Verdünnung: 1:50
Vorbehandlung: Citrat-Puffer in Dampfgerat
Firma: Dako Deutschland, M0876
- Anti-Human CXCR3
Monoclonal mouse antibody
Verdünnung: 1:100
Vorbehandlung: Citrat-Puffer in Dampfgerat
Firma: BD Pharmingen, 557183
- HLA-DR
Monoclonal mouse antibody
Verdünnung 1:50

Vorbehandlung: Keine

Firma: BioGenex, Mu 154-UC

3.4. Analyse der Biopsien

Geräte und Programme:

- Lichtmikroskop Typ Leica DMIL
- Leica Application Suite Software
- Softwareversion V4.3
- Kameratyp Leica DFC295
- Fotoapparat Typ Canon D650
- ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)

4. Methode

4.1. Kollektiv und Probenentnahme

Das Patientenkollektiv bestand aus 19 Patienten der Haut- und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz im Alter von 18 bis 82 Jahren, von denen 6 Patienten mit gesunder Haut als Kontrollgruppe dienten. Die Probanden wurden im Vorfeld über den Ablauf und mögliche Risiken der Gewebeentnahme aufgeklärt.

Nach der klinischen Untersuchung der Kopfhaut erfolgte eine Probeentnahme aus einem geeigneten von AA befallenen Kopfhautareal, wenn möglich aus der Occipitalregion. Dabei wurden pro Patienten unter Lokalanästhesie zwei Stanzbiopsien der Kopfhaut mit einer 5mm Stanze entnommen und die Wunde abschließend mit einer Naht verschlossen. Die sechs Biopsien der gesunden Patienten wurden im Rahmen anderer Behandlungen des Universitätsklinikums entnommen und zur Forschung bereitgestellt.

4.2. Immunhistochemisches Verfahren (Laboruntersuchung)

Zur weiteren Untersuchung wurden die Gewebeproben der Kopfhaut in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach der Herstellung von ca. 3µm dicken Paraffinschnitten und Vorbehandlungen der Schnitte mittels Deparaffinierung und Antigendemaskierung wurden die Proben nach der Polymer-Konjugat-Methode

immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Als Negativkontrolle dienen Präparate ohne Primär-Antikörper.

4.2.1. Herstellung der Paraffinschnitte

1. Fixierung der Biopsien in Formalin
2. Entwässerung der Proben durch alkoholische Reihen, Behandlung mit Xylol und Paraffinierung mittels Tissue-Tek® Vacuum Infiltrationsprozessor
3. Einbettung im Tissue-Tek® Tissue Embedding Console System
4. Kühlung der Blöcke
5. Anfertigung der Biopsien mittels Mikrotom Leica 2245 (Schnittbreite: 2-3 Mikrometer)
6. Aufbringen der Schnitte auf Objektträger (Super Frost Plus) und Strecken der Schnitte im Wasserbad GFL 1052
7. Auflegen der Objektträger auf eine Wärmeplatte zur Vermeidung von Schrumpfarmartefakten
8. Trocknen der Schnitte (Brutschrank; 60 Minuten, 60 Grad Celsius)

4.2.2. Deparaffinierung

Um die Gewebeproben mit den Antikörpern färben zu können muss zunächst das Paraffin aus den Schnitten herausgelöst werden. Dazu werden die Schnitte jeweils fünf Minuten in eine alkoholische Reihe getaucht:

1. Xylol
2. Xylol
3. 100% Alkohol
4. 100% Alkohol
5. 96% Alkohol
6. 70% Alkohol
7. Aqua dest.

4.2.3. Antigendemaskierung

Bei der Fixierung des Gewebes in Formalin entstehen chemische Quervernetzungen, die die Struktur des Antigens (Epitop) verändern bzw. den Zugang zum Epitop blockieren können. Vor der eigentlichen Antigen-Antikörper-Reaktion

(Färbemethode) muss die Vernetzung des Antigens mit dem Formalin aufgebrochen werden (Demaskierung). Die in dieser Studie verwendete hitzeinduzierte Antigendemaskierung macht die Quervernetzungen wieder rückgängig, sodass die Immunreaktivität der Antigene wiederhergestellt wird:

1. Behandlung der Schnitte mit Citrat- oder EDTA- Pufferlösung im Dampfgerät (40 Minuten)
2. Abkühlen bei Raumtemperatur (30 Minuten)
3. Spülen mit Leitungswasser
4. Spülen mit Aqua dest.
5. Behandlung mit TRIS-Pufferlösung

Ausnahme: Vor der Färbung mit dem Anti-HLA DR Antikörper war keine Vorbehandlung mit EDTA-Pufferlösung und keine hitzeinduzierte Antigendemaskierung notwendig.

4.2.4. Färbemethode

4.2.4.1. Produktion der Antikörper

Für die Untersuchung wurden ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet. Monoklonale Antikörper sind sehr spezifische, strukturell identische Antikörper, die nur mit einer bestimmten antigenen Determinante eines Antigens (Epitop) interagieren. Sie werden mittels Hybridomtechnik aus einem einzigen B-Lymphozyten-Klon produziert. (46)

Gewinnung der Antikörper mittels Hybridom-Technik (47)

1. Auslösen einer antigen-spezifischen Immunantwort in Mäusen: Immunisierung von Mäusen mit dem Antigen, dadurch Aktivierung von spezifischen B-Lymphozyten der Maus und Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen. Speicherung der Antikörper in der Versuchstiermilz.
2. Gewinnung der B-Lymphozyten aus der entsprechenden Milz und Fusion mit Myelomzellen
3. Entstehung von Hybridomzellen, die hochspezifisch nur einen bestimmten Antikörper produzieren und unbegrenztes Wachstum zeigen
4. Screening und Selektion nach geeigneten Zelllinien
5. Gewinn und Modifikation der entsprechenden Antikörper

4.2.4.2. Polymerkonjugat-Methode (Envision™)

Die Polymerkonjugat-Methode dient als Nachweis von monoklonalen Primärantikörper im 2-Schritt-Verfahren durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen:

1.Schritt: Zunächst wird das Gewebe mit einem optimal verdünnten Primärantikörper (monoclonal mouse or rabbit antibody) inkubiert. Dabei bindet der Primärantikörper an Antigene im zu untersuchenden Gewebe (Antigen-Primärantikörper-Komplex).

2.Schritt: Es folgt die Inkubation mit einem peroxidasekonjugierten Polymer, das Sekundärantikörper enthält. Dieser Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. Durch Zugabe einer DAB-Chromogen-Lösung wird diese Reaktion sichtbar gemacht.

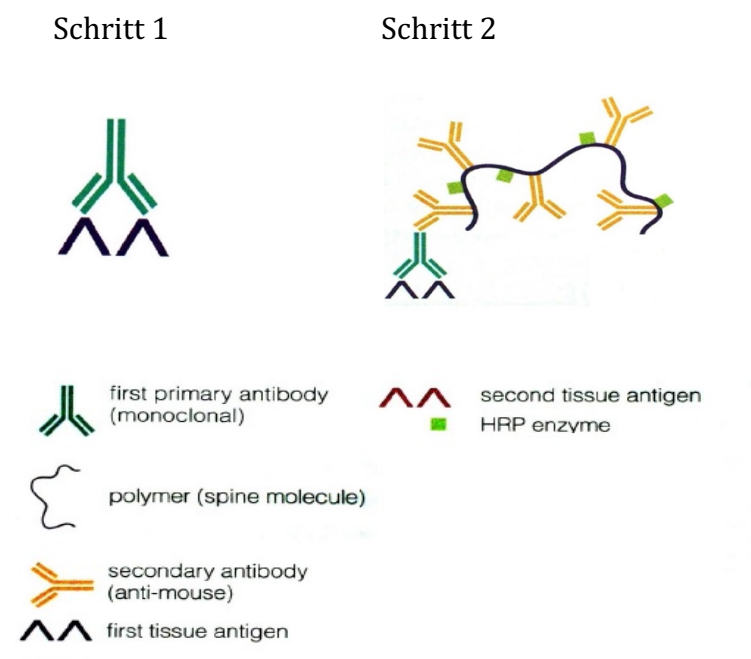


Abbildung 4: Polymerkonjugat-Methode (48)

4.2.4.3. Färbeprotokoll gemäß der Laborrichtlinien der Hautklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- Entparaffinierung
- Antigendemaskierung
- Tris-Puffer (für 3 Minuten)
- Ermittlung des Verhältnisses von Primärantikörper und Antikörperverdünnungspuffer
- Inkubation des Primärantikörpers mit einem Antikörperverdünnungspuffer der Firma DAKO (für 60 Minuten)
- Spülen mit Tris-Puffer (2x 4 Minuten)
- Inkubation mit Sekundärantikörper (für 30 Minuten):
Dako Real EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse Flasche A
- Spülen mit Tris-Puffer (2x 4 Minuten)
- Vorbereiten der DAB+Chromogenlösung (Substratsystem):
Dako Real™ Substrate Buffer 1ml (Flasche B) und
Dako Real™ DAB+Chromogen ein Tropfen (Flasche C)
- Färbung mit DAB-Chromogen-Lösung (7 Minuten)
- Spülen mit Leitungswasser (5 Minuten)
- Spülen mit Aqua dest. (30 Sekunden)
- Hämatoxylin-Gegenfärbung (30 Sekunden)
- Spülen mit Leitungswasser (5 Minuten)
- Spülen mit Aqua dest. (30 Sekunden)
- Schwenken in aufsteigender Alkoholreihe zur Entwässerung (je 10 Sekunden)
 - 1x 96%iger Alkohol
 - 2x 100%iger Alkohol
 - Xylol
- Eindecken mit Eukitt Sigma 03989

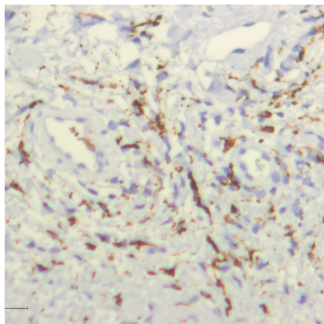
Zur Überprüfung des Färbeverfahrens wird bei jeder Färbereihe eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgefärbt. Die Positivkontrolle besteht aus Gewebematerial, das sicher von dem benutzten Primärantikörper angefärbt wird. Die Negativkontrolle durchläuft das Färbeverfahren ohne Primärantikörper.

4.3. Analyse der Biopsien

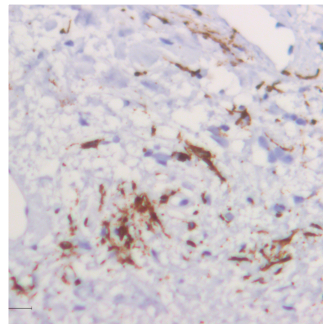
4.3.1. Bilderstellung

Zur Analyse der Biopsien wurden zunächst Bilder der Gewebeschnitte mit dem digitalen Farbkamerasystem Leica DFC 295 angefertigt. Die Bilder wurden mit 20-facher Vergrößerung und mit dem Fokus auf entzündungszellreichen Arealen gewählt, sodass pro Patient und Antikörperfärbung je fünf Bilder mit der größten Menge an Antikörpern aufgenommen wurden.

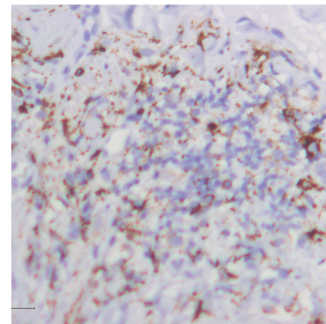
CD68 Gesichtsfeld 1



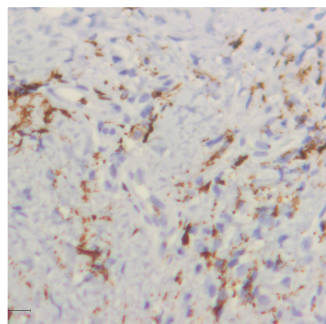
CD68 Gesichtsfeld 2



CD68 Gesichtsfeld 3



CD68 Gesichtsfeld 4



CD68 Gesichtsfeld 5

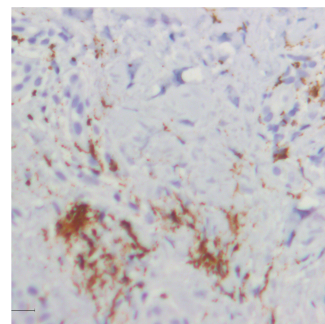


Abbildung 5: Fünf ausgewählte Areale (20-fache Vergrößerung)

4.3.2. Bildanalyse

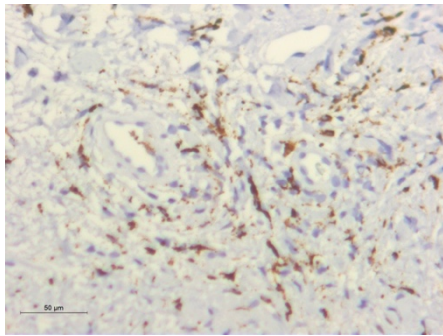
Die automatisierte Analyse der Bilder erfolgte in zwei Schritten mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ. Im ersten Schritt wurden die Bilder mit dem ImageJ Plugin- IHC Profiler bearbeitet, sodass die Antikörper durch die Farbmodifikation besser erkennbar wurden.

Bearbeitungsprotokoll mit dem *ImageJ Plugin IHC- Profiler*:

1. ImageJ starten

2. Öffnen des zu bearbeitenden Bildes („File“ → „Open“ → Datei vom Speicherort auswählen → „Open“)
3. Plugins auswählen -> IHC Profiler -> Nuclear Stained Image -> Vector „H DAB“

CD68 Gesichtsfeld 1



nach Bearbeitung mit IHC Profiler

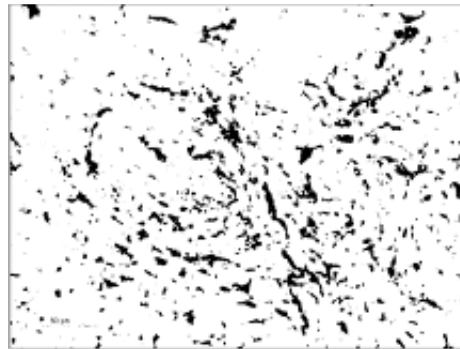


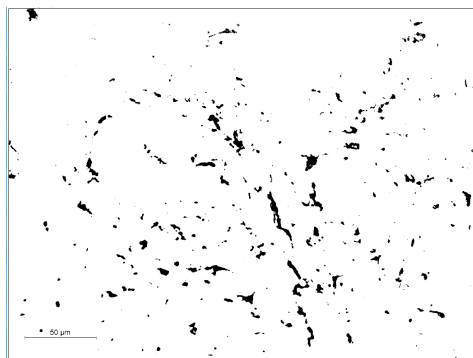
Abbildung 6: Beispiel einer Farbbearbeitung mit ImageJ - IHC Profiler

Im zweiten Schritt wurden die Zellen automatisiert ausgezählt. Hierzu wurden eigene Makrobefehle eingesetzt, um eine bessere Reproduzierbarkeit und genauere Ergebnisse der Analyse zu erzeugen.

Bearbeitungsprotokoll Bildanalyse ImageJ mit folgenden Makrobefehlen:

1. `setThreshold (0,100)`
2. `run("Analyze Particles...", "size=70-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines summarize")`

CD68 Gesichtsfeld 1 bearbeitetes Bild



CD68 Gesichtsfeld 1 analysiertes Bild

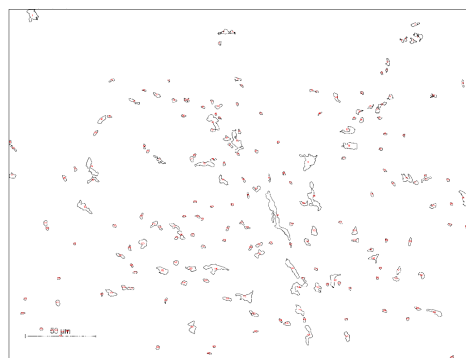
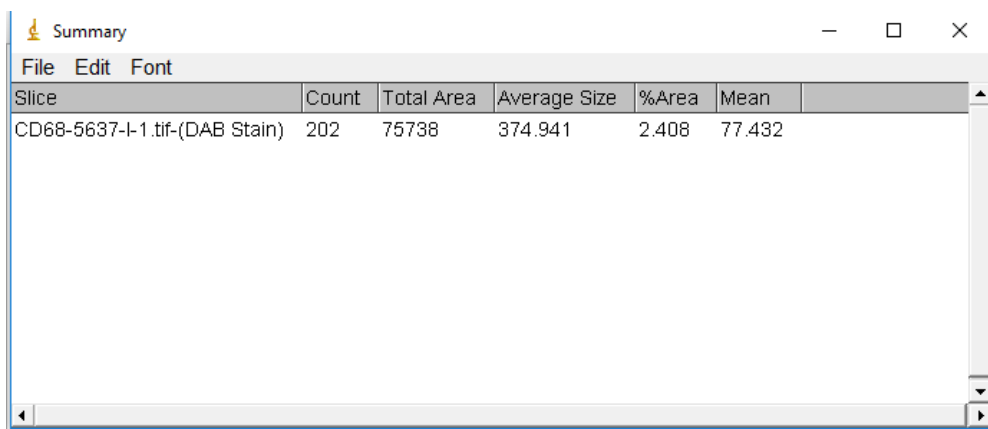


Abbildung 7: Beispiel einer Bildanalyse mit ImageJ

Zur Reduzierung von Fehlern bei der Bildanalyse wurde das analysierte Bild direkt mit dem Originalbild verglichen und bei Abweichungen manuell nachbearbeitet. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der automatisierten Bildanalyse durch manuelle stichprobenartige Auszählung der gefärbten Antikörper überprüft. ImageJ gibt eine Wertetabelle für die Variablen Count, Total Area, Average Size und %Area aus. %Area gibt den prozentualen Anteil der gefärbten Fläche in Relation zur Gesamtfläche an. Die Counts entsprechen der Anzahl der gezählten Partikel im Bild. Diese Arbeit beschränkt sich auf die Darstellung der Ergebnisse anhand der Counts.



The screenshot shows a window titled "Summary" with a menu bar containing "File", "Edit", and "Font". Below the menu bar is a table with the following data:

Slice	Count	Total Area	Average Size	%Area	Mean
CD68-5637-I-1.tif-(DAB Stain)	202	75738	374.941	2.408	77.432

Abbildung 8: Auswertung mit ImageJ

5. Ergebnisse

5.1 Übersicht

Die Analyse mit ImageJ ermöglicht eine Beurteilung der absoluten Zahl der im Präparat vorkommenden Antikörper. Die Messungen sind dabei immer gleich und nicht untersucherabhängig. Das Gesichtsfeld eines Präparates entspricht dabei dem vom Mikroskop erfassten Bildausschnitt und beträgt exakt 82364 Quadratmikrometer (0,082364 Quadratmillimeter).

In der graphischen Darstellung der quantitativen Auswertung findet sich für jeden Antikörper jeweils der Mittelwert aus den Werten der fünf Gesichtsfelder. Zusätzlich wurden für jede Färbung die Standardfehler des Mittelwertes über alle Antikörper je Gewebeschnitt ermittelt.

Antikörperlegende:

- CD1a: Dendritische Zellen
- CD3: T-Zellen, früher Typ
- CD4: T-Helfer-Zellen und Monozyten
- CD8: Zytotoxische T-Zellen
- CD68: Makrophagen, Monozyten
- CXCR3: Chemokinrezeptor auf Th1-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen
- HLA-DR: Allel der MHC-II-Moleküle auf Monozyten, Dendritischen Zellen, Makrophagen

5.2 Histologische Schnitte

5.2.1 Patient 1 (Weiblich, 74 Jahre, AA fere totalis)

Vertikalschnitt

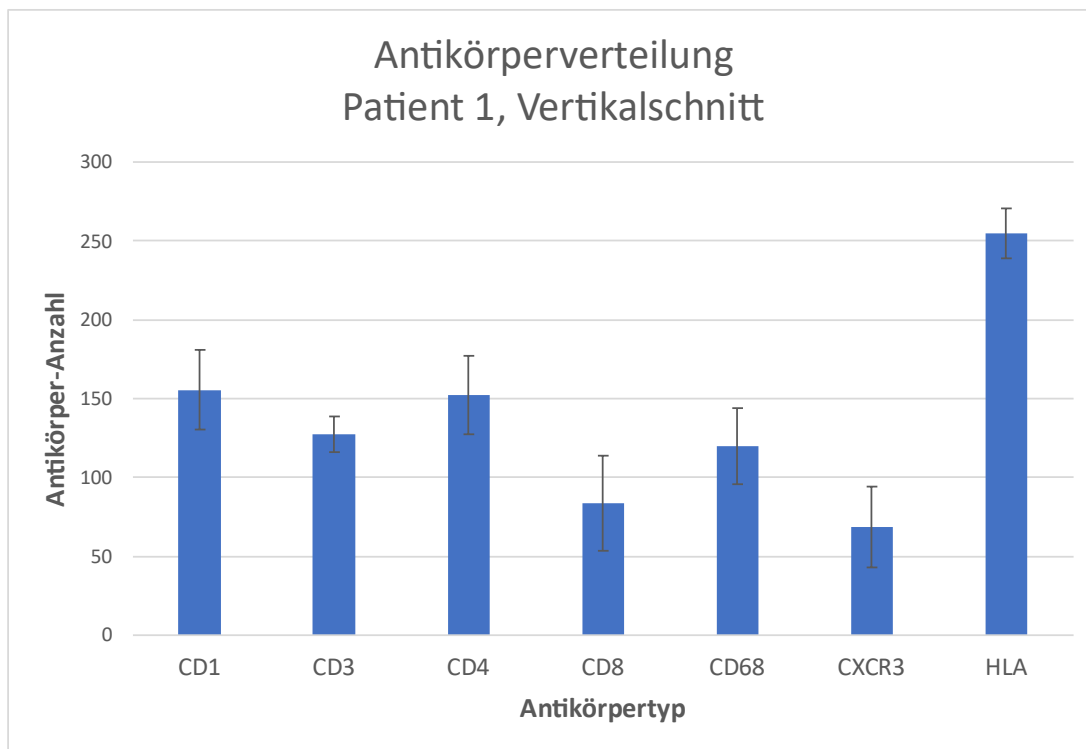
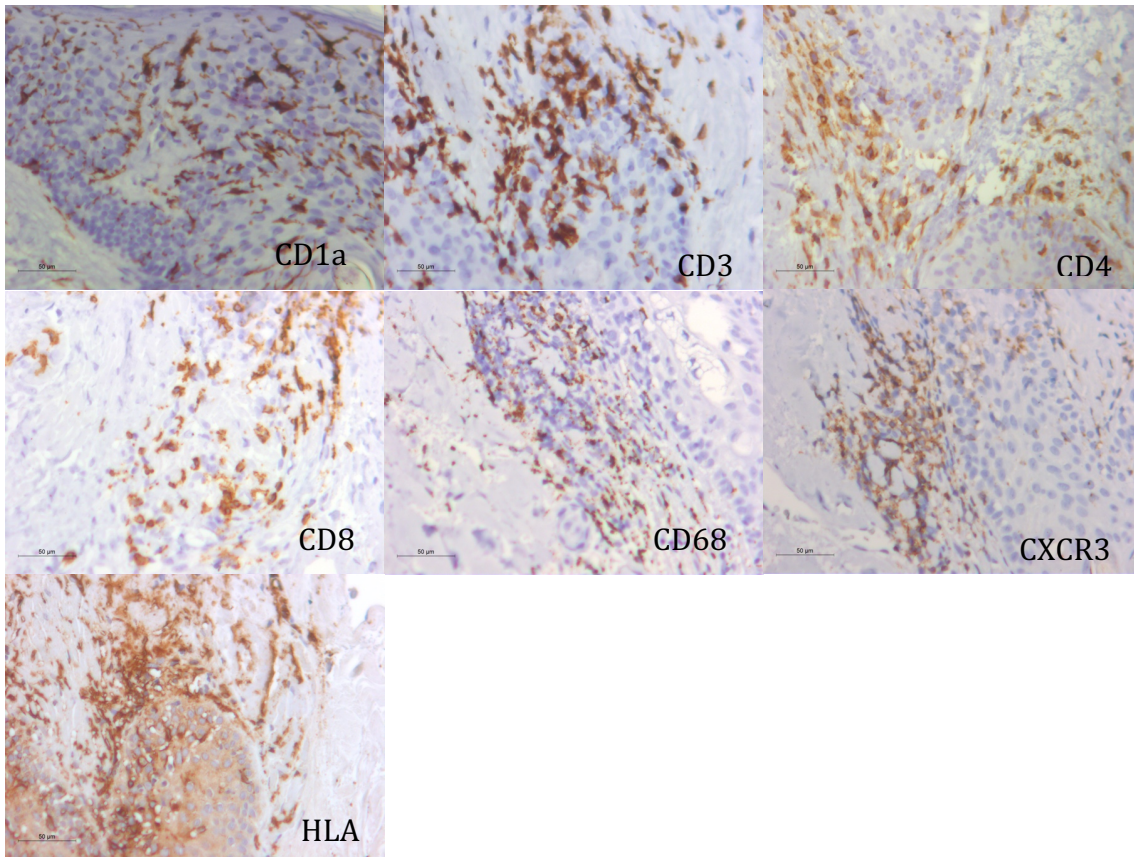


Abbildung 9: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 1 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

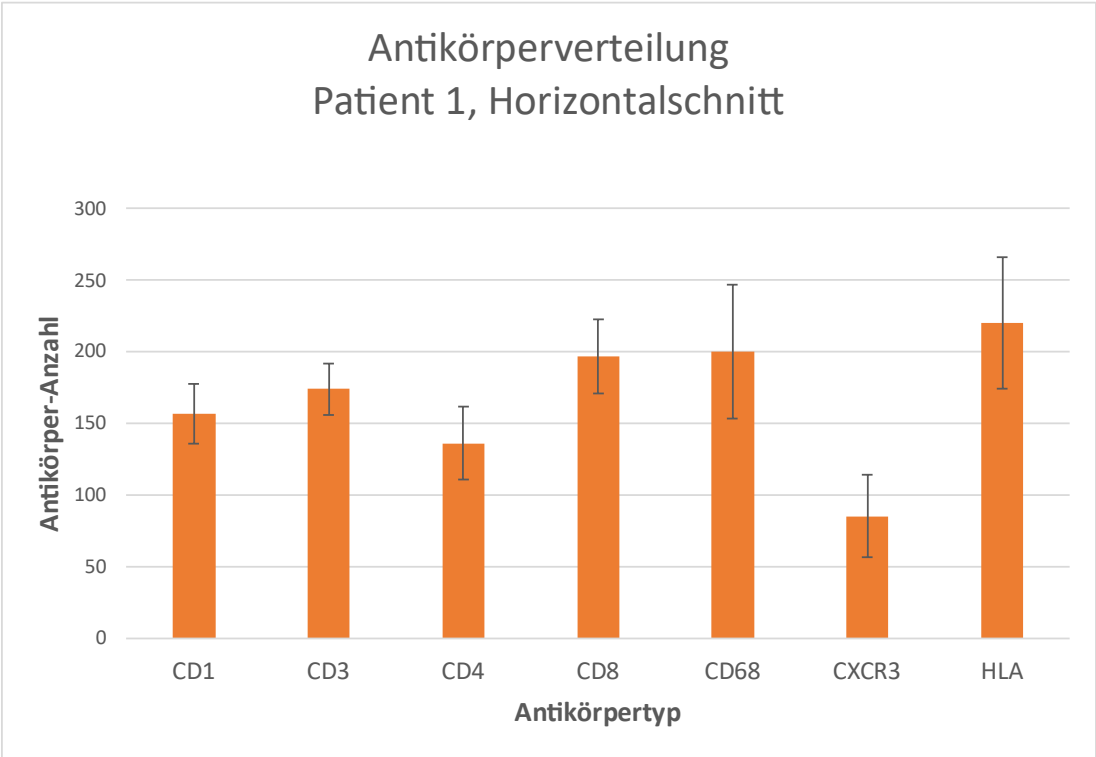
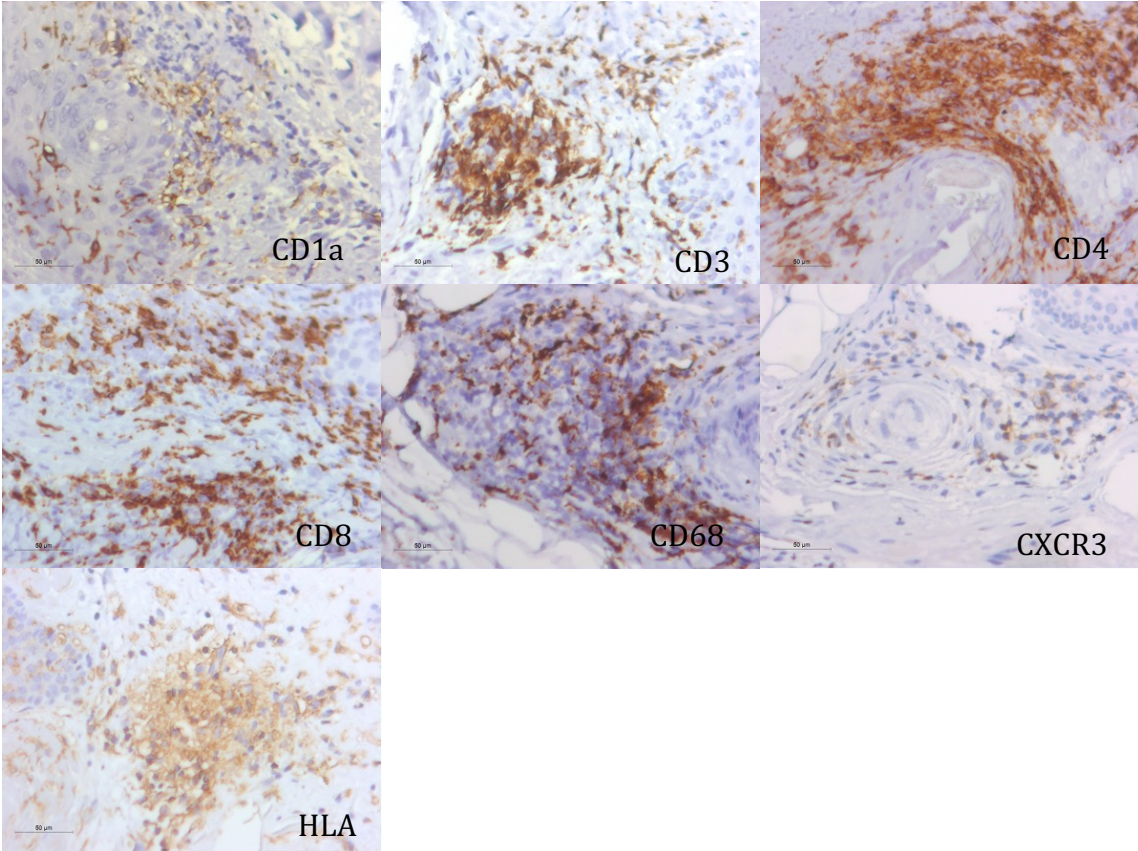


Abbildung 10: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 1 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.2 Patient 2 (Weiblich, 70 Jahre, AA fere totalis)

Vertikalschnitt

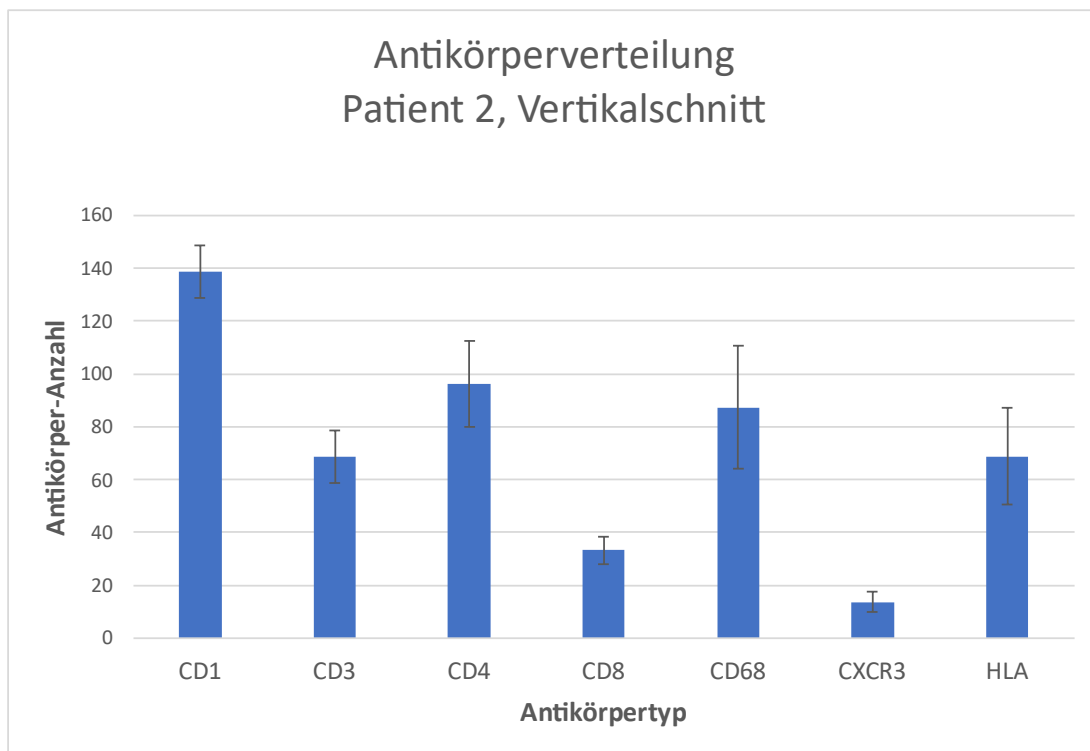
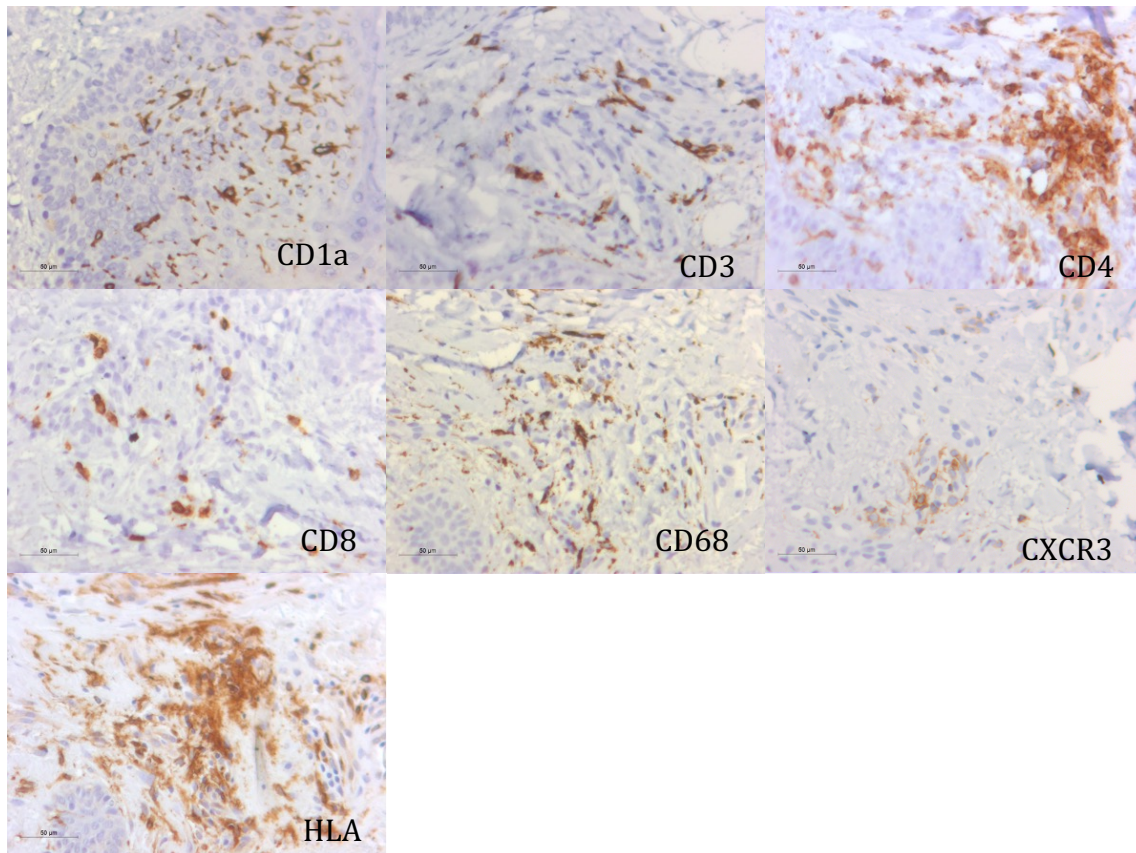


Abbildung 11: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 2 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

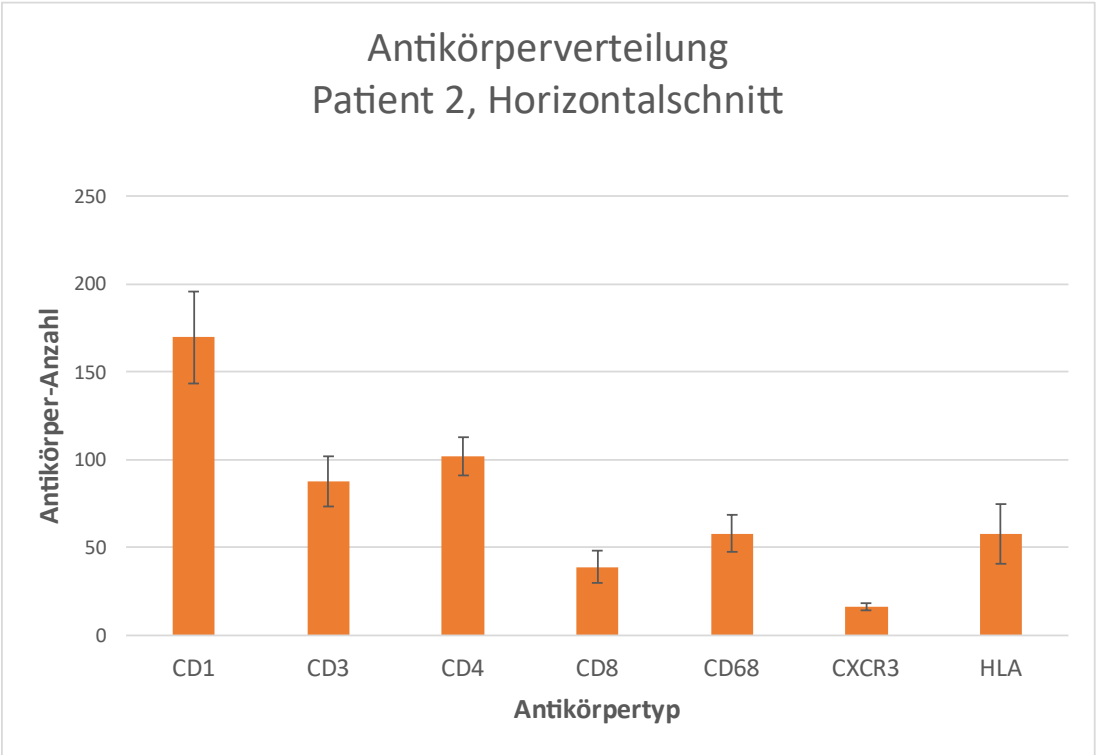
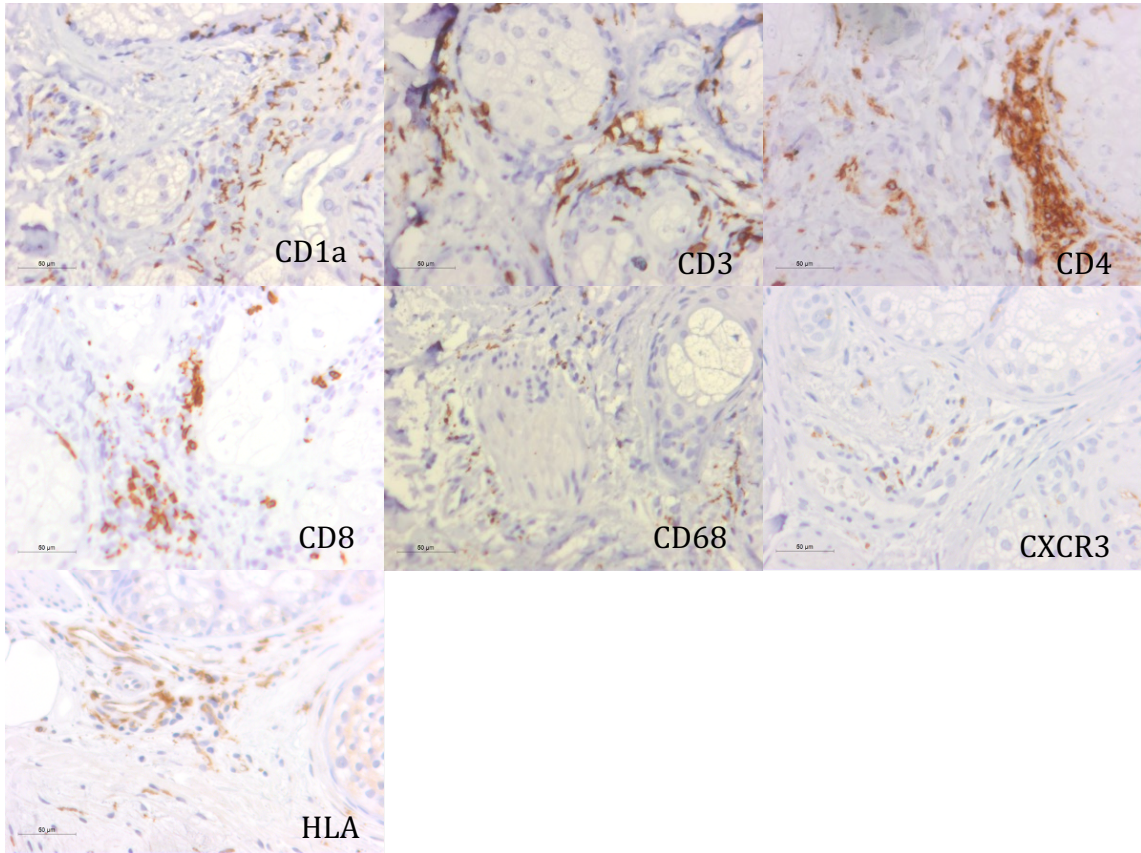


Abbildung 12: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 2 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.3 Patient 3 (Weiblich, 51 Jahre, AA)

Vertikalschnitt

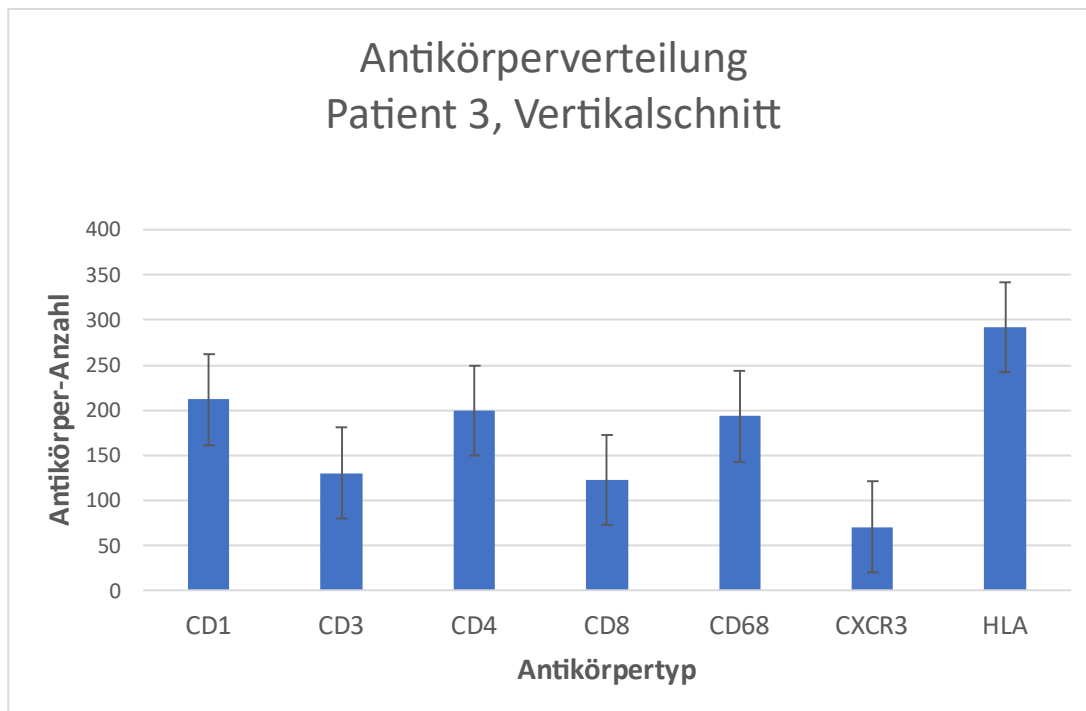
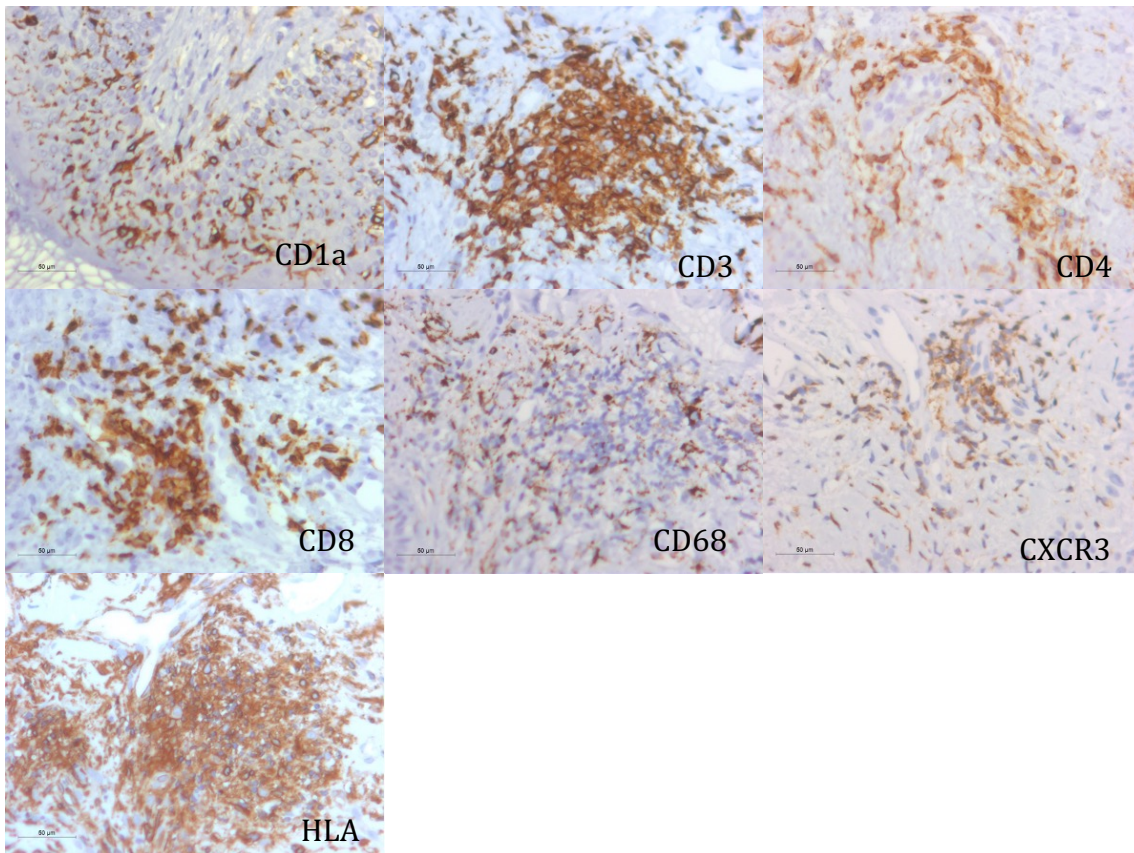


Abbildung 13: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 3 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

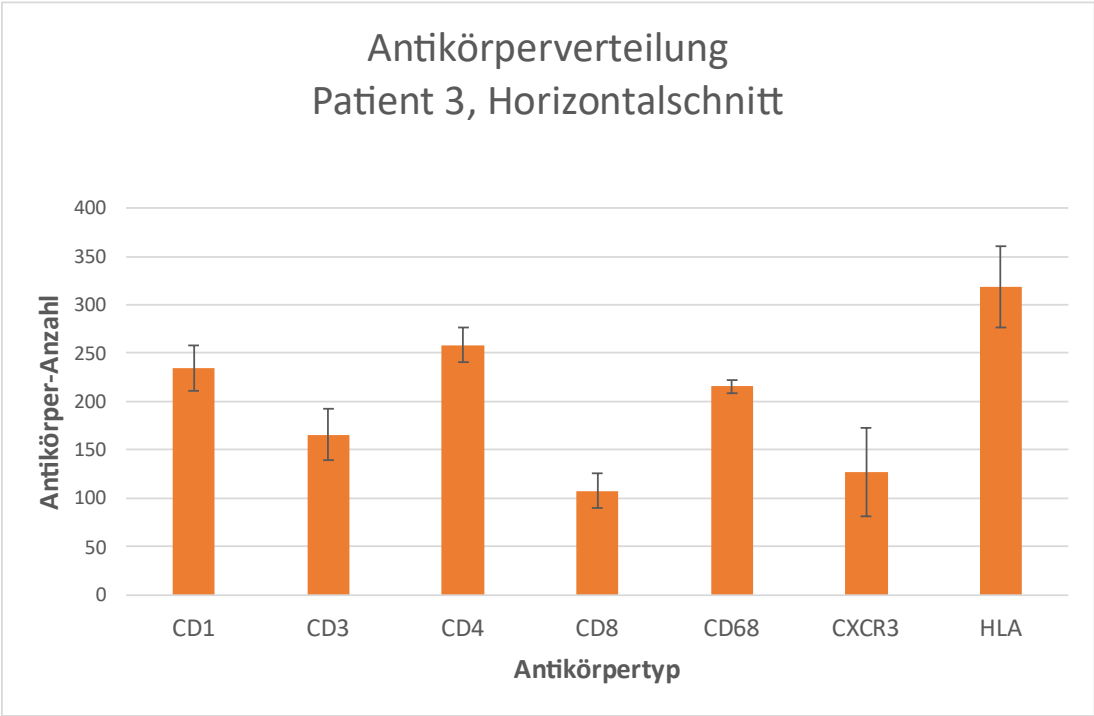
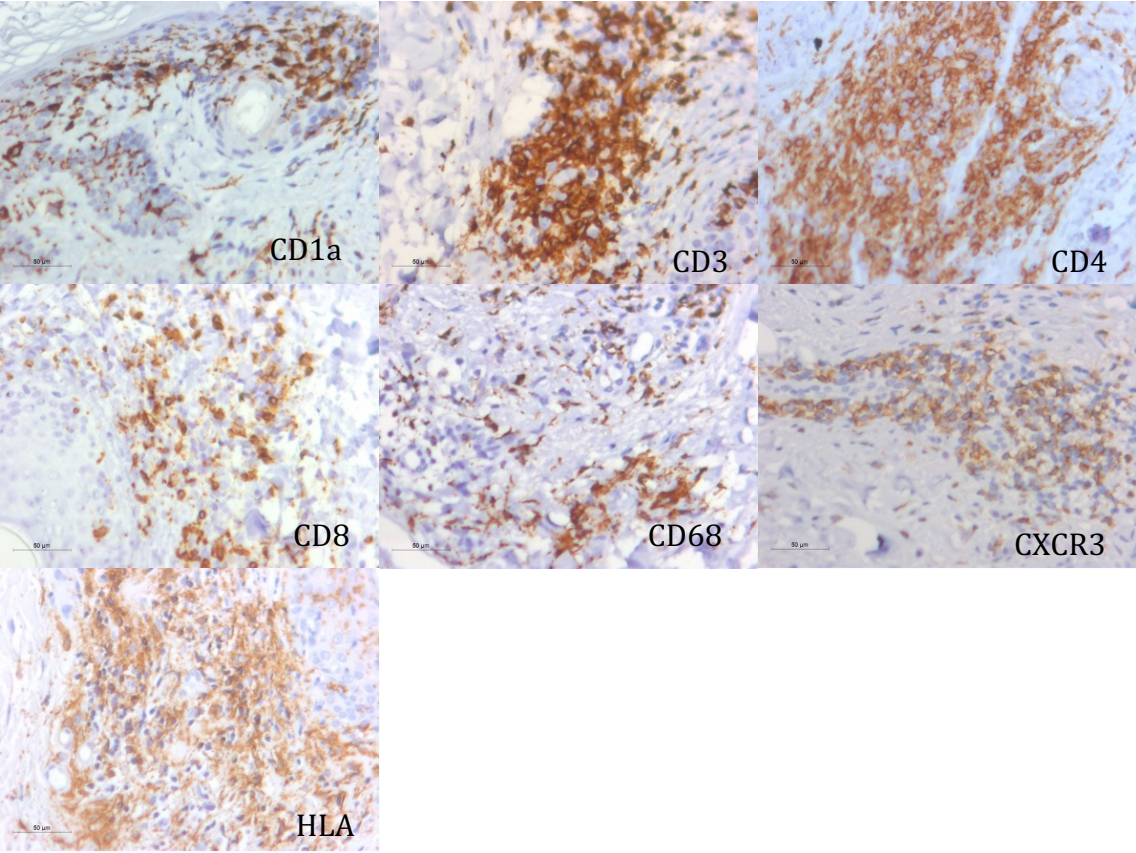


Abbildung 14: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 3 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.4 Patient 4 (Weiblich, 53 Jahre, AA fere totalis)

Vertikalschnitt

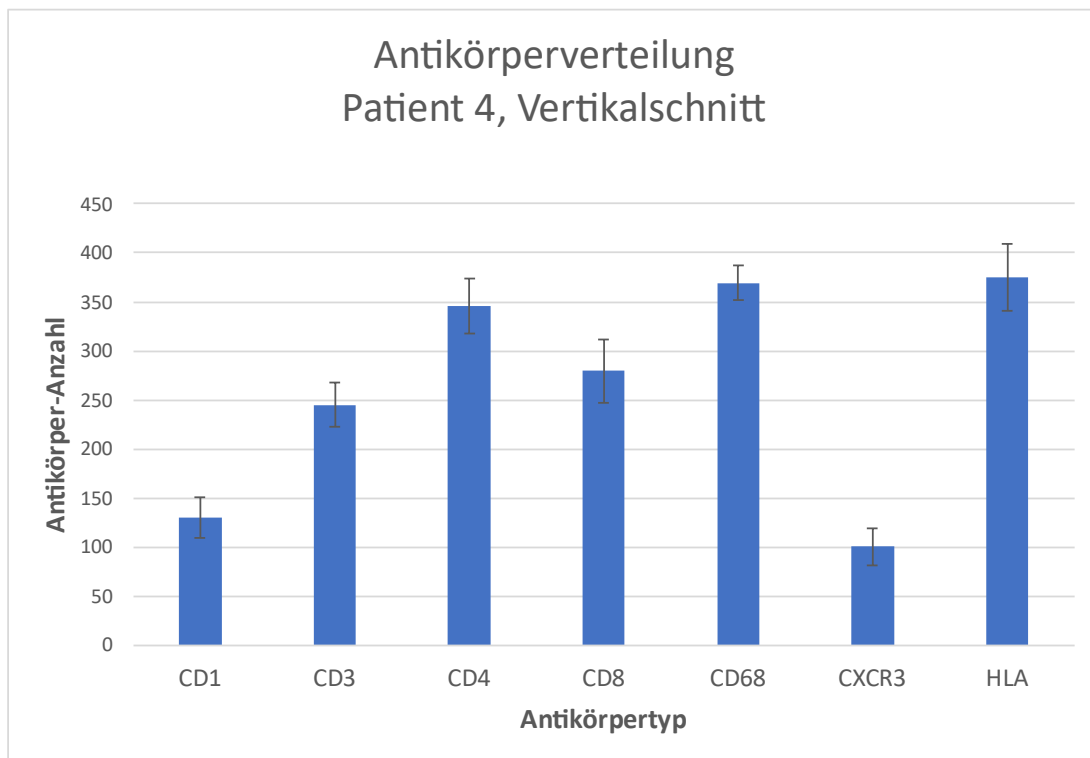
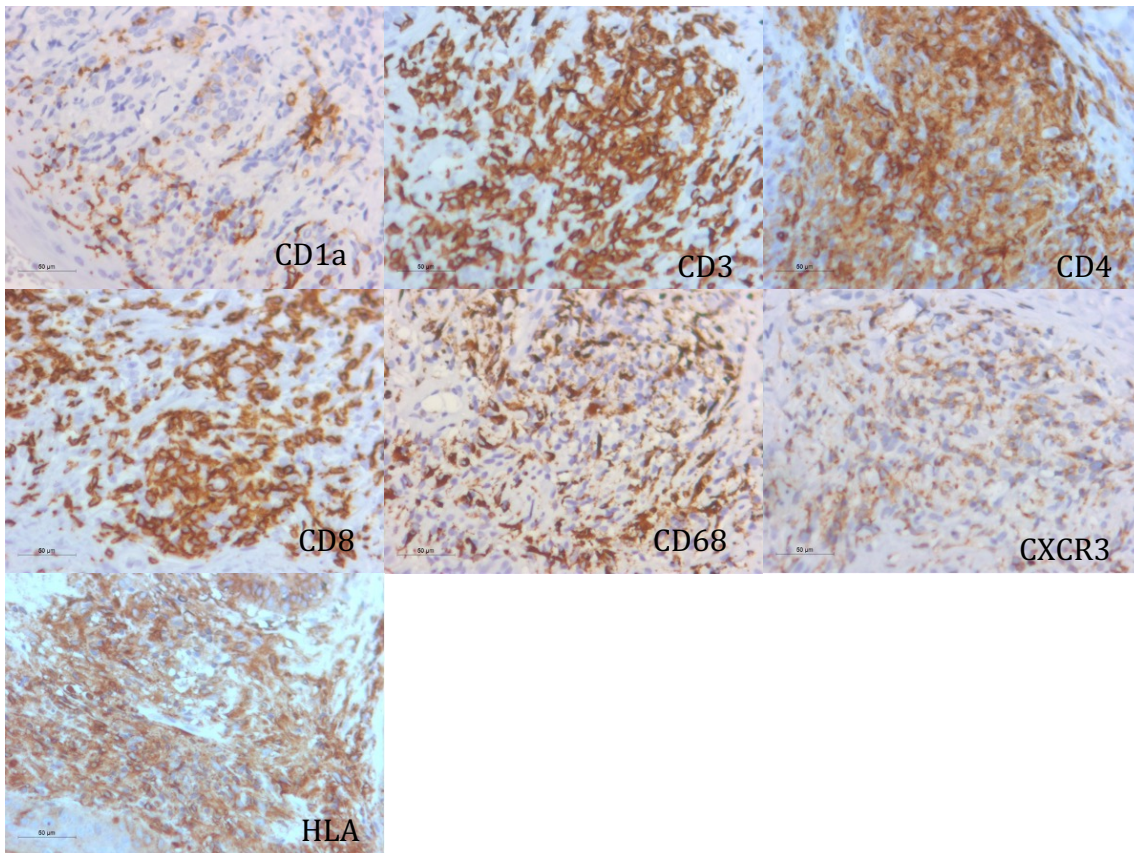


Abbildung 15: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 4 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

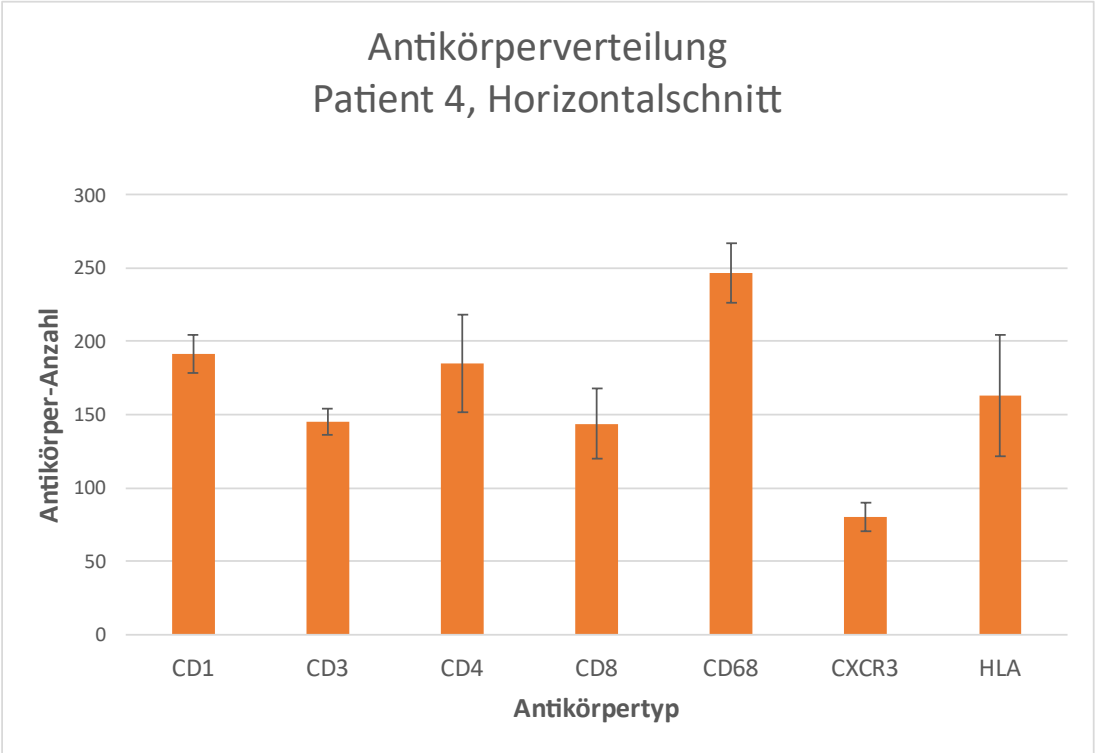
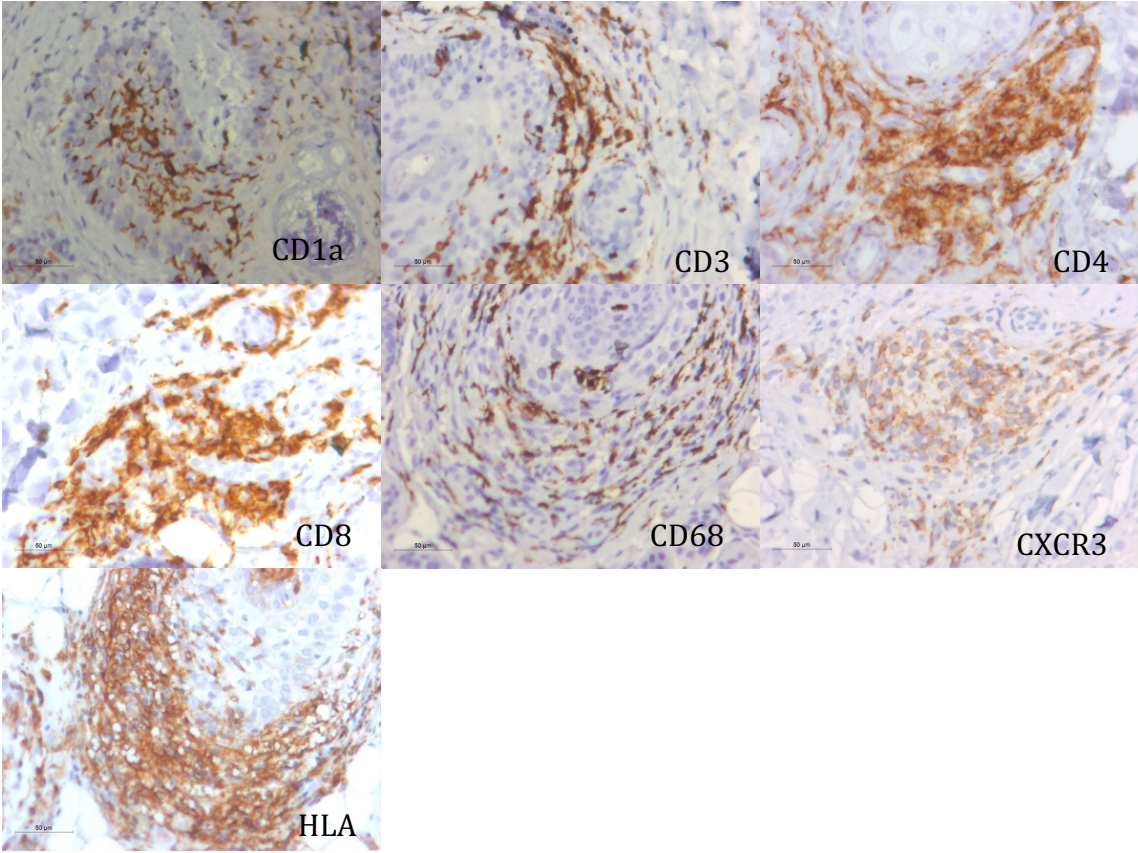


Abbildung 16: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 4 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.5 Patient 5 (Weiblich, 51 Jahre, AA fere totalis)

Vertikalschnitt

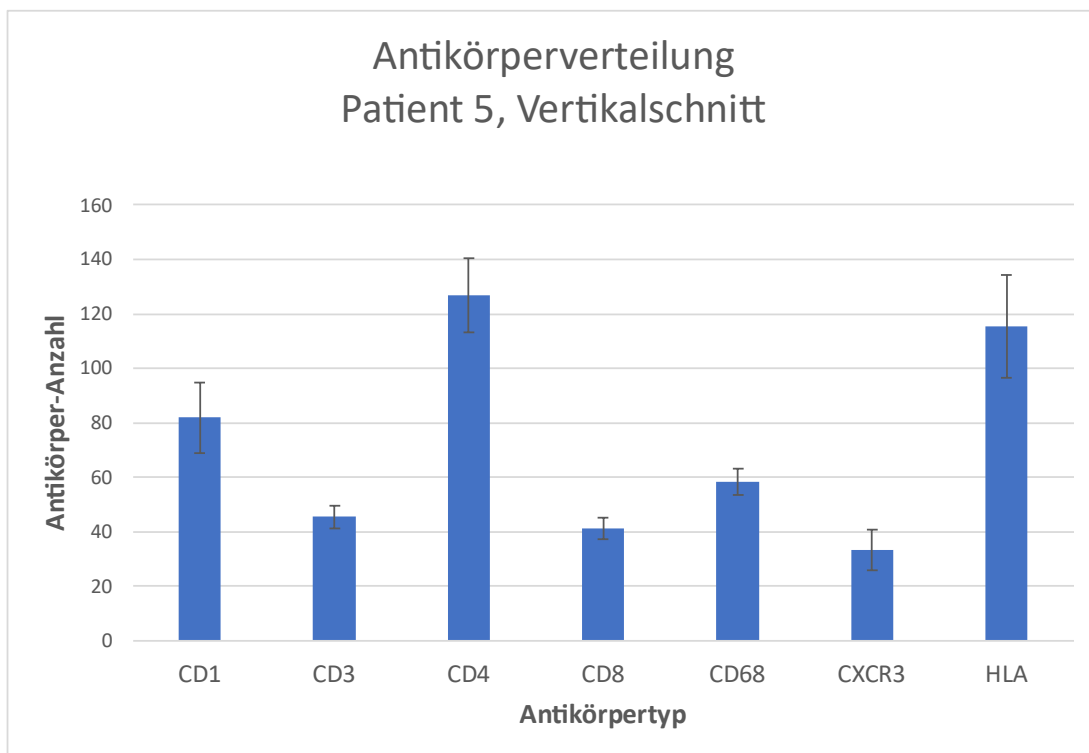
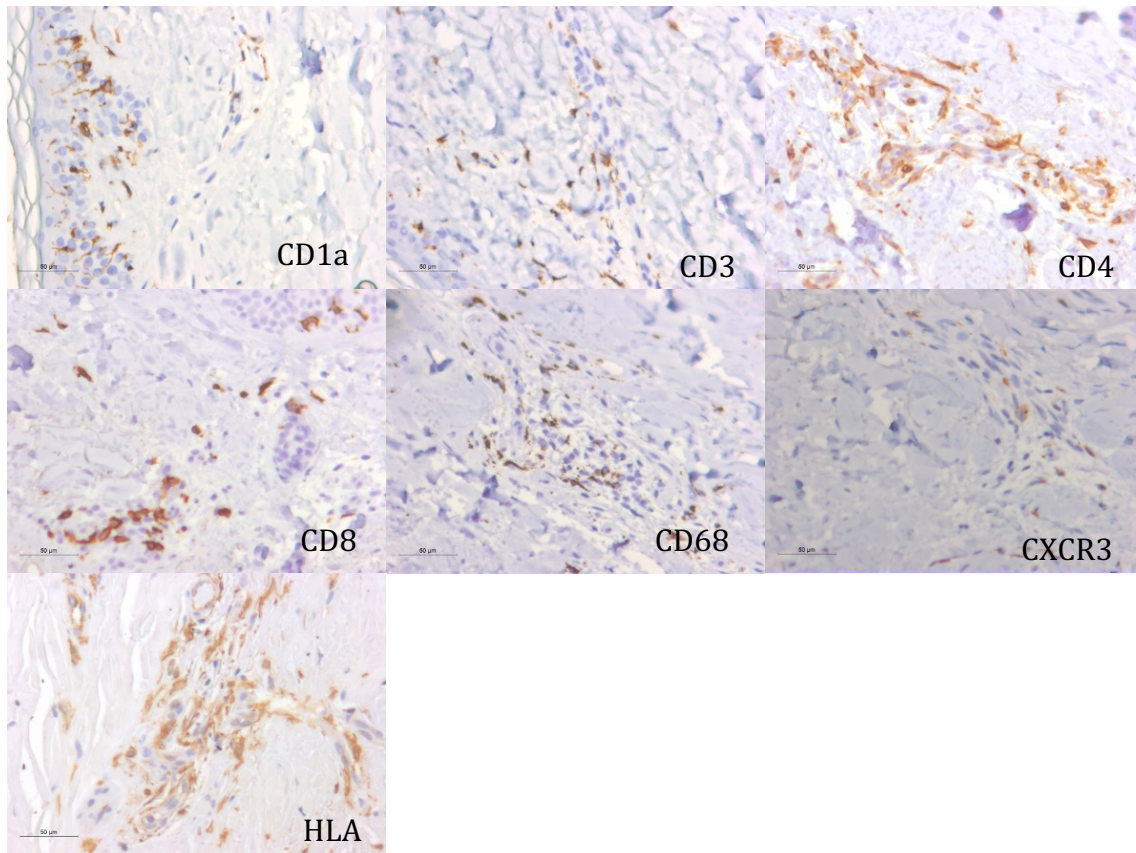


Abbildung 17: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 5 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

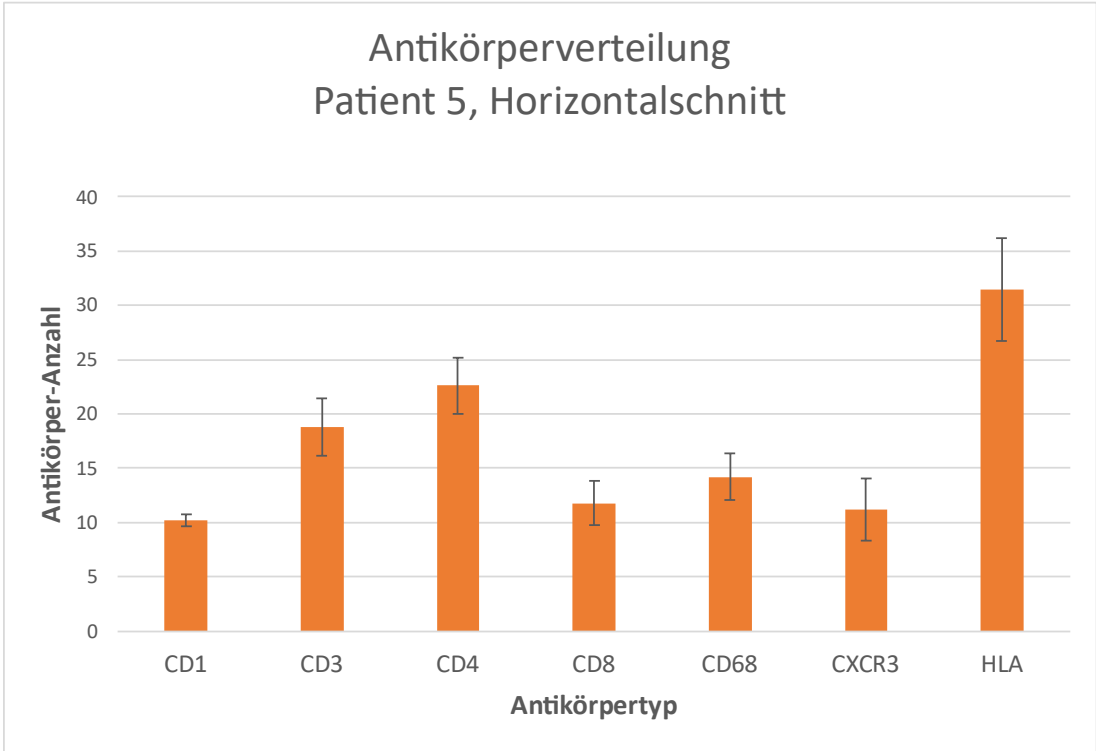
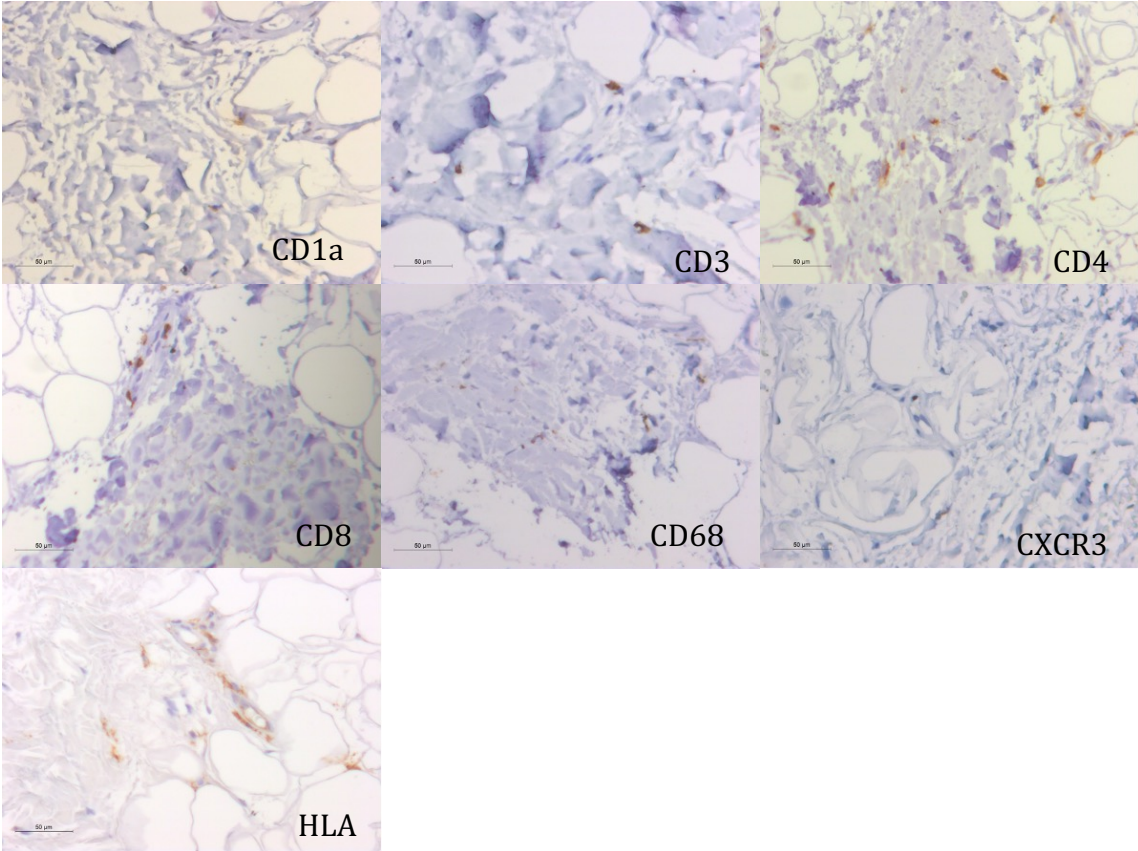


Abbildung 18: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 5 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.6 Patient 6 (Weiblich, 55 Jahre, AA totalis)

Vertikalschnitt

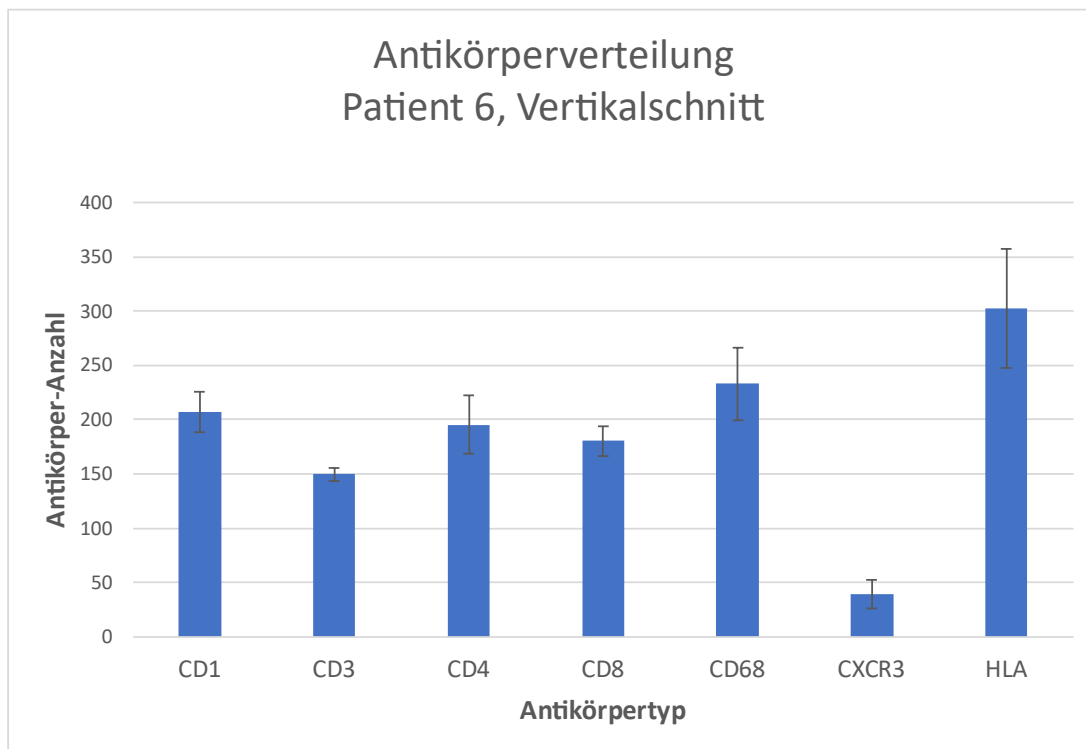
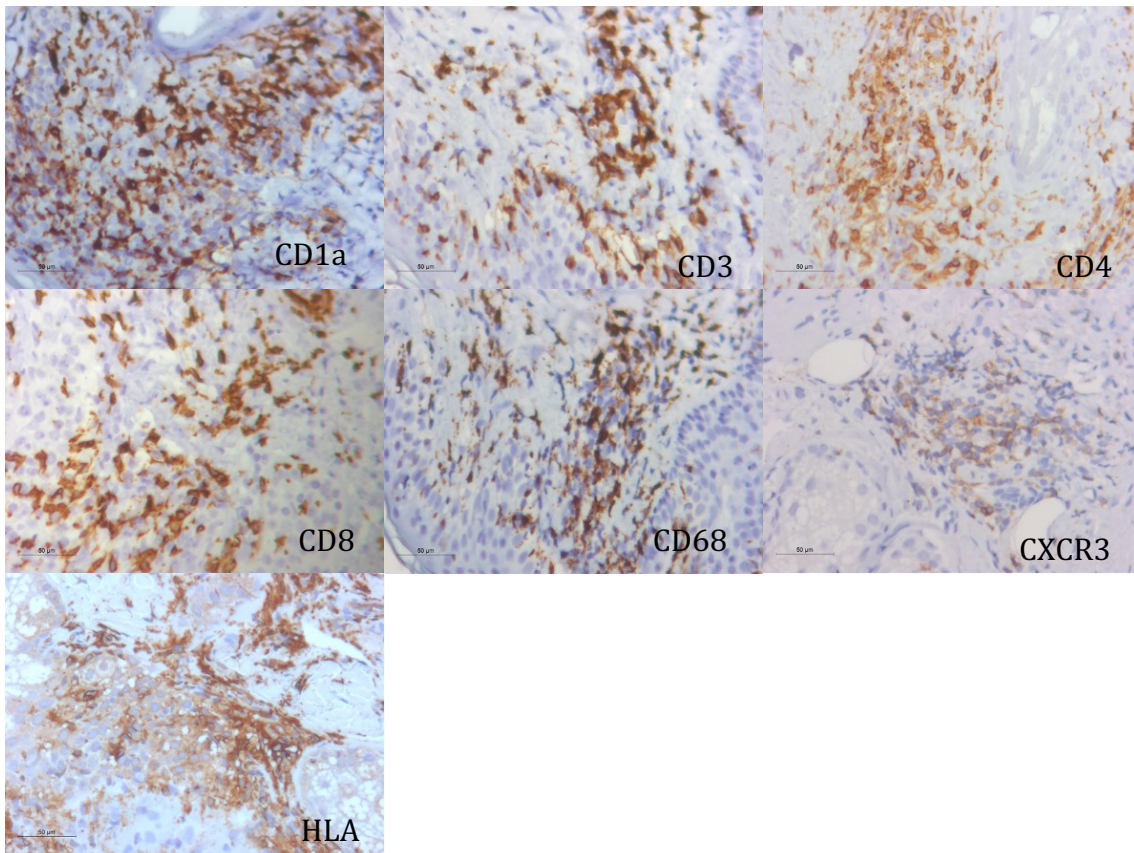


Abbildung 19: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 6 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

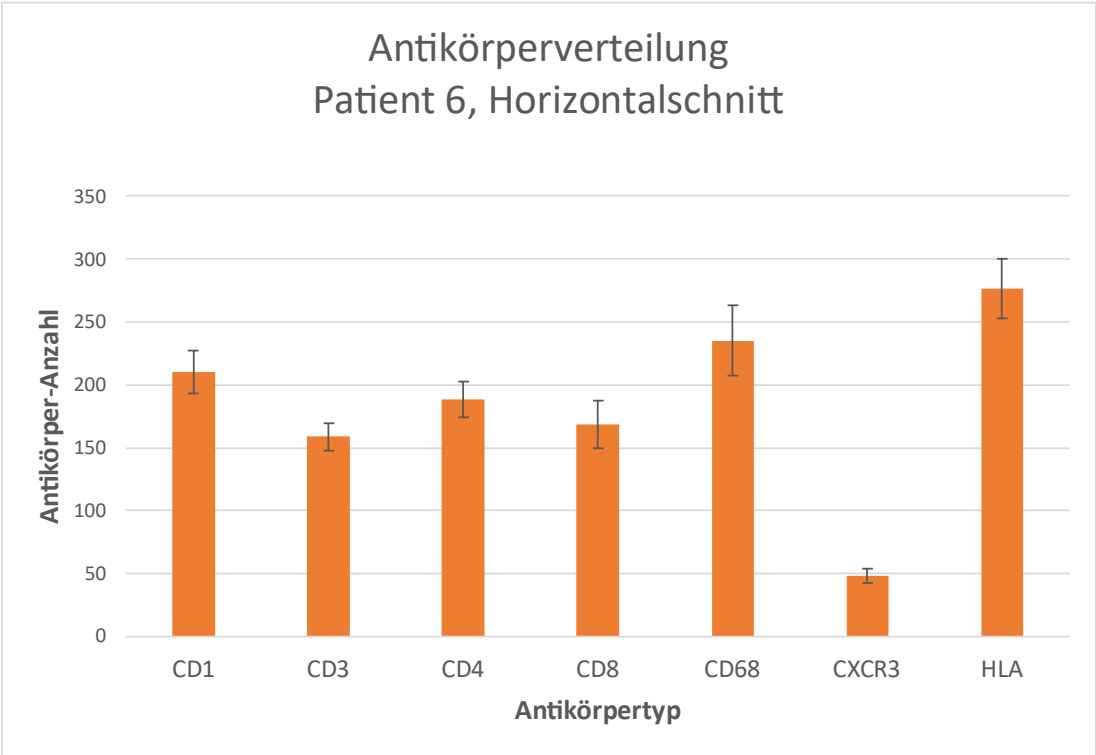
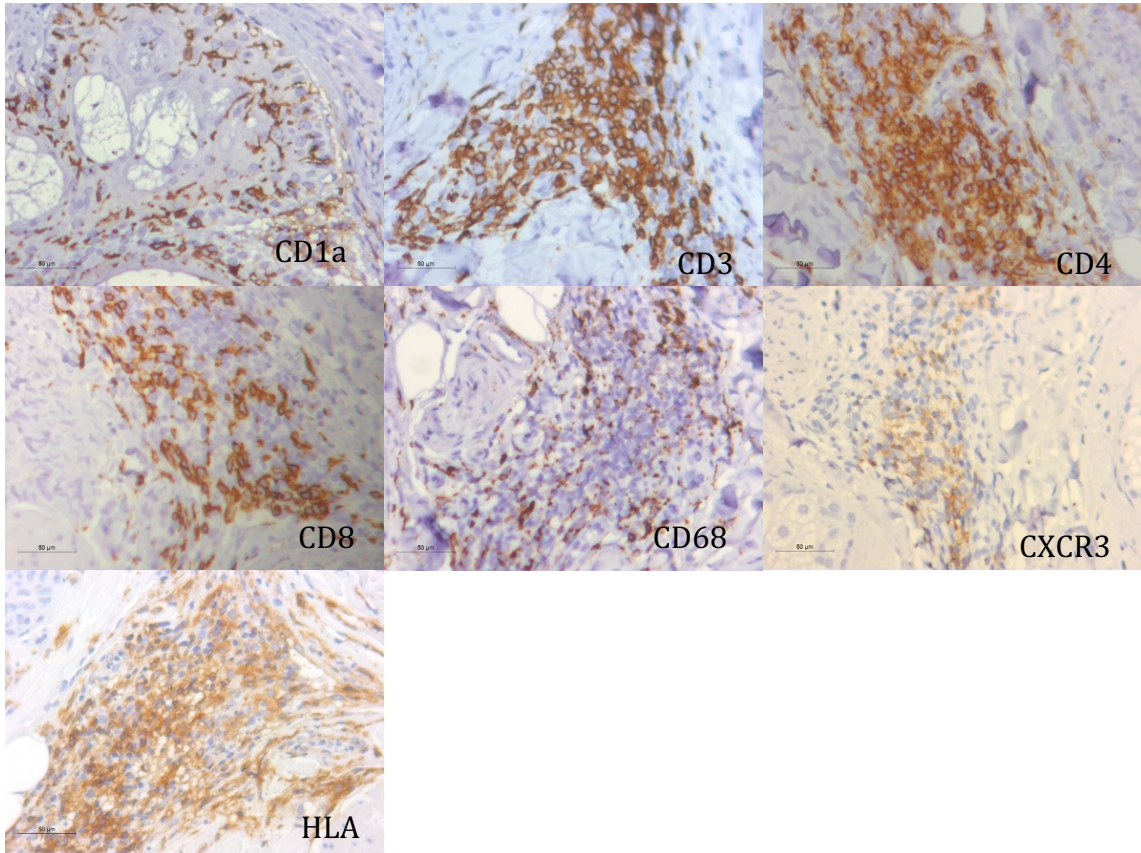


Abbildung 20: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 6 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.7 Patient 7 (Weiblich, 56 Jahre, AA)

Vertikalschnitt

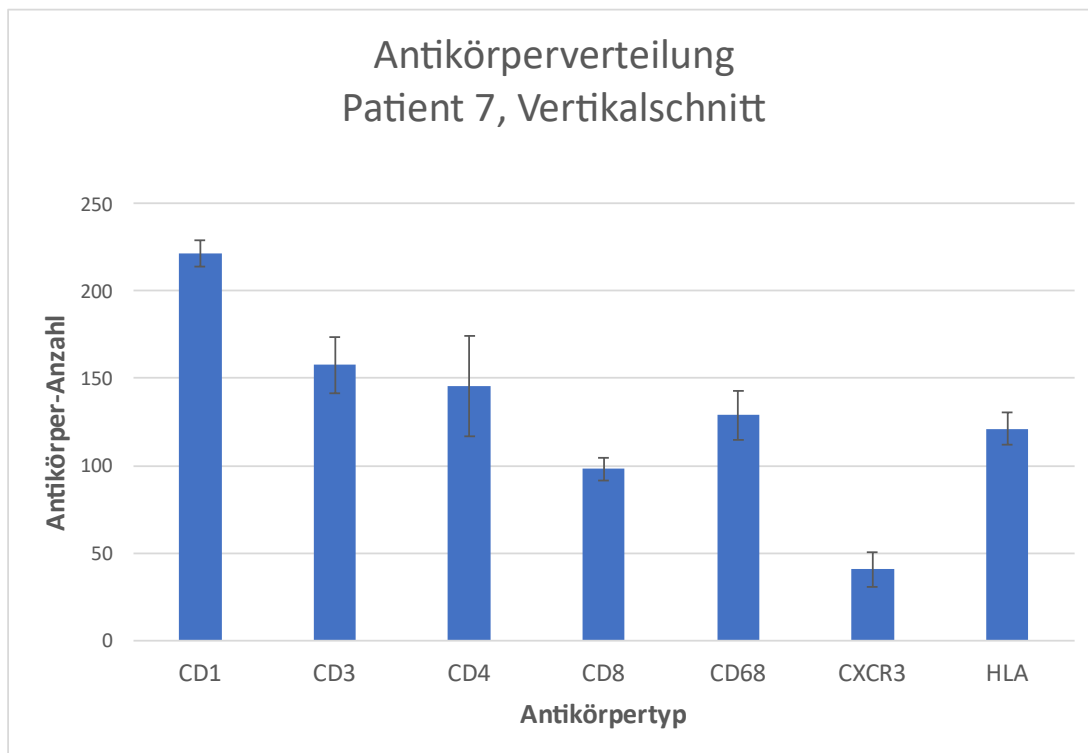
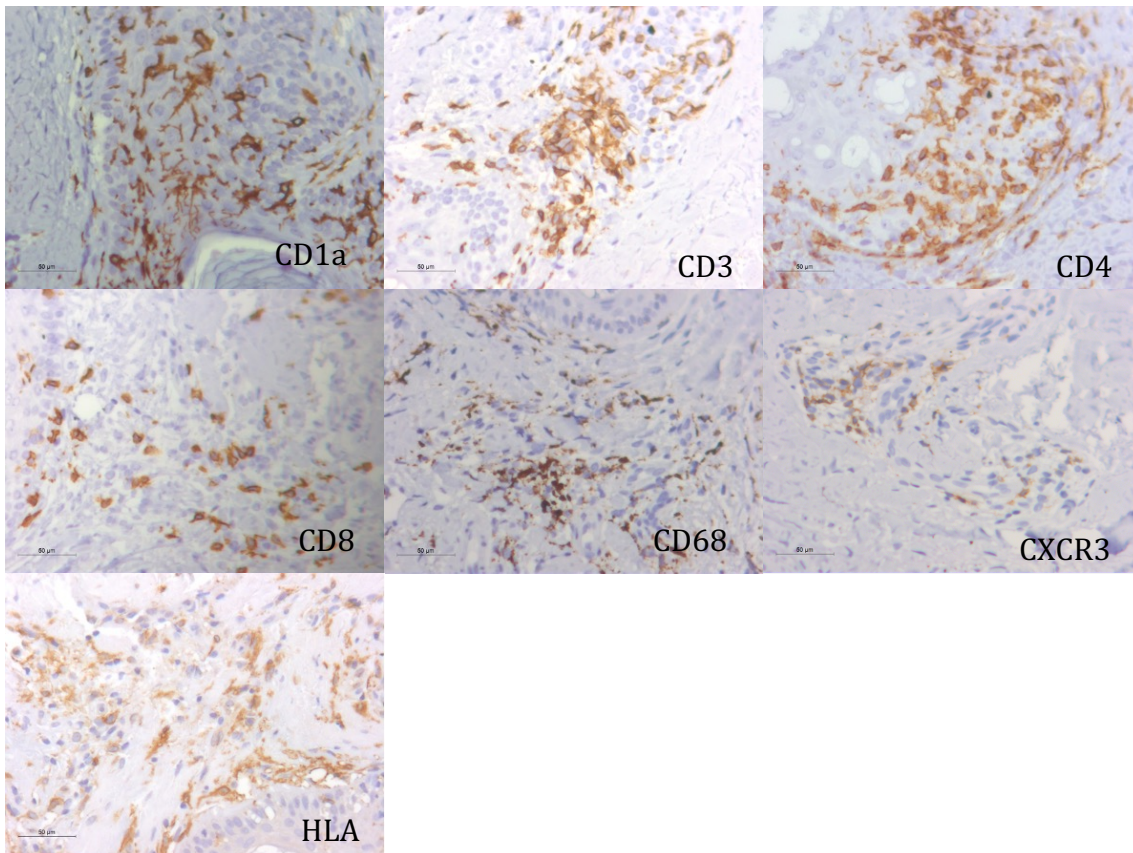


Abbildung 21: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 7 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

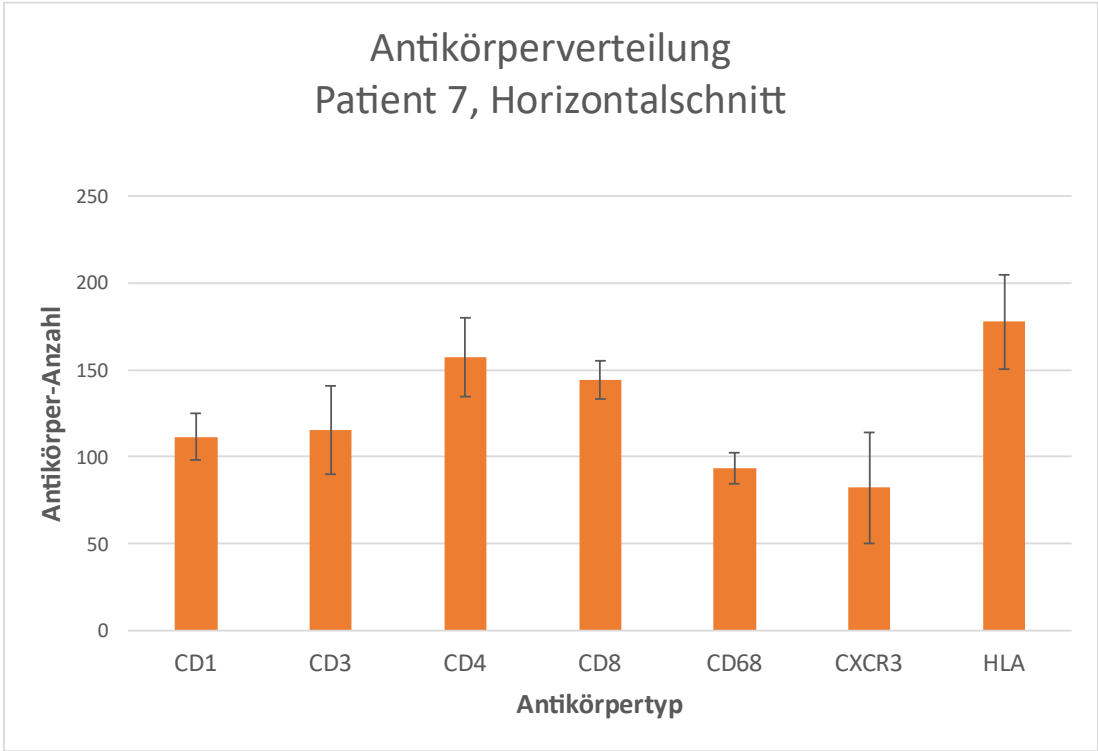
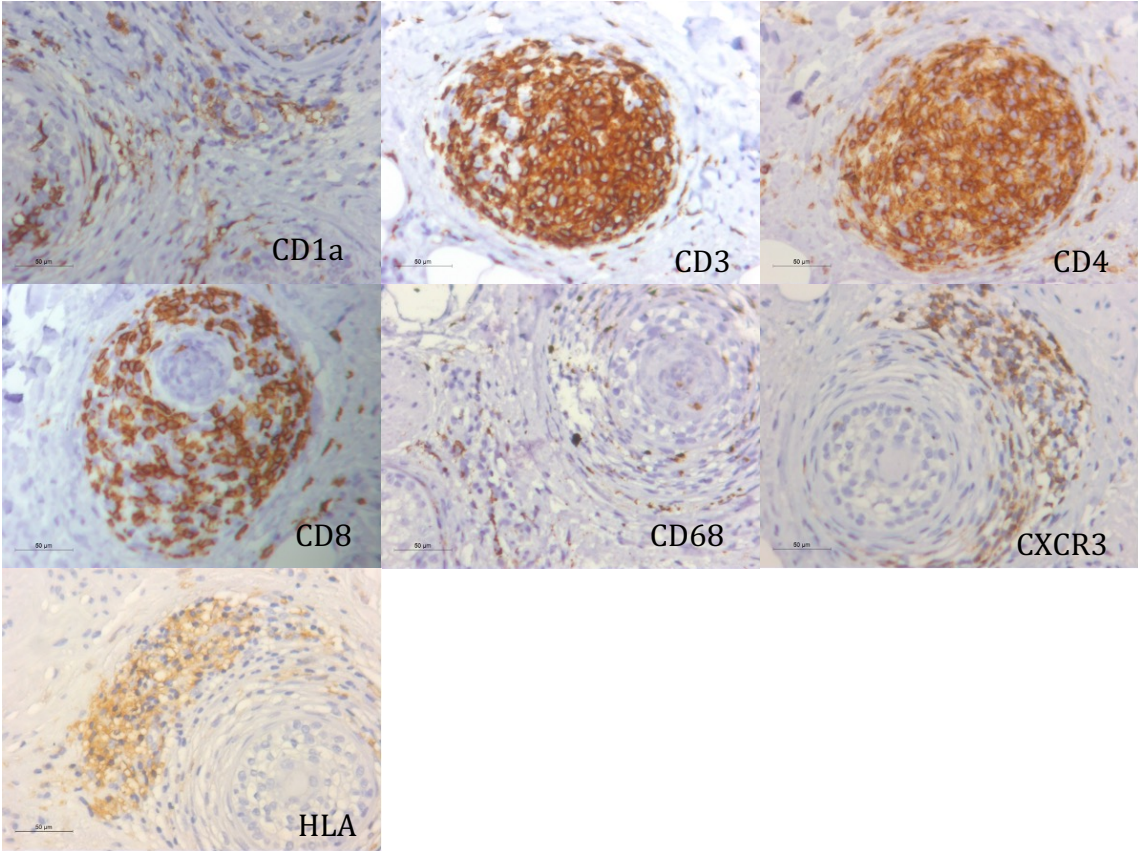


Abbildung 22: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 7 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.8 Patient 8 (Weiblich, 59 Jahre, AA totalis)

Vertikalschnitt

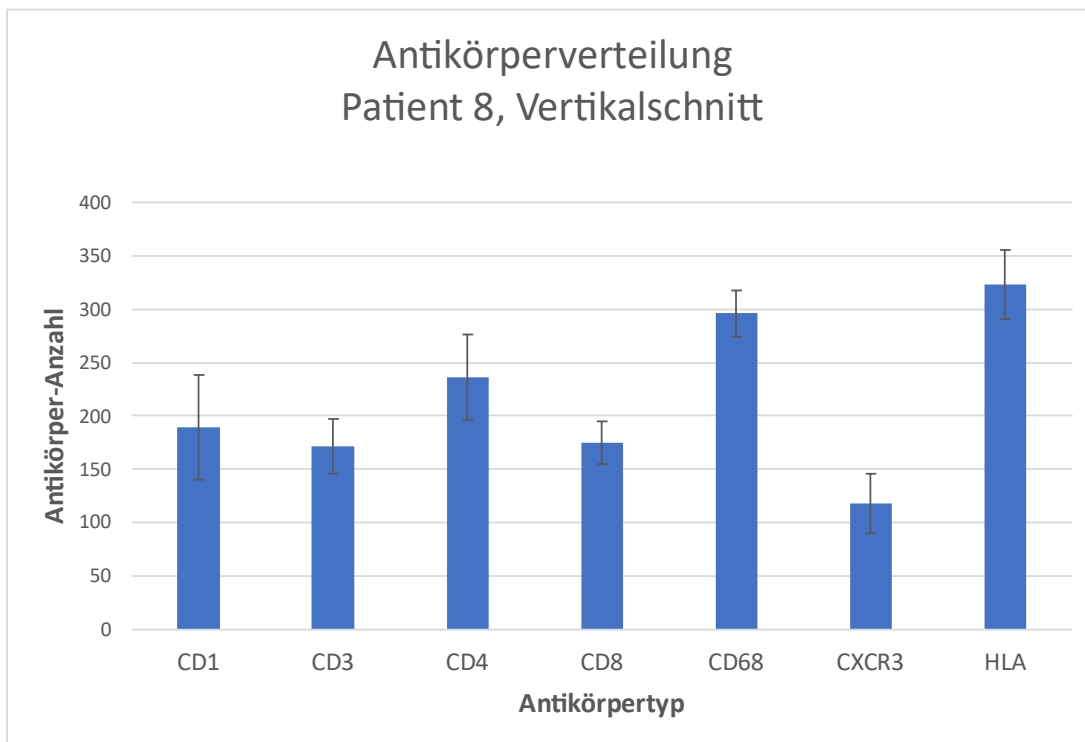
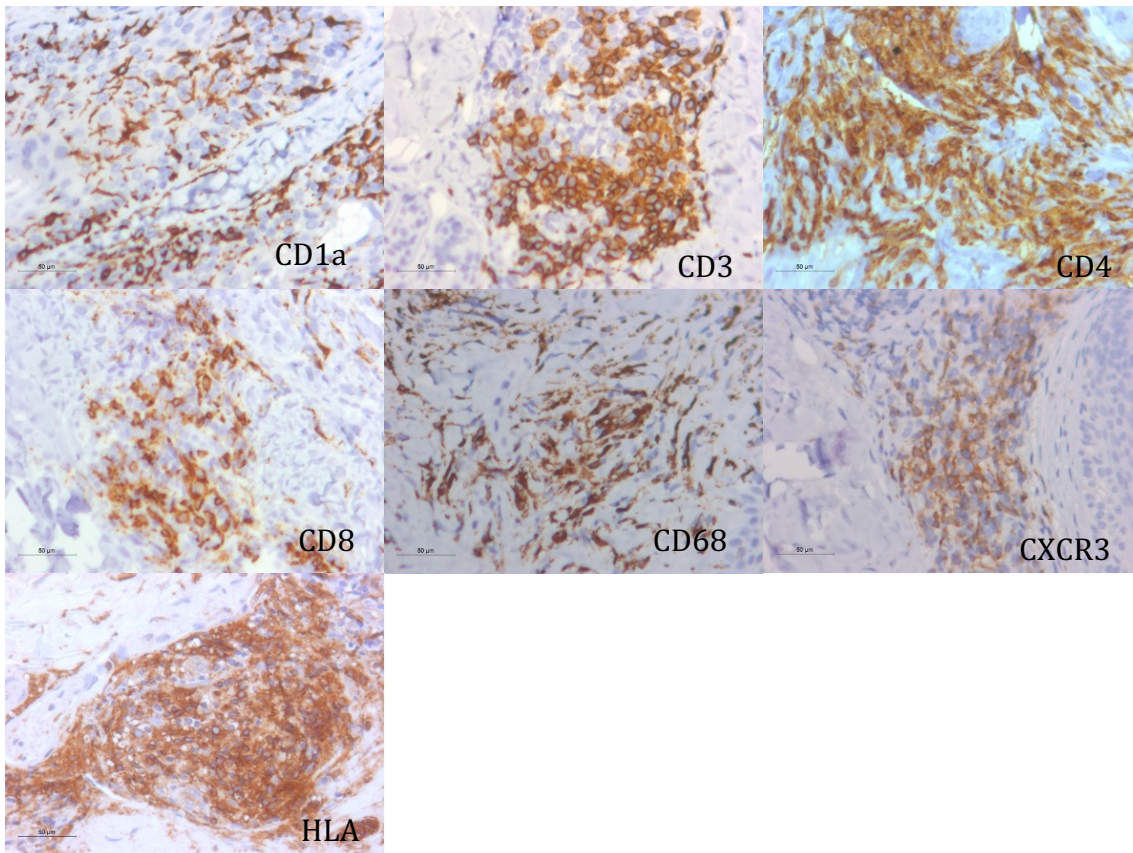


Abbildung 23: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 8 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

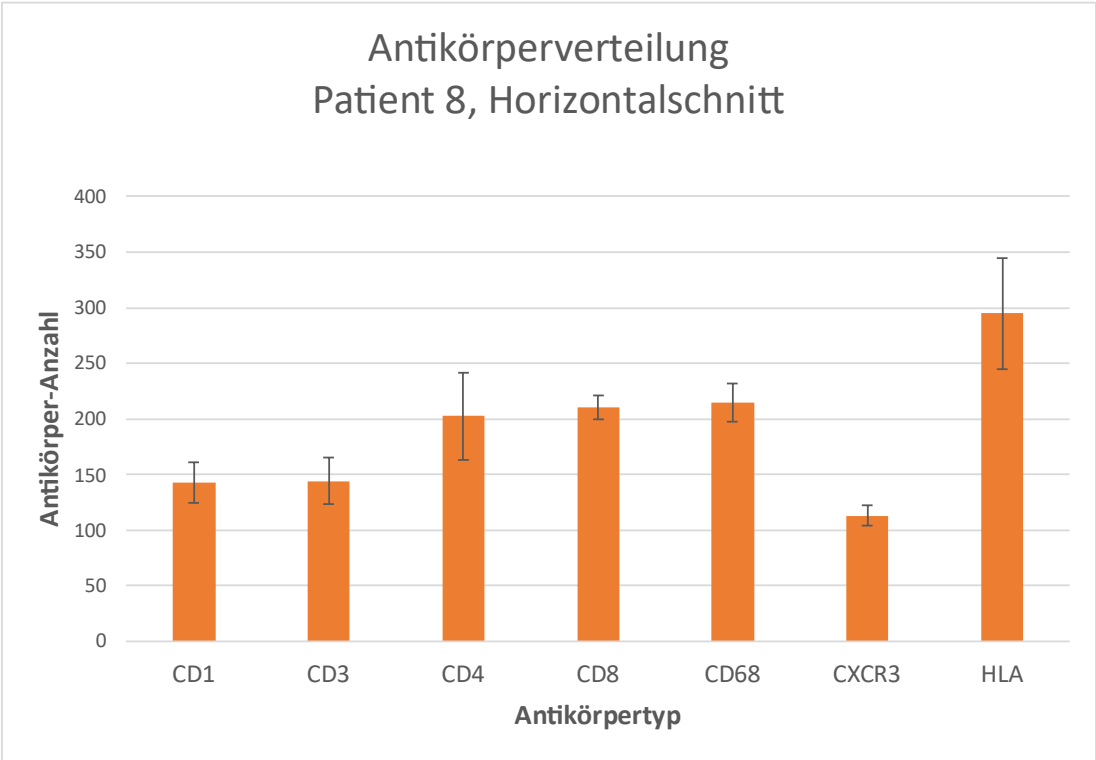
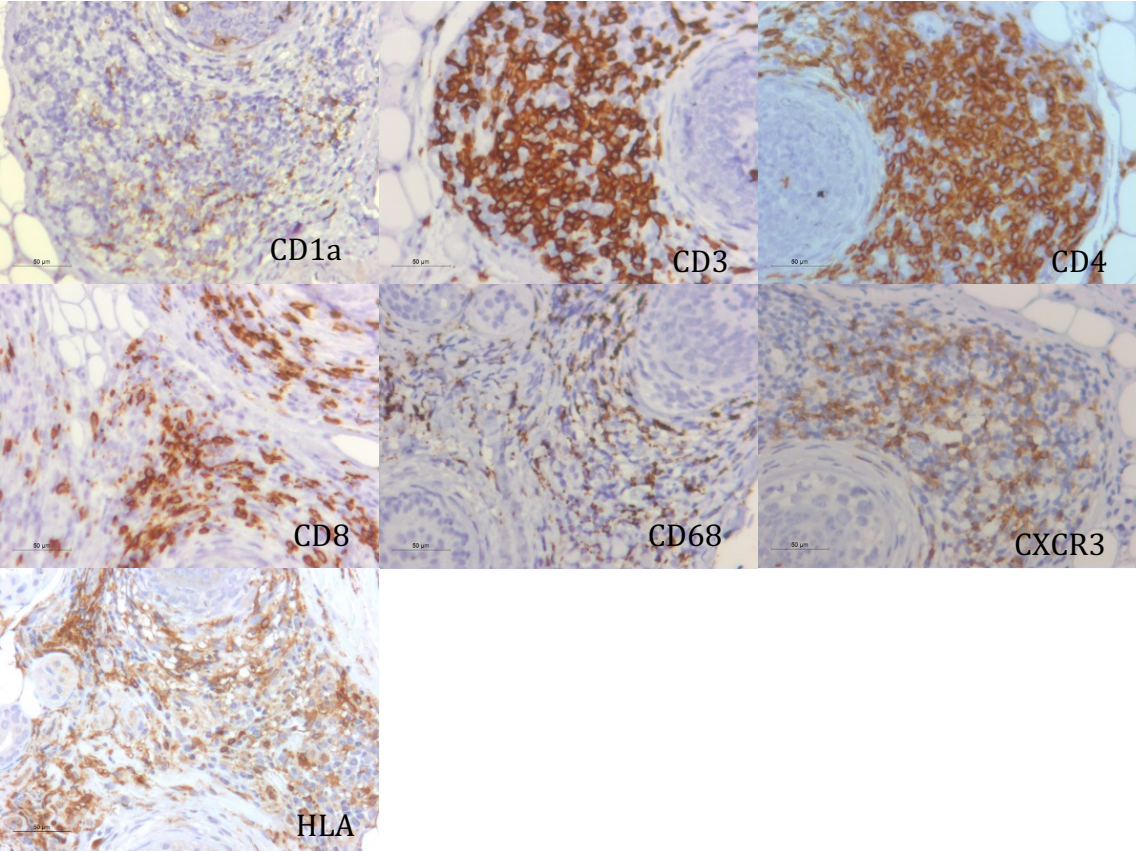


Abbildung 24: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 8 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.9 Patient 9 (Weiblich, 35 Jahre, AA)

Vertikalschnitt

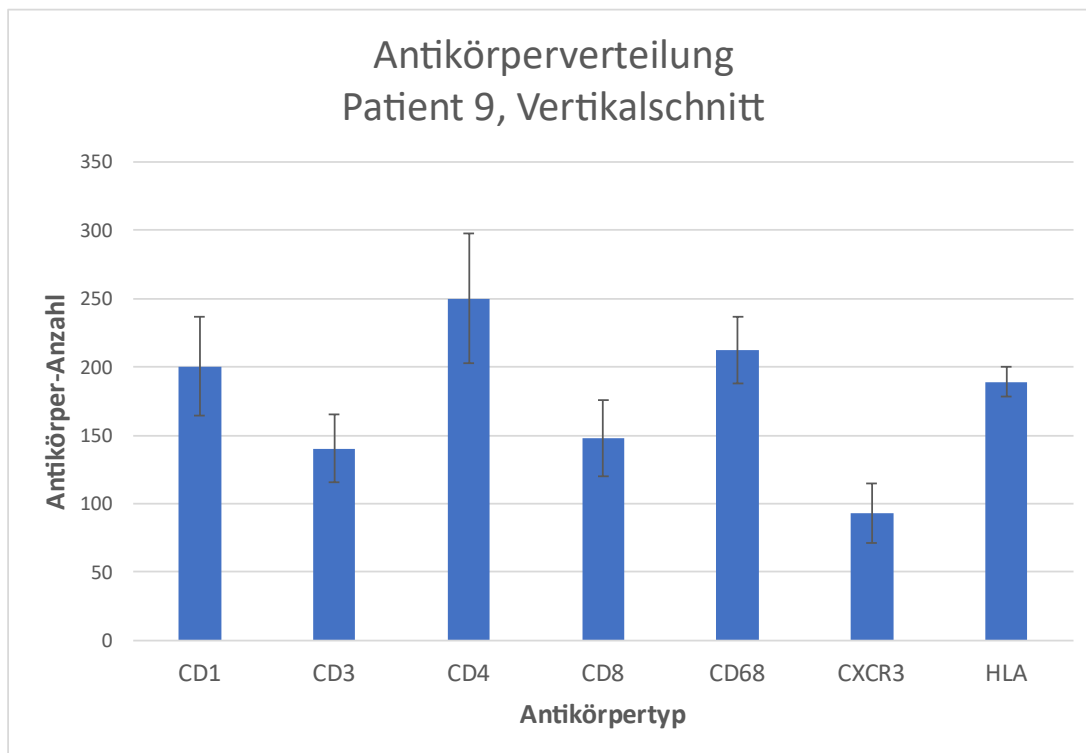
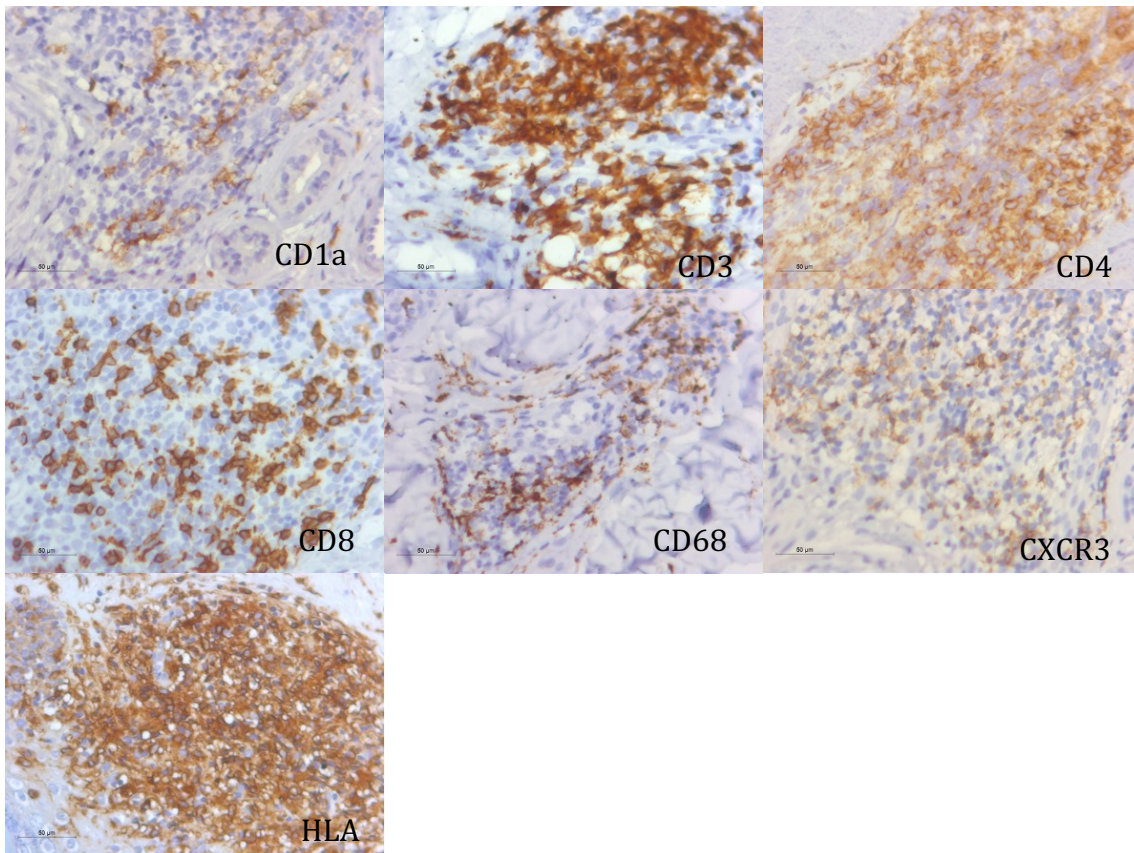


Abbildung 25: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 9 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

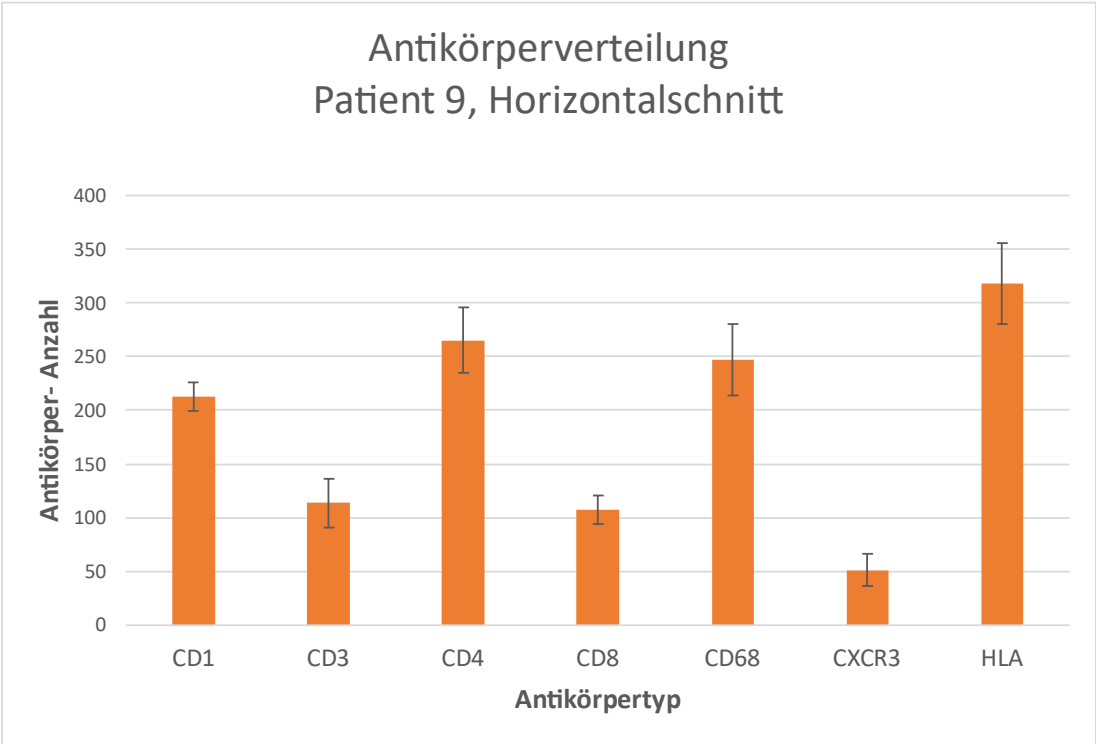
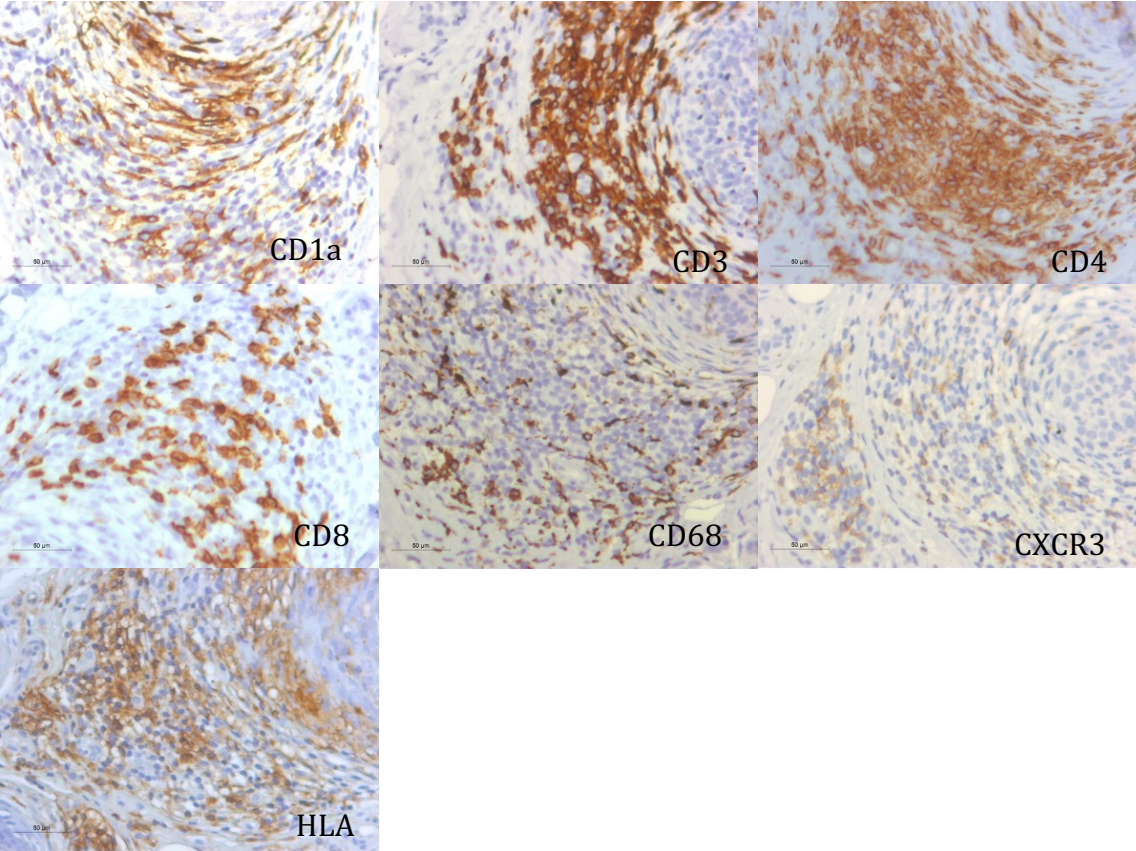


Abbildung 26: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 9 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.10 Patient 10 (Weiblich, 33 Jahre, AA)

Vertikalschnitt

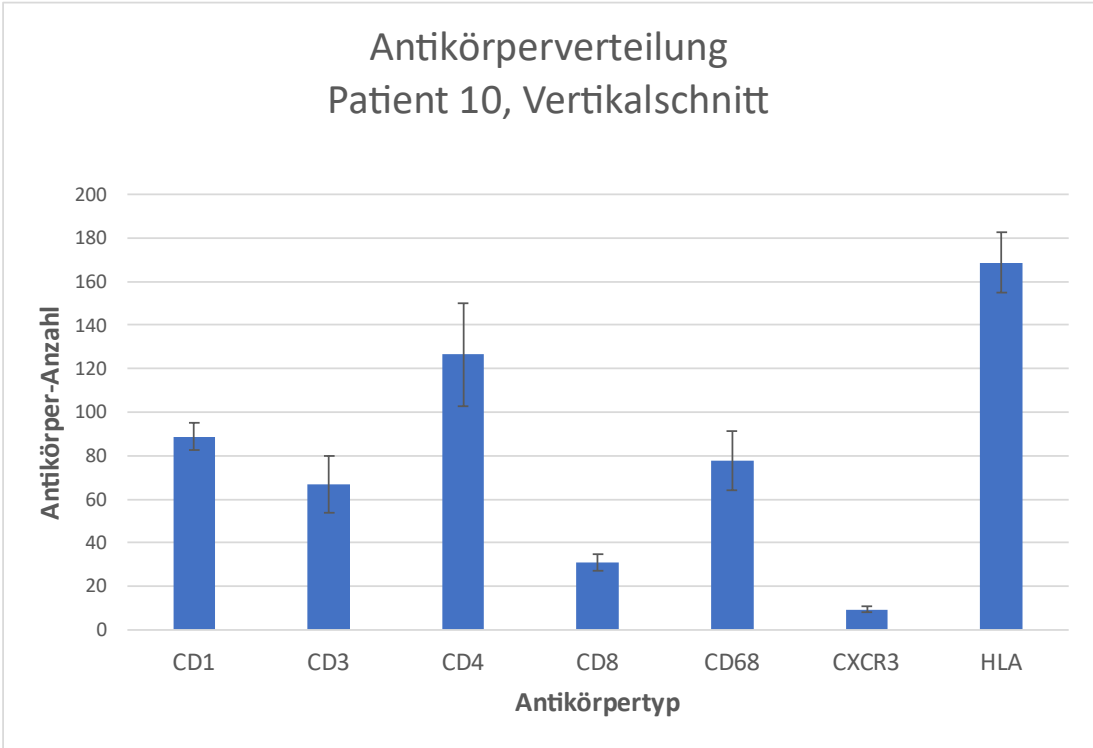
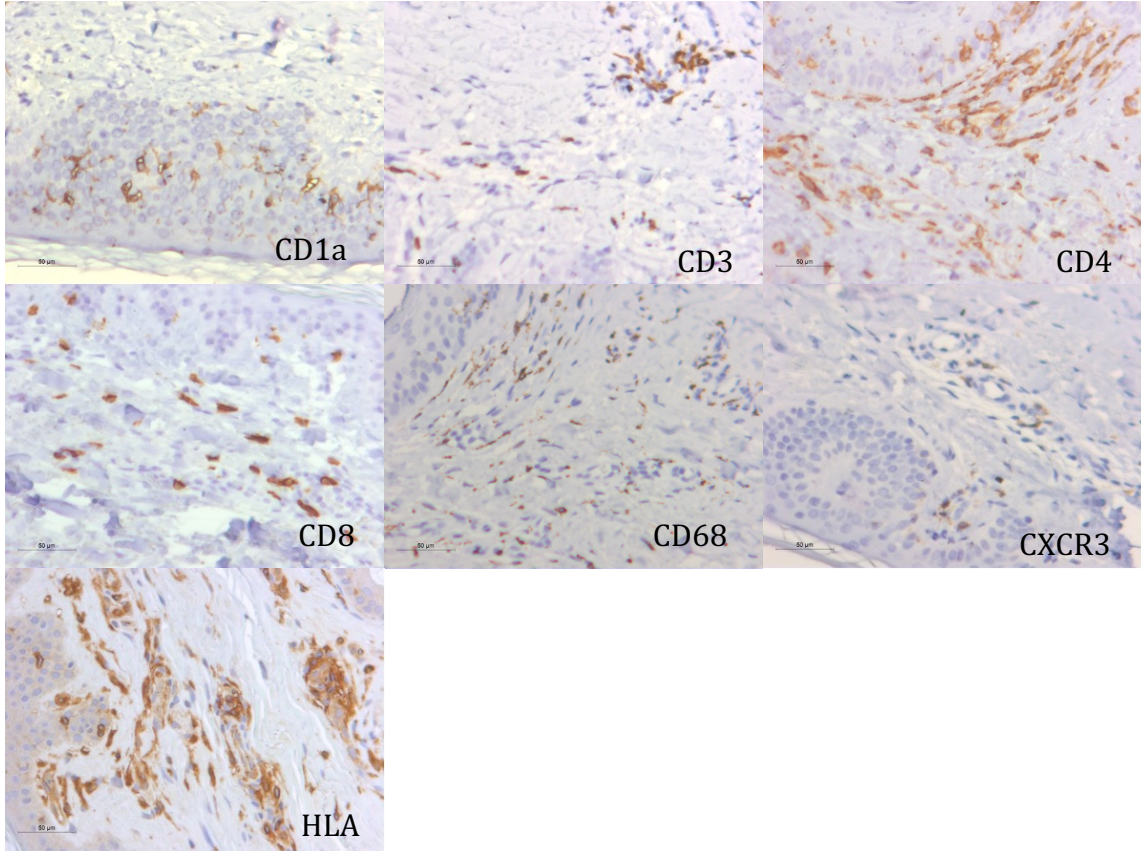


Abbildung 27: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 10 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

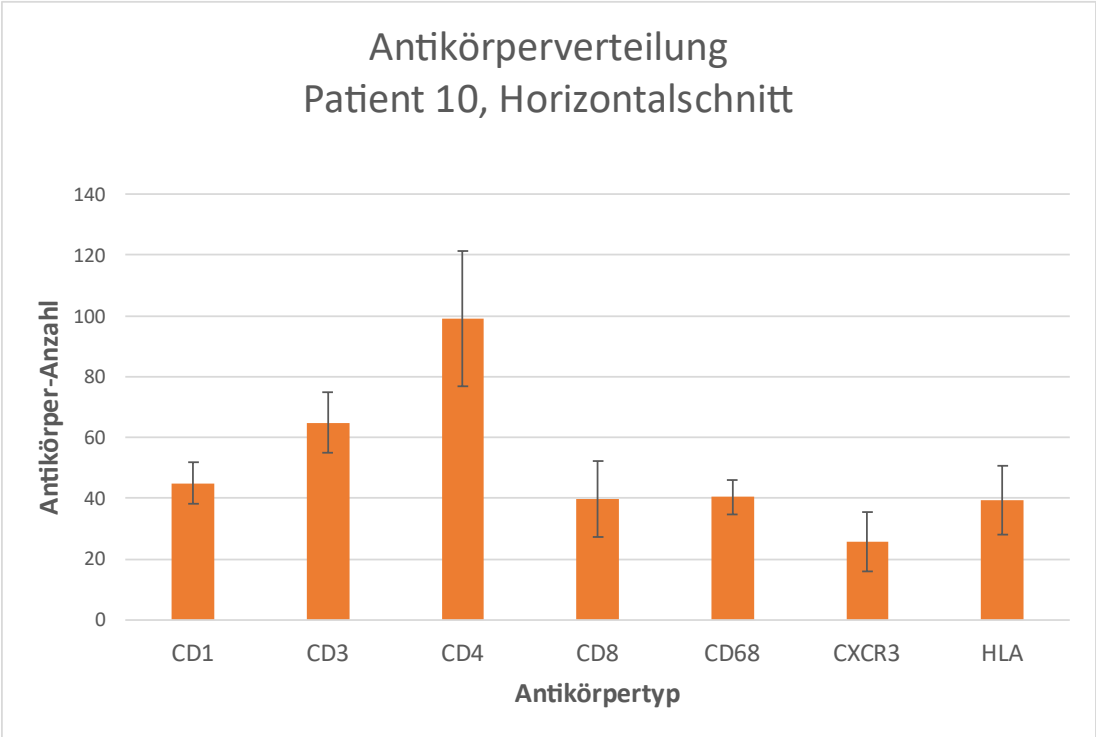
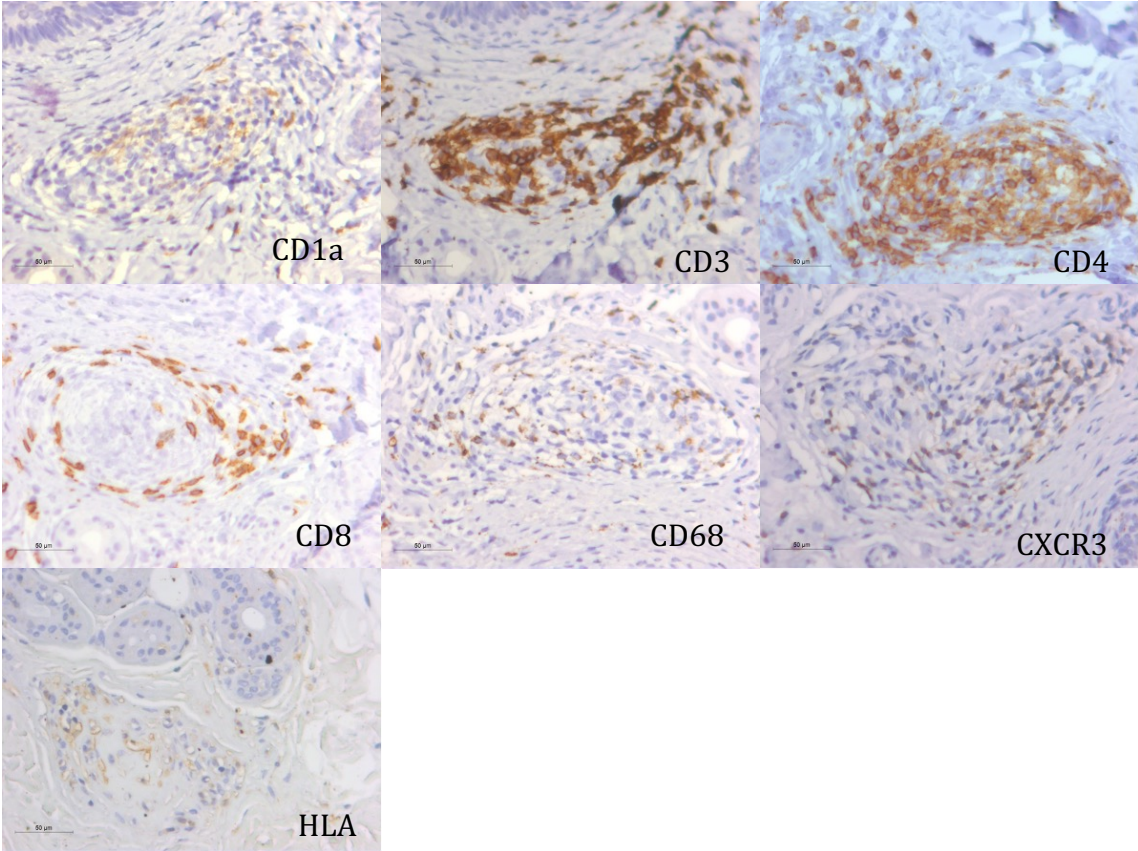


Abbildung 28: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 10 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.11 Patient 11 (Weiblich, 58 Jahre, AA)

Vertikalschnitt

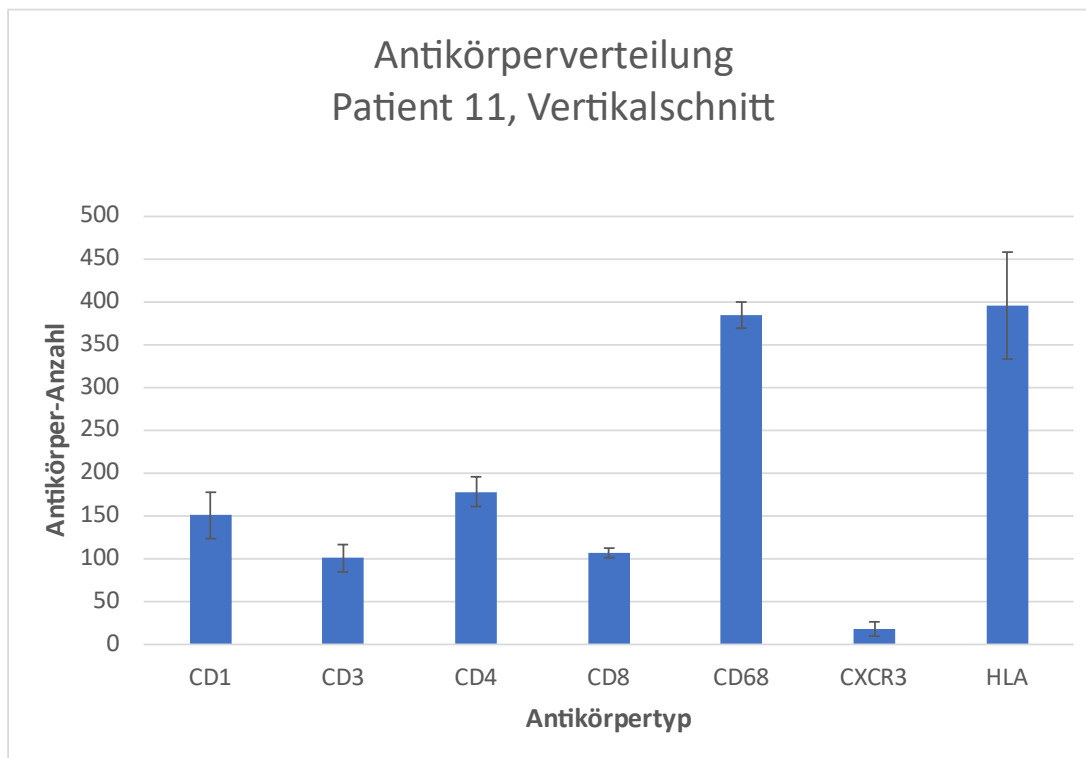
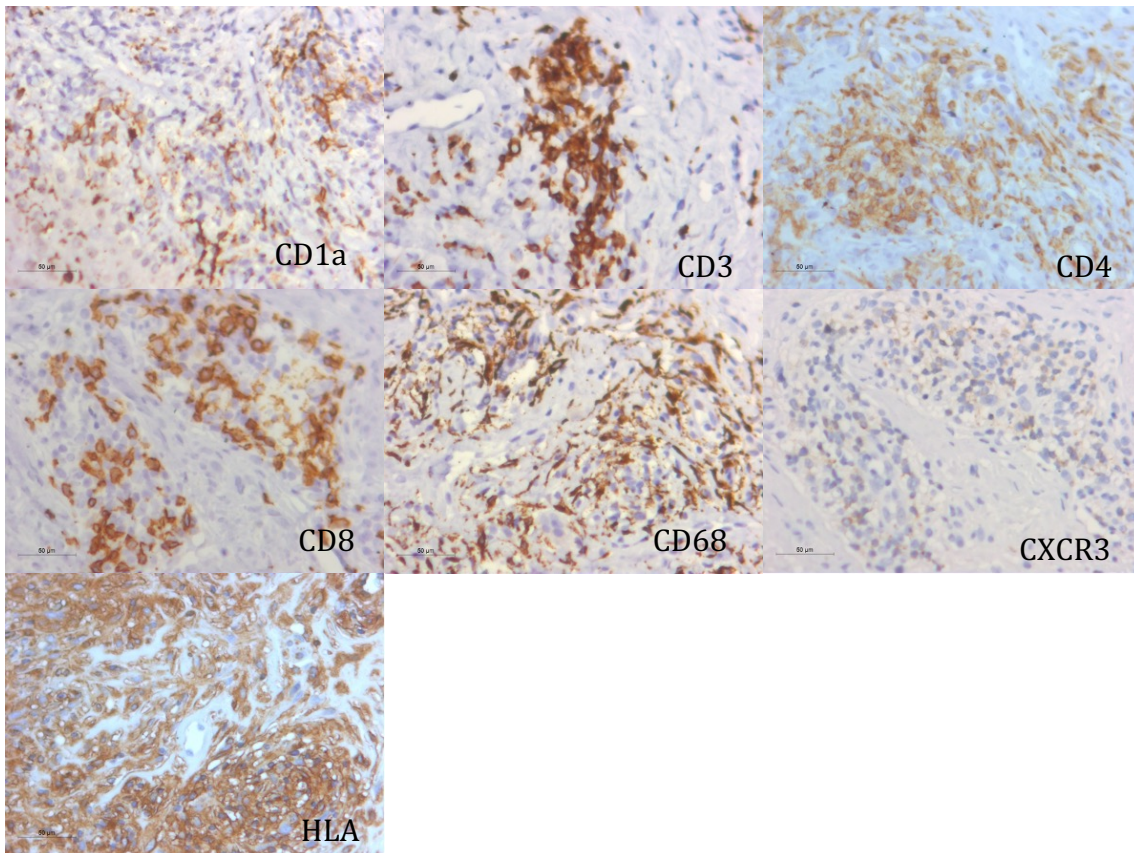


Abbildung 29: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 11 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

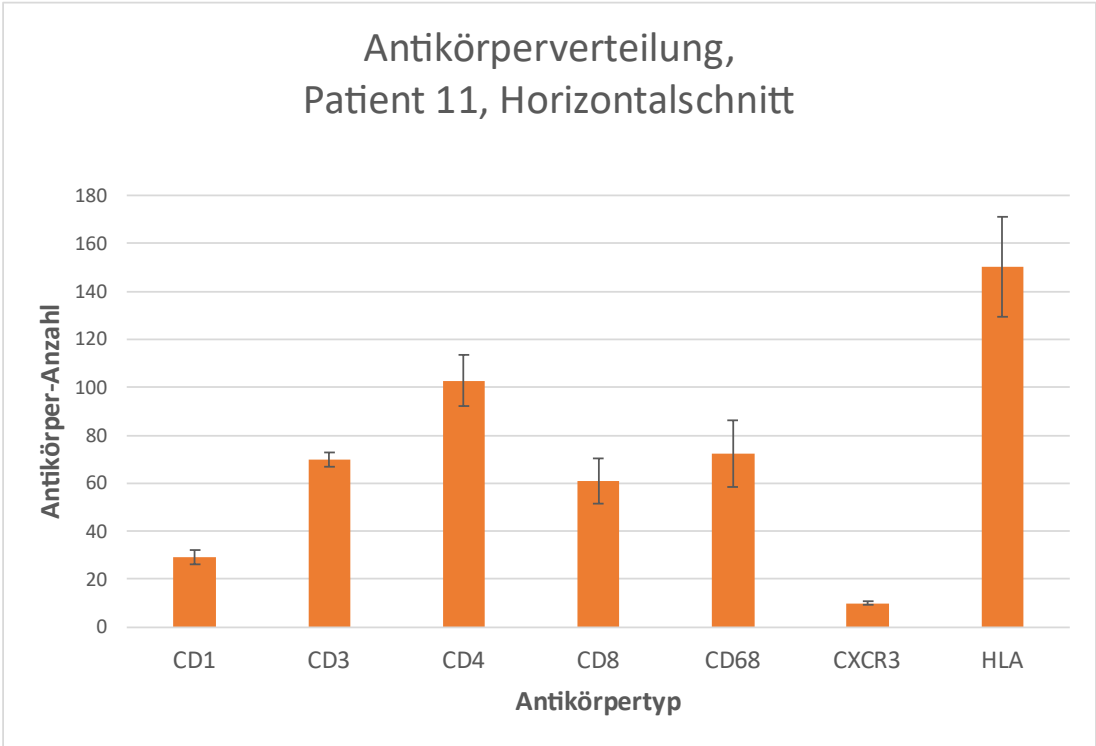
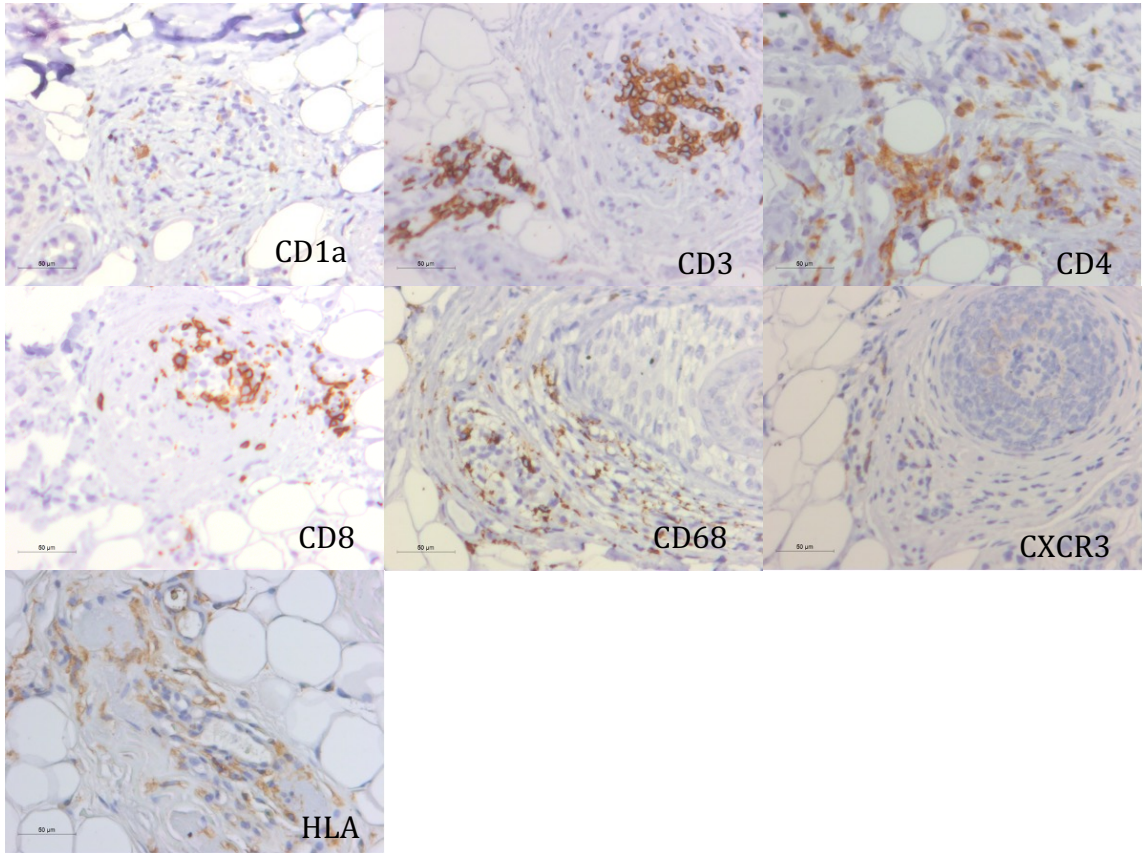


Abbildung 30: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 11 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.12 Patient 12 (Weiblich, 66 Jahre, AA totalis)

Vertikalschnitt

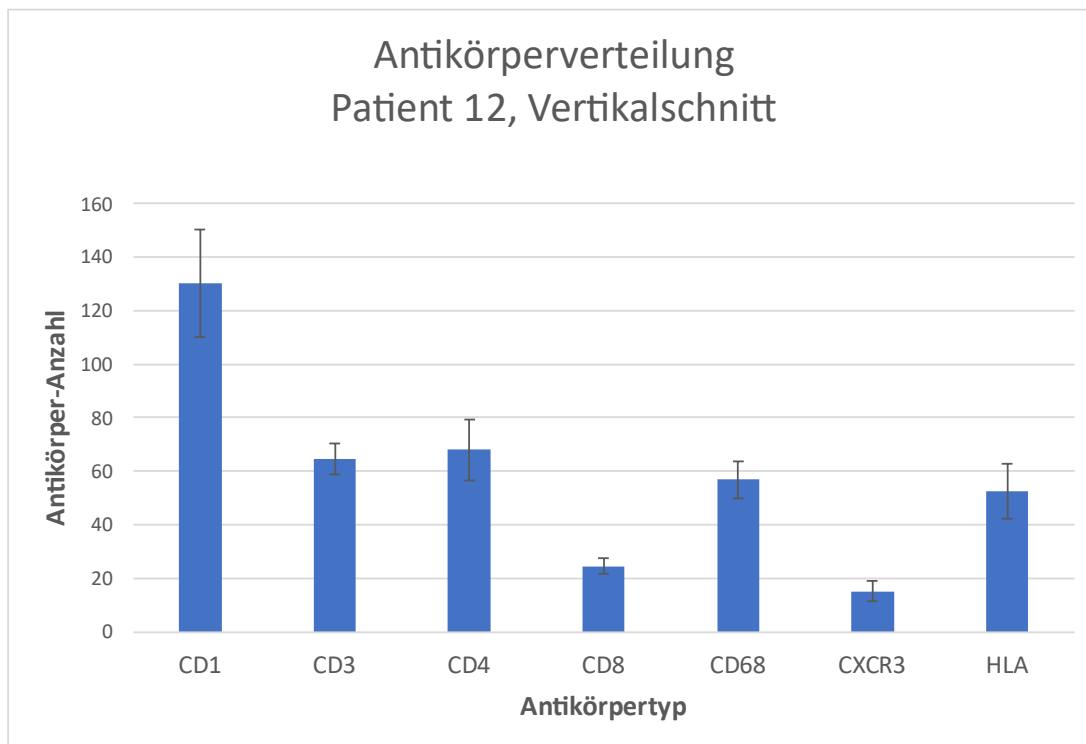
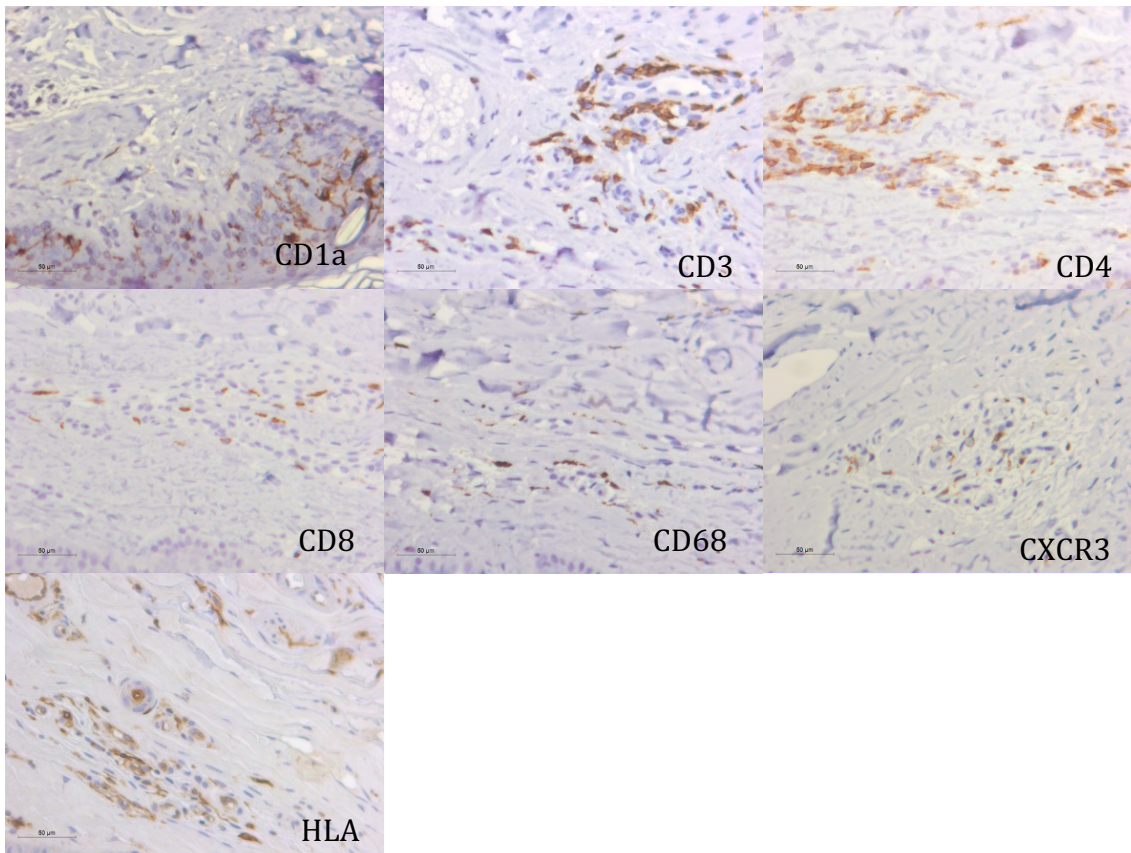


Abbildung 31: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 12 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

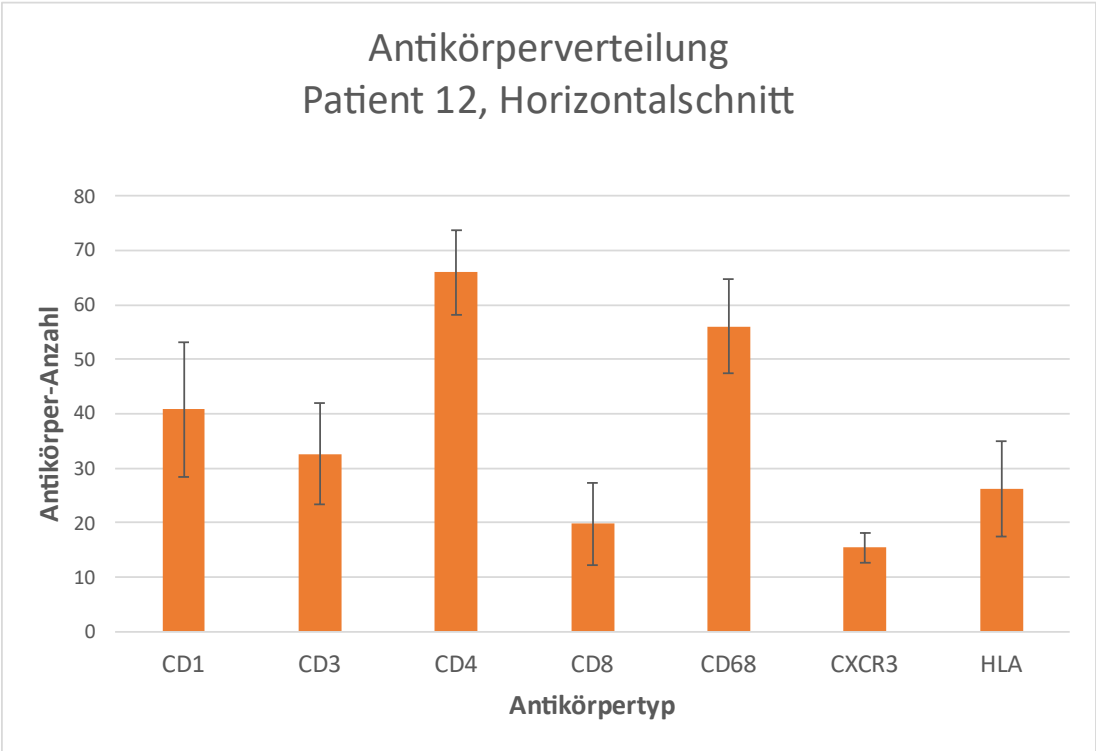
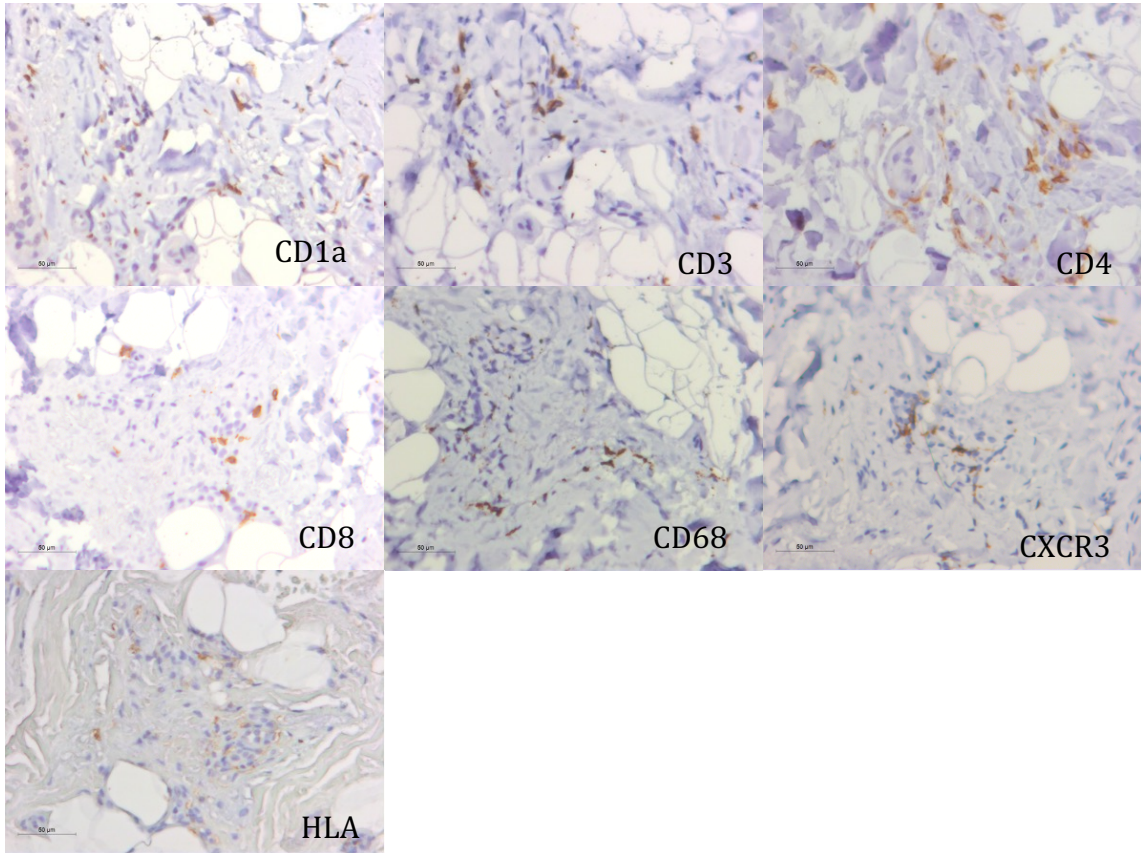


Abbildung 32: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 12 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.13 Patient 13 (Weiblich, 18 Jahre, AA)

Vertikalschnitt

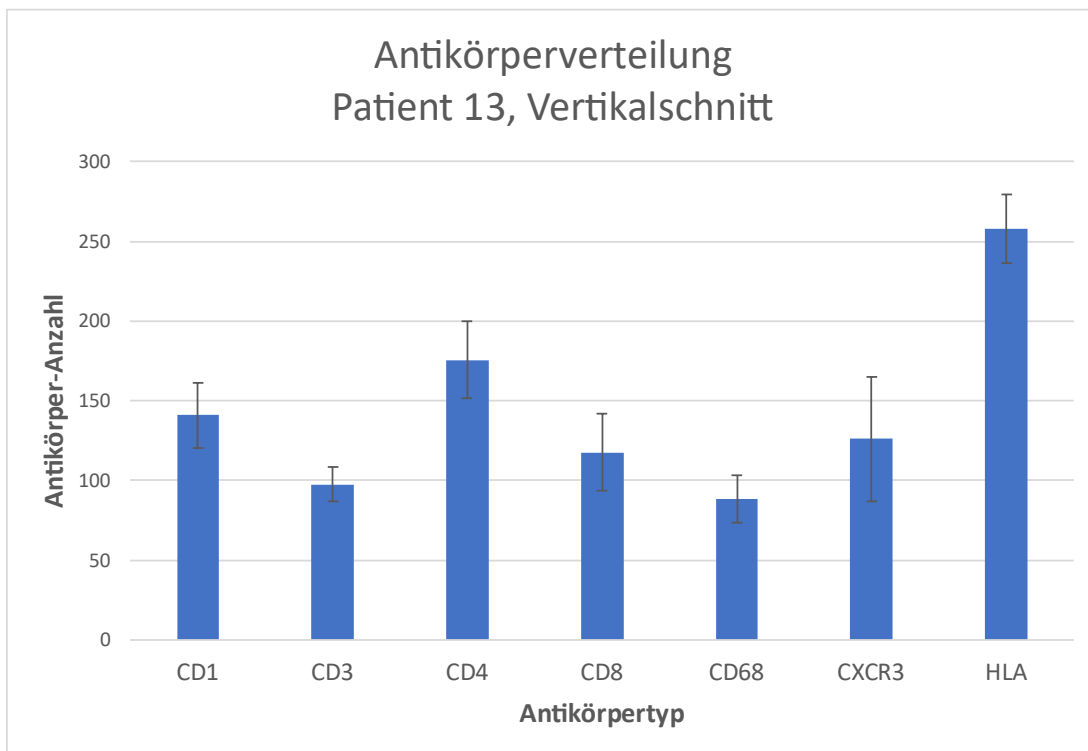
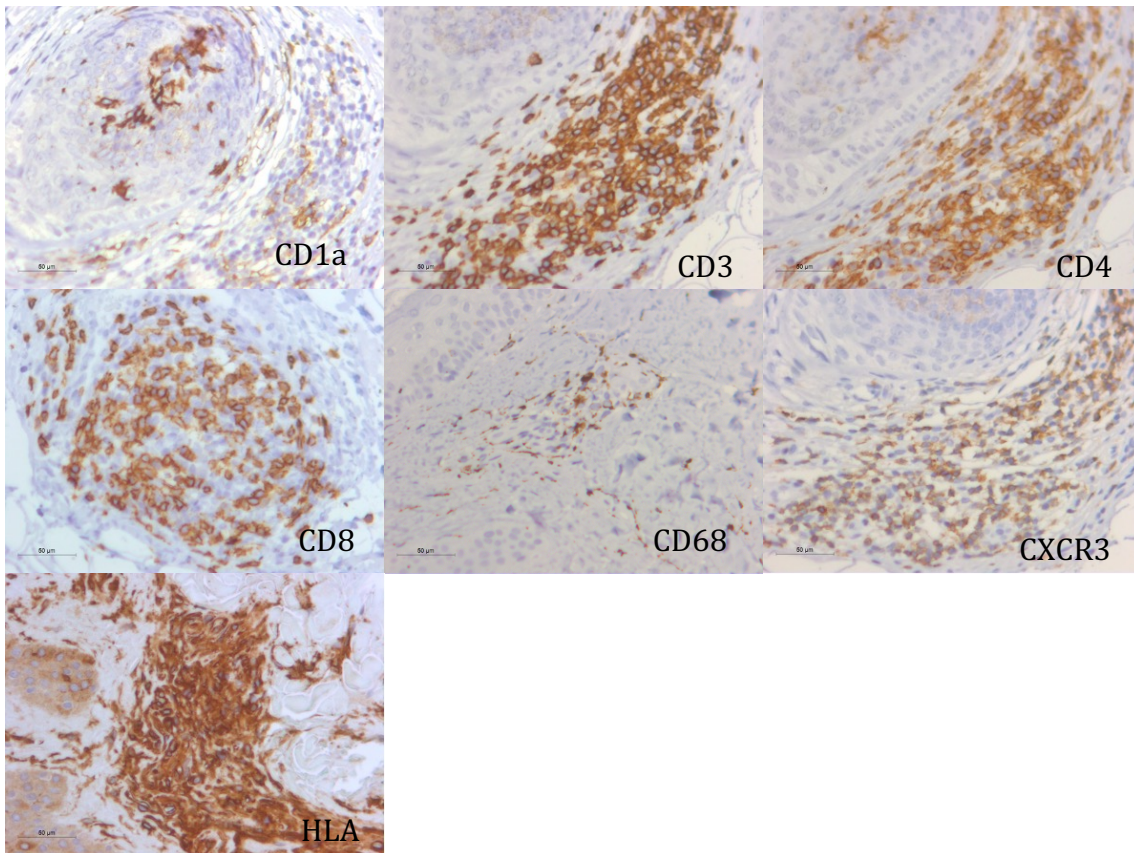


Abbildung 33: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 13 mit Alopecia areata im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

Horizontalschnitt

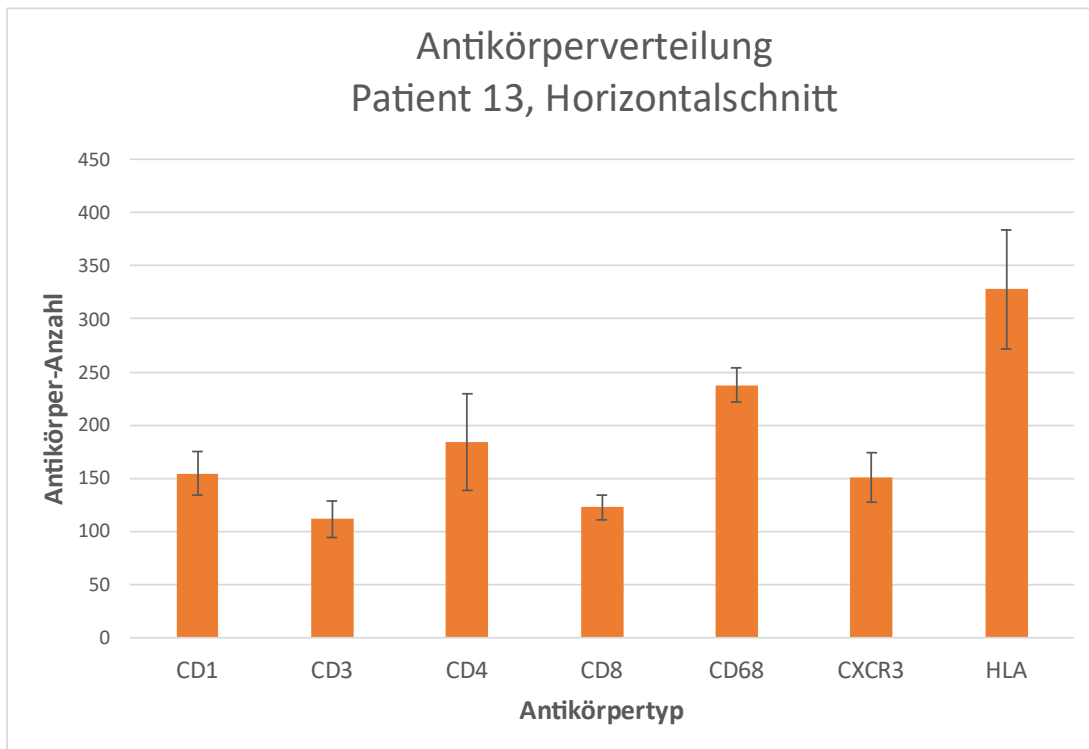
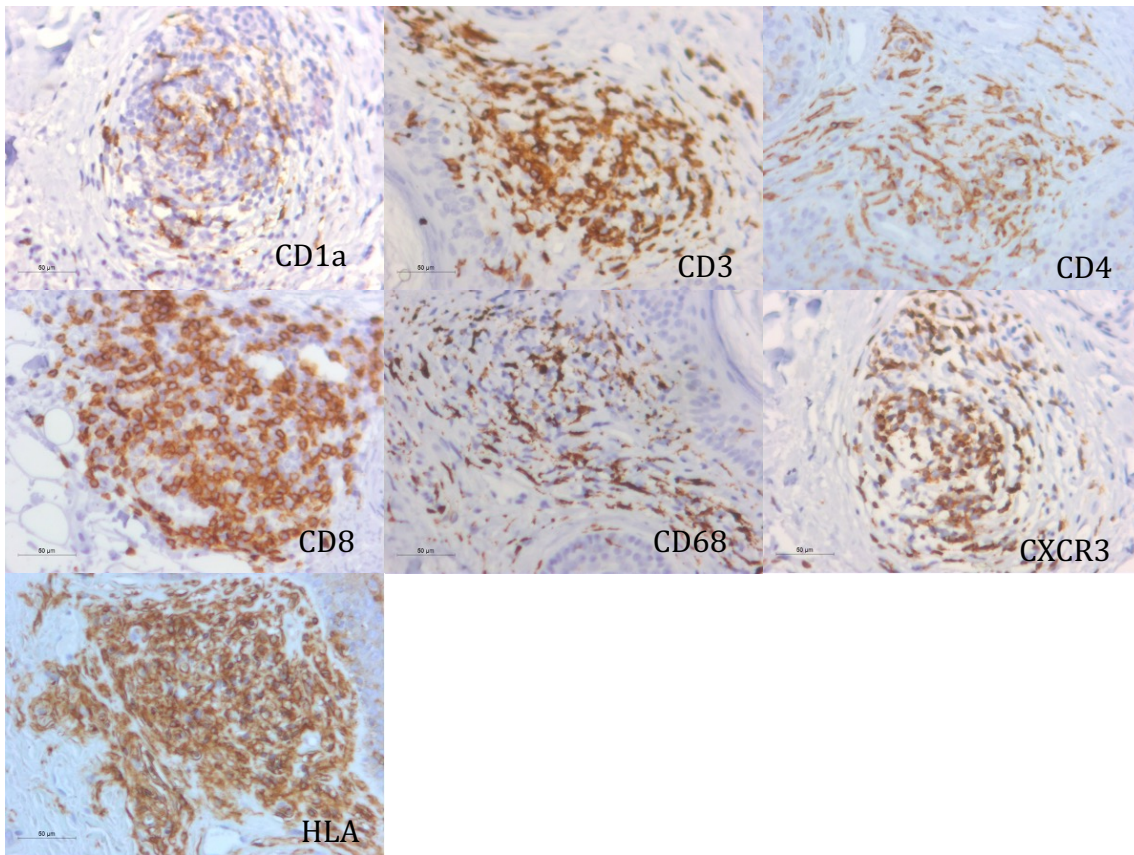


Abbildung 34: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 13 mit Alopecia areata im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.14 Patient 14 (Männlich, 74 Jahre, Kontrollgruppe)

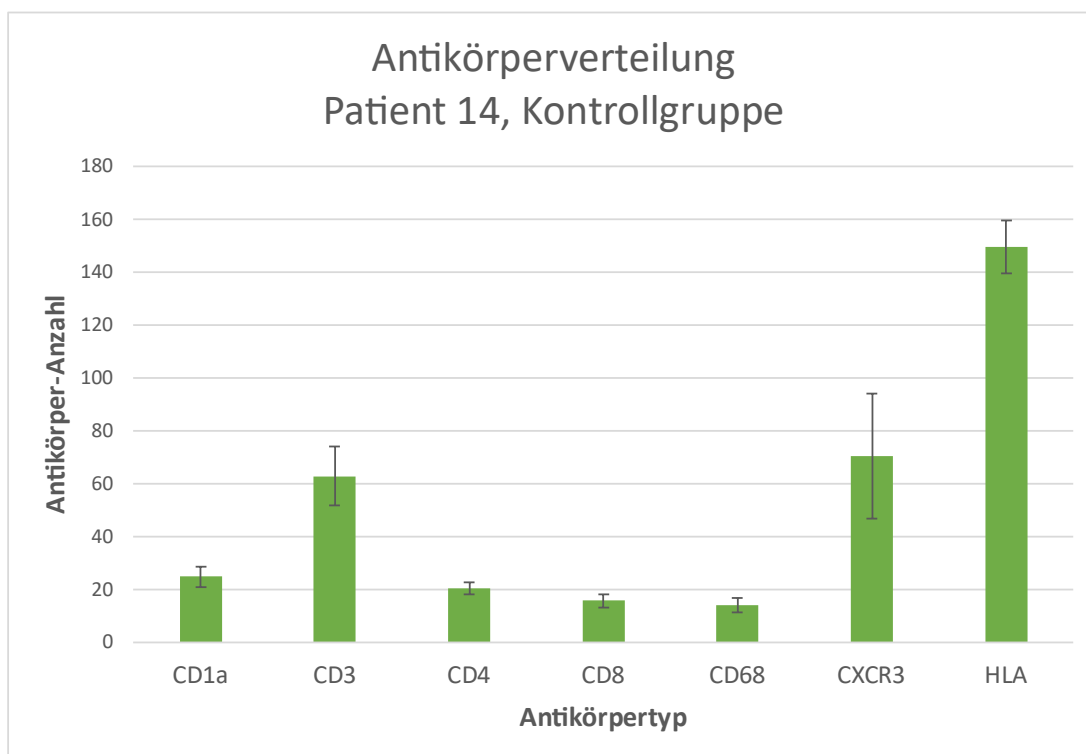
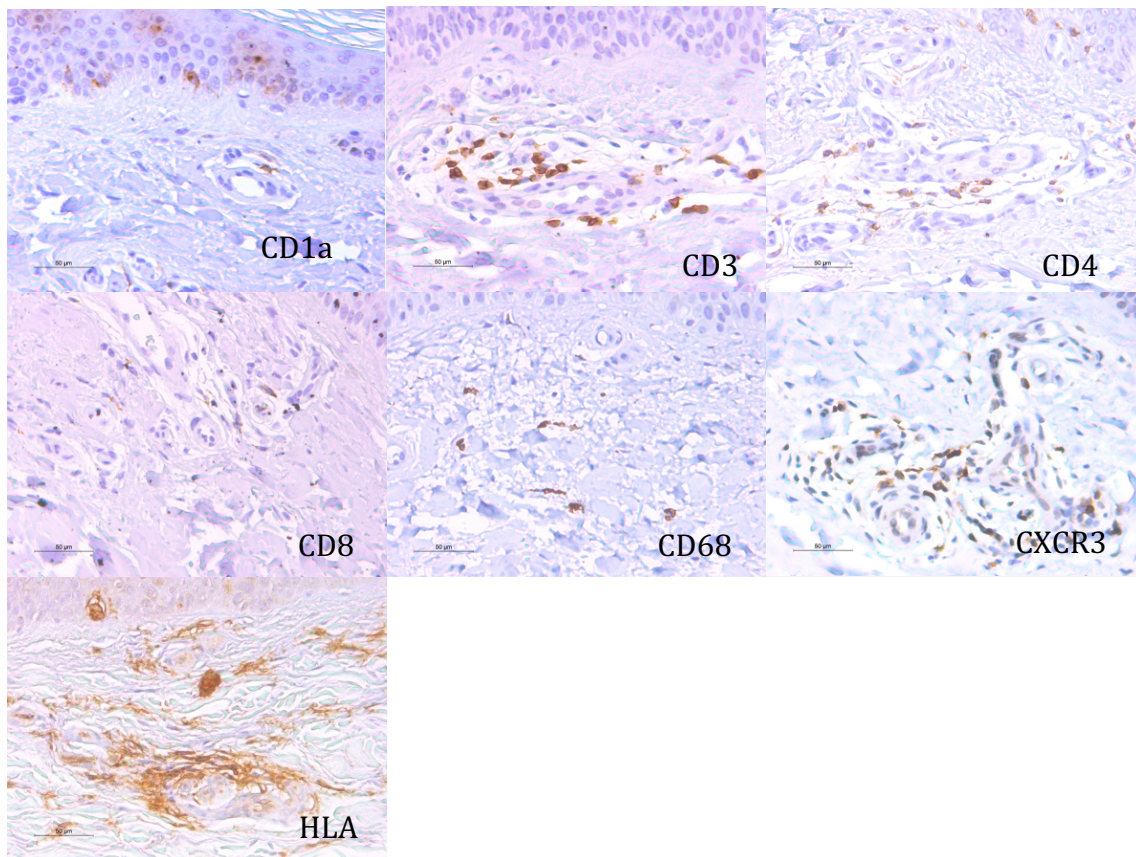


Abbildung 35: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 14 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.15 Patient 15 (Weiblich, 80 Jahre, Kontrollgruppe)

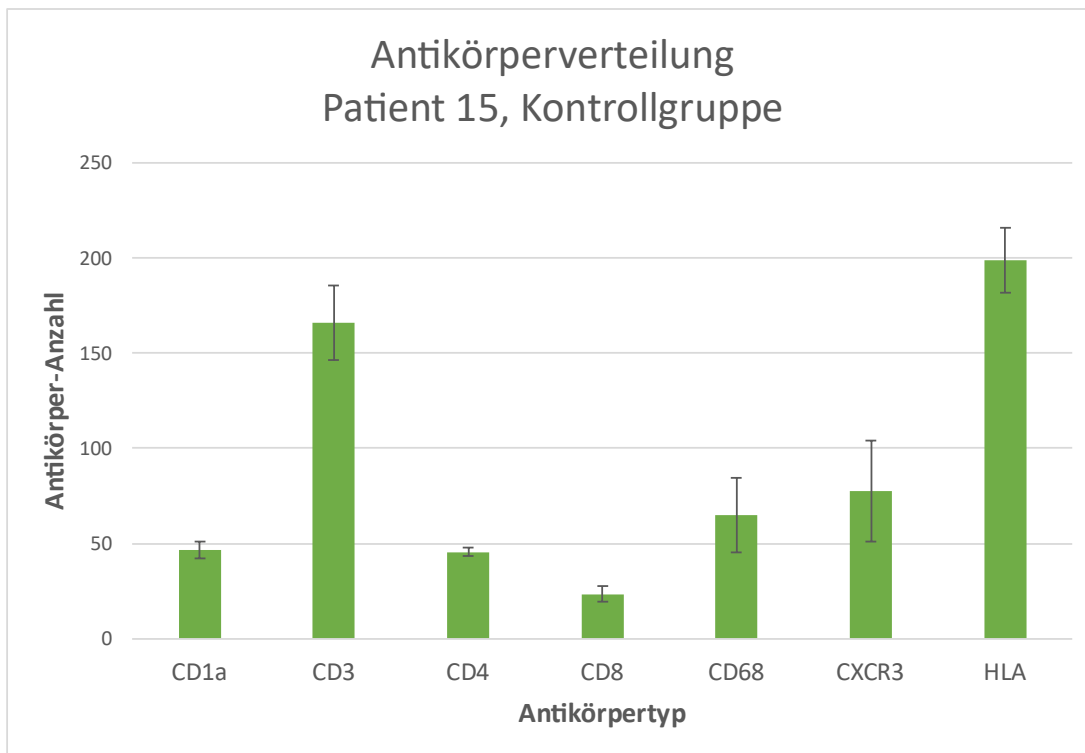
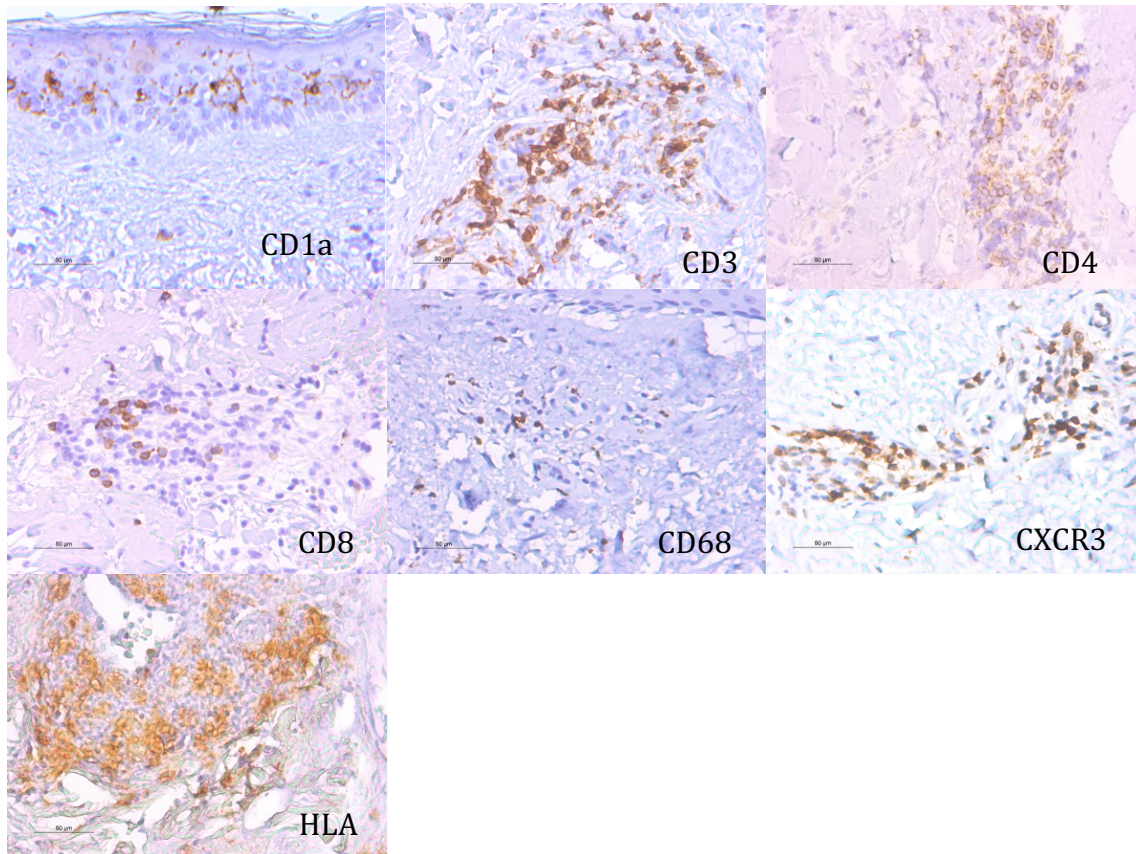


Abbildung 36: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 15 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.16 Patient 16 (Männlich, 76 Jahre, Kontrollgruppe)

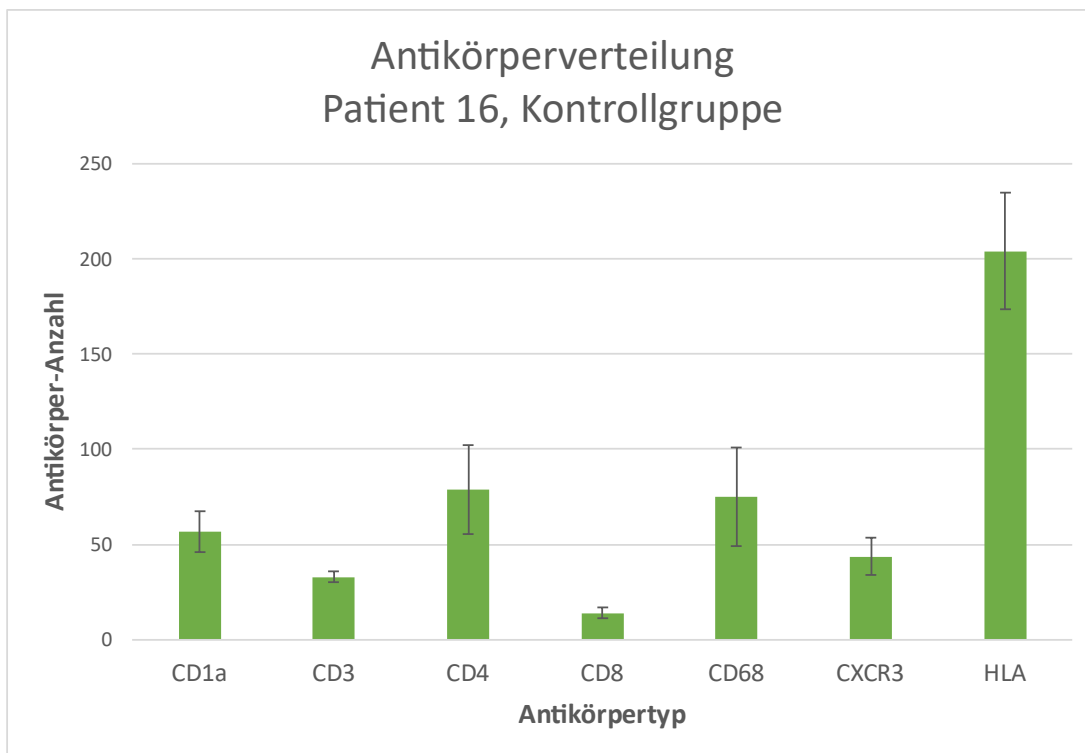
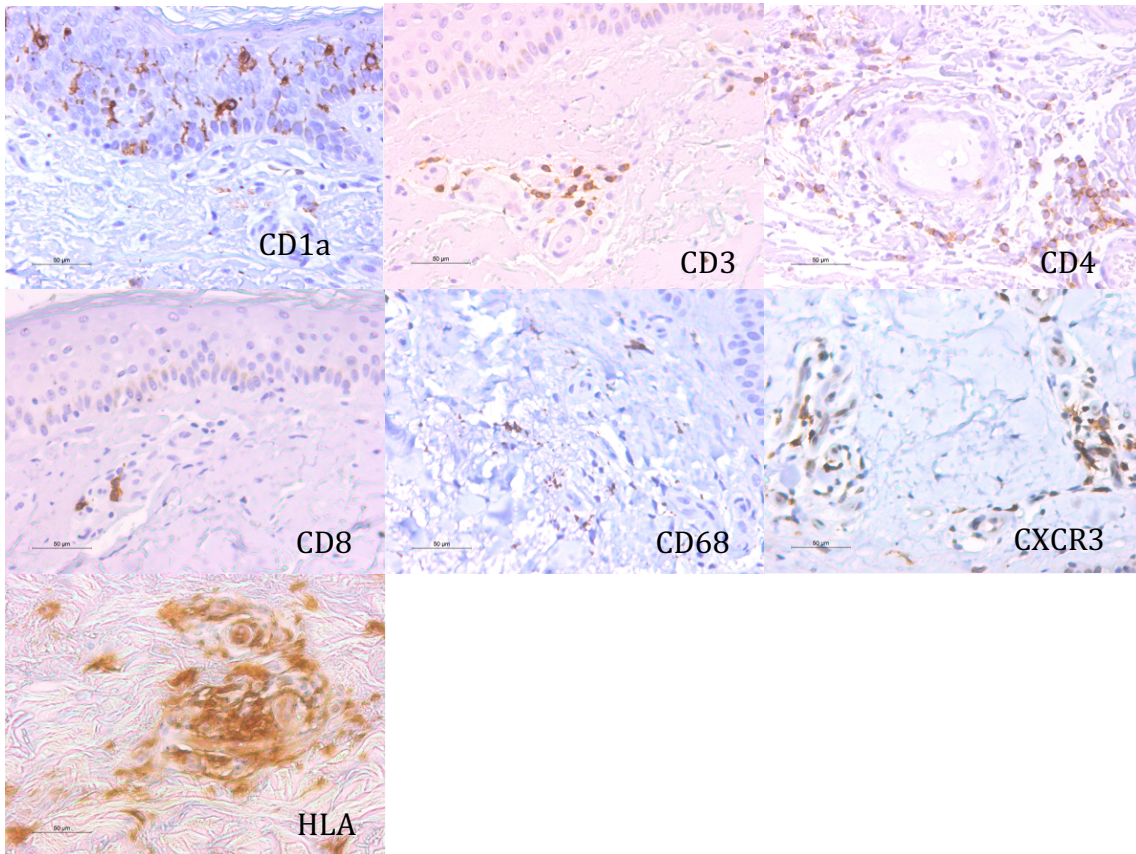


Abbildung 37: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 16 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.17 Patient 17 (Weiblich, 82 Jahre, Kontrollgruppe)

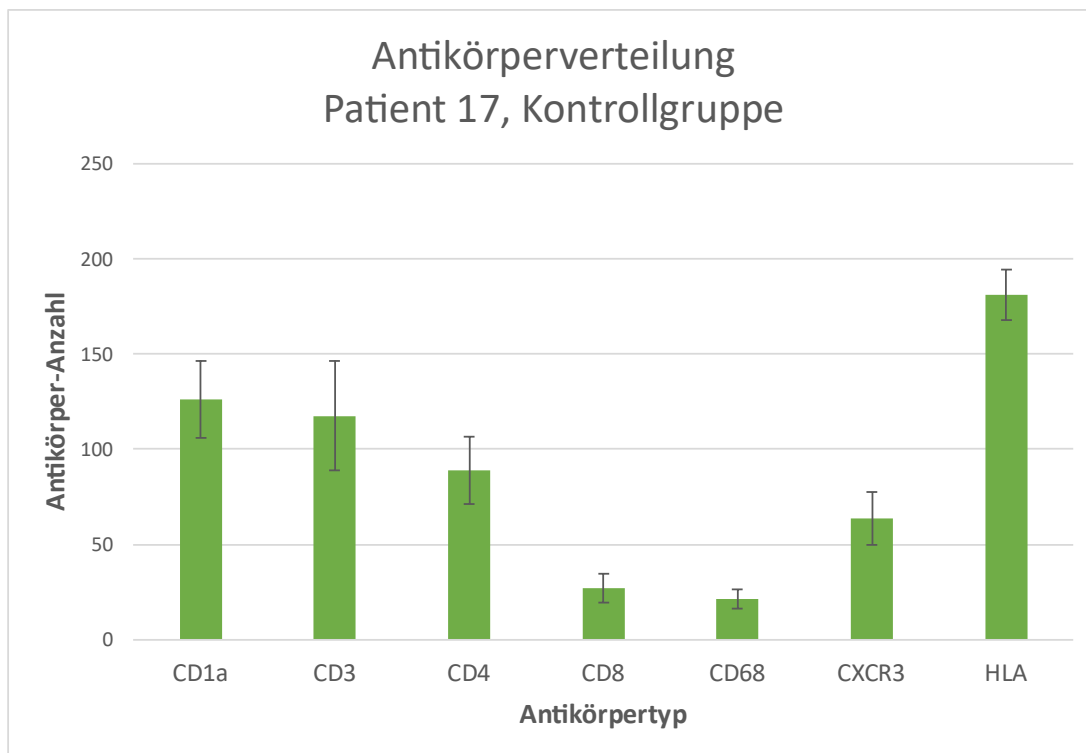
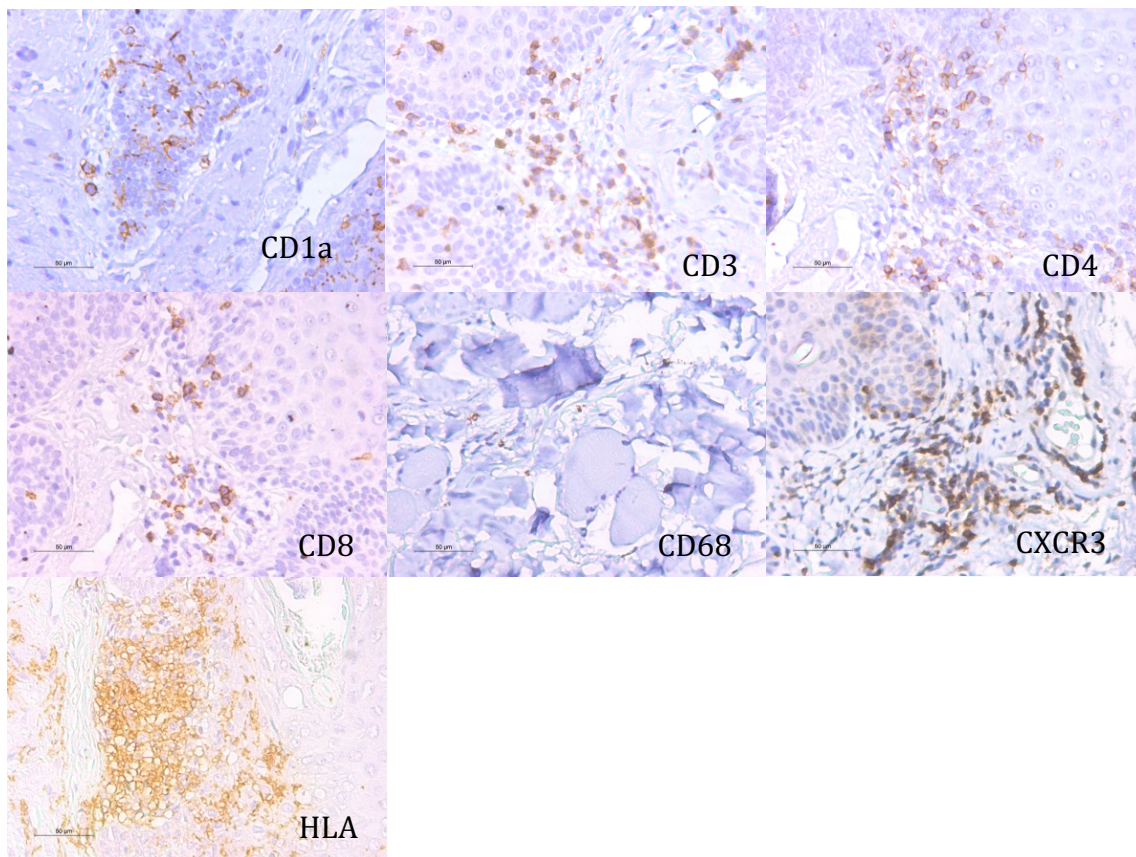


Abbildung 38: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 17 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.18 Patient 18 (Weiblich, 77 Jahre, Kontrollgruppe)

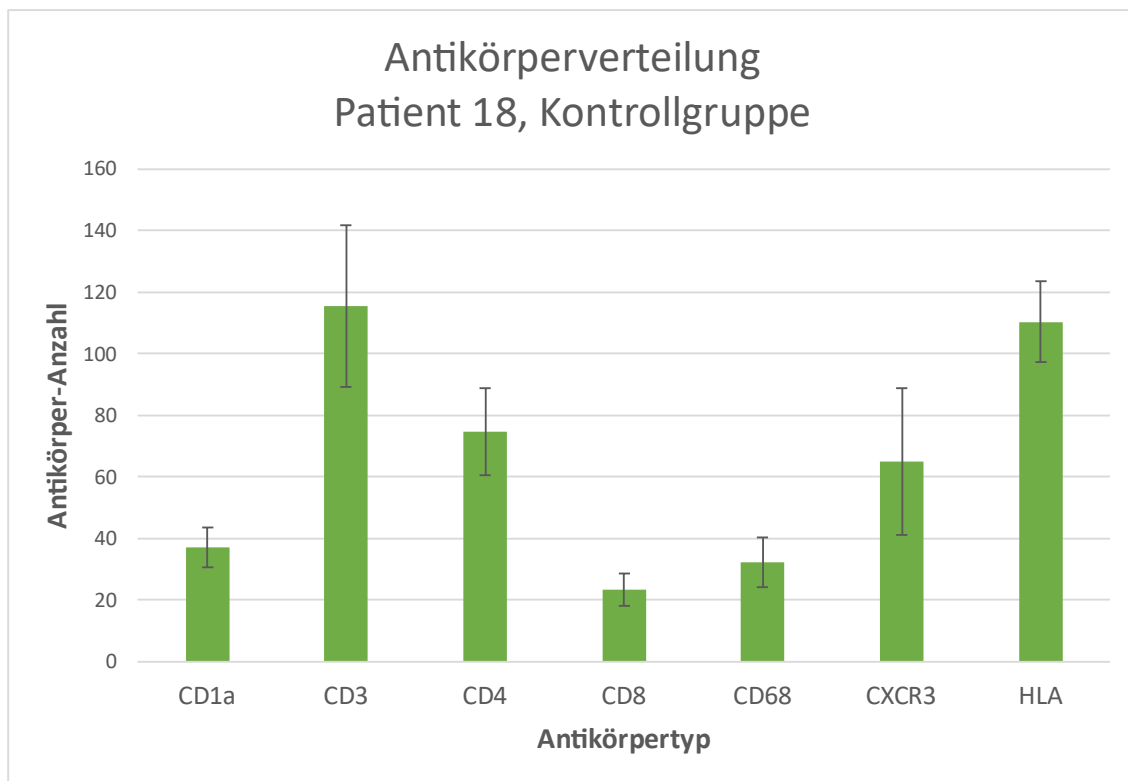
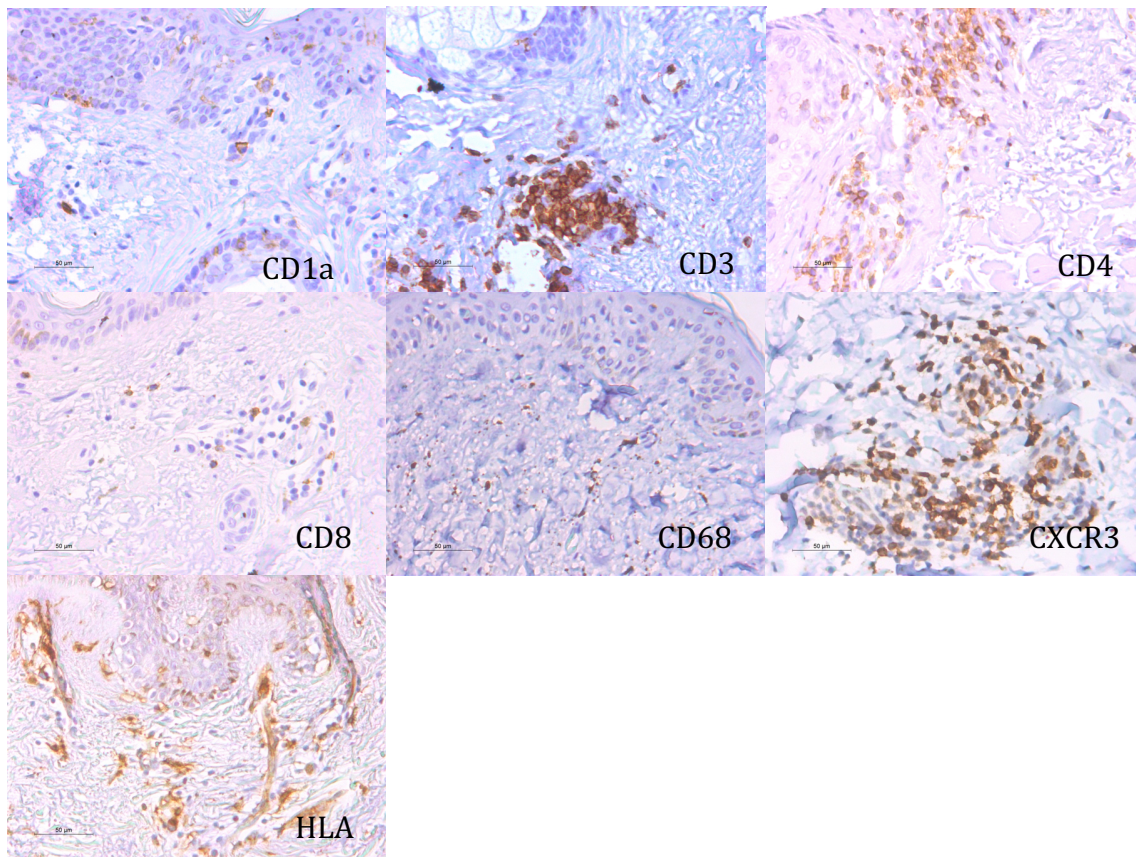


Abbildung 39: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 18 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler

5.2.19 Patient 19 (Männlich, 29 Jahre, Kontrollgruppe)

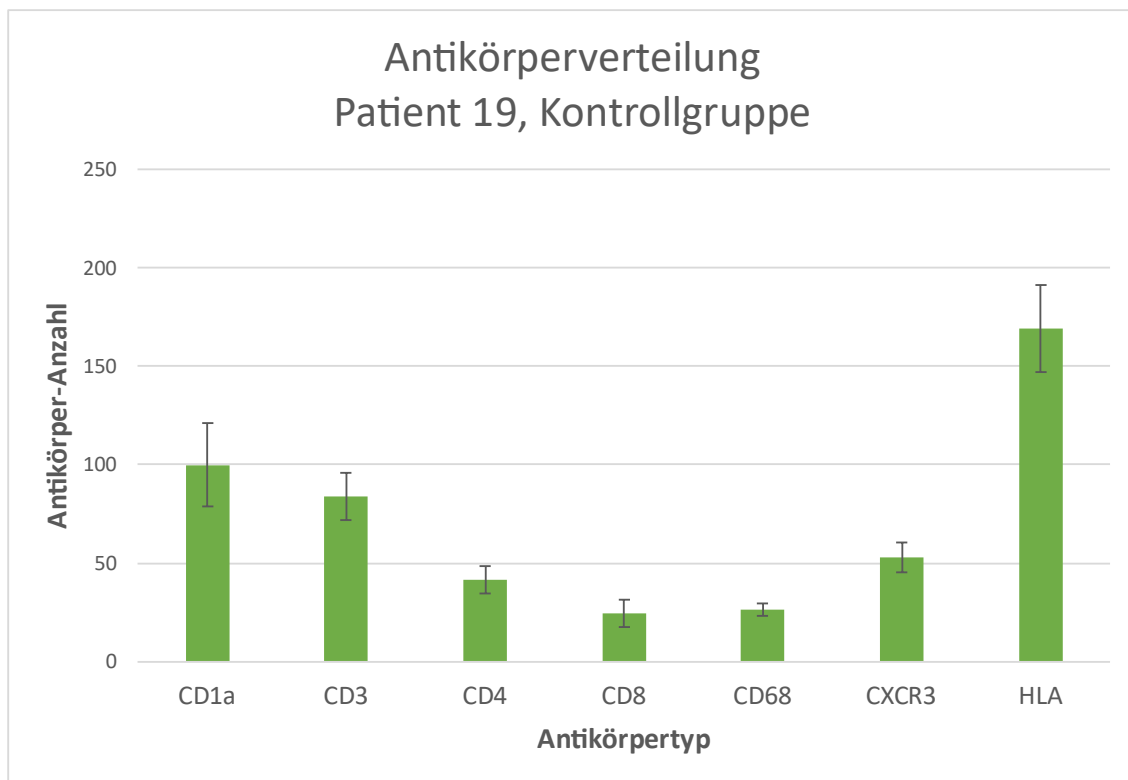
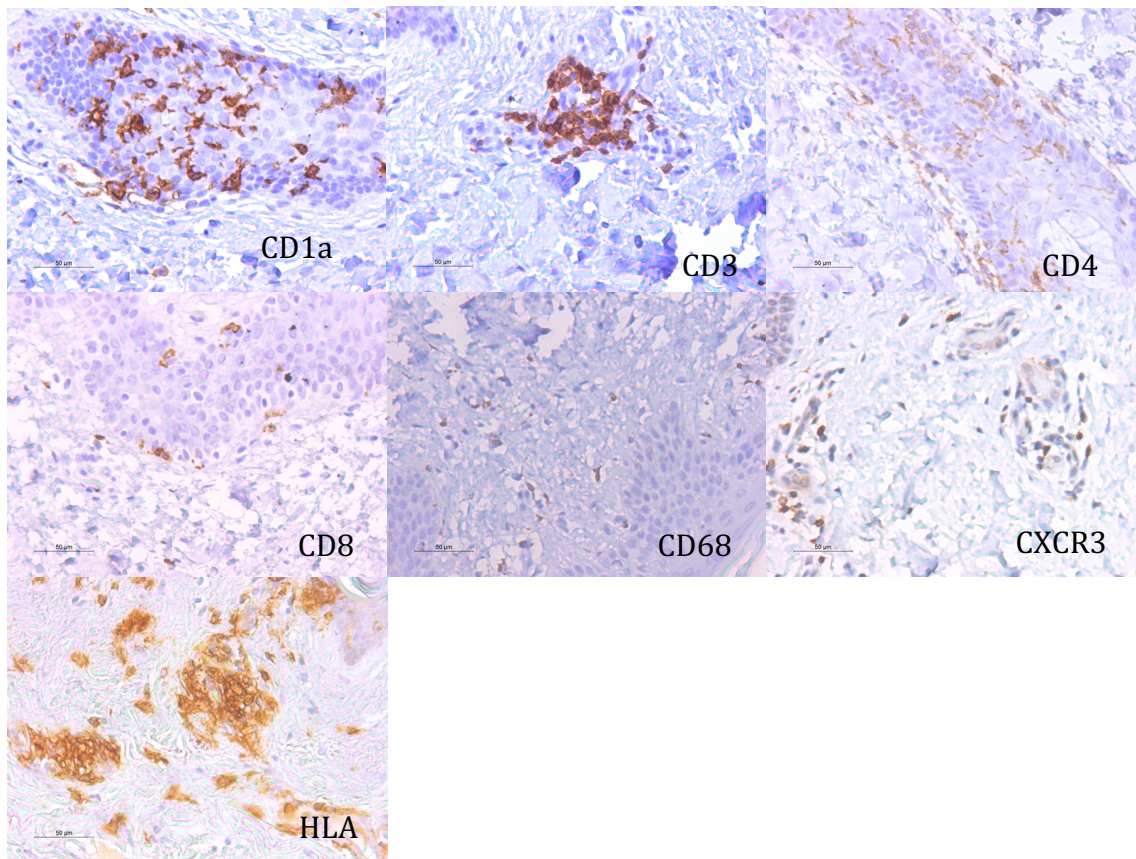


Abbildung 40: Mittelwerte der Antikörper bei Patient 19 mit gesunder Haut, Fehlerindikator: Standardfehler

5.3 Antikörperverteilung: absolute Antikörper-Anzahl

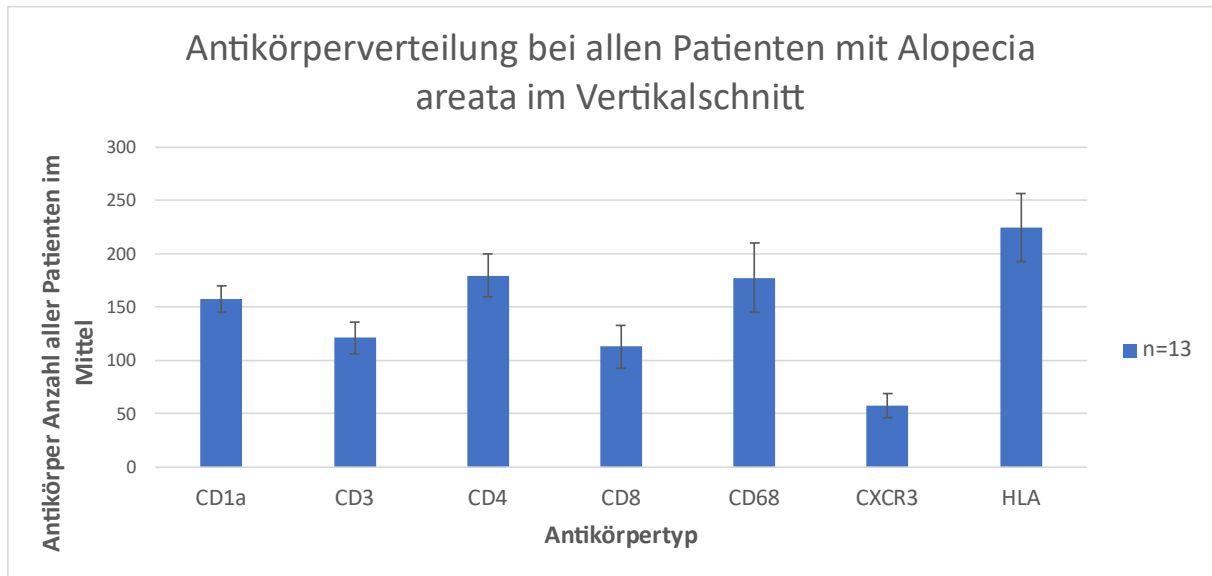


Abbildung 41: Häufigkeit der Antikörper bei n=13. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Vertikalschnitt

Antikörperverteilung Heatmap

	CD1a	CD3	CD4	CD8	CD68	CXCR3	HLA
P1	155,4	127,4	152,4	83,6	119,6	68,6	254,6
P2	138,8	68,6	96,2	33,2	87,4	13,6	68,8
P3	211,8	130,4	199,6	122,4	193,4	70,8	292
P4	130,4	245	345,8	279,4	369,2	100,6	374,6
P5	81,8	45,4	127	41	58,4	33,4	115,4
P6	207,4	149,8	195,4	180,6	233	39,4	302,4
P7	221,4	157,6	145,4	98,2	128,8	40,8	121,2
P8	189,4	171,2	236	174,8	296	118	323
P9	200,6	140,2	250,2	148,2	212,4	93	189
P10	88,8	67	126,6	31	77,8	9,4	168,8
P11	149,8	112,2	217	131,6	388,2	19,8	400
P12	130,2	64,6	68	24,6	56,8	15,2	52,6
P13	140,8	97,4	175,6	117,6	88,4	126	257,6

Abbildung 42: Heat-Map der Antikörperauszählung. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Vertikalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

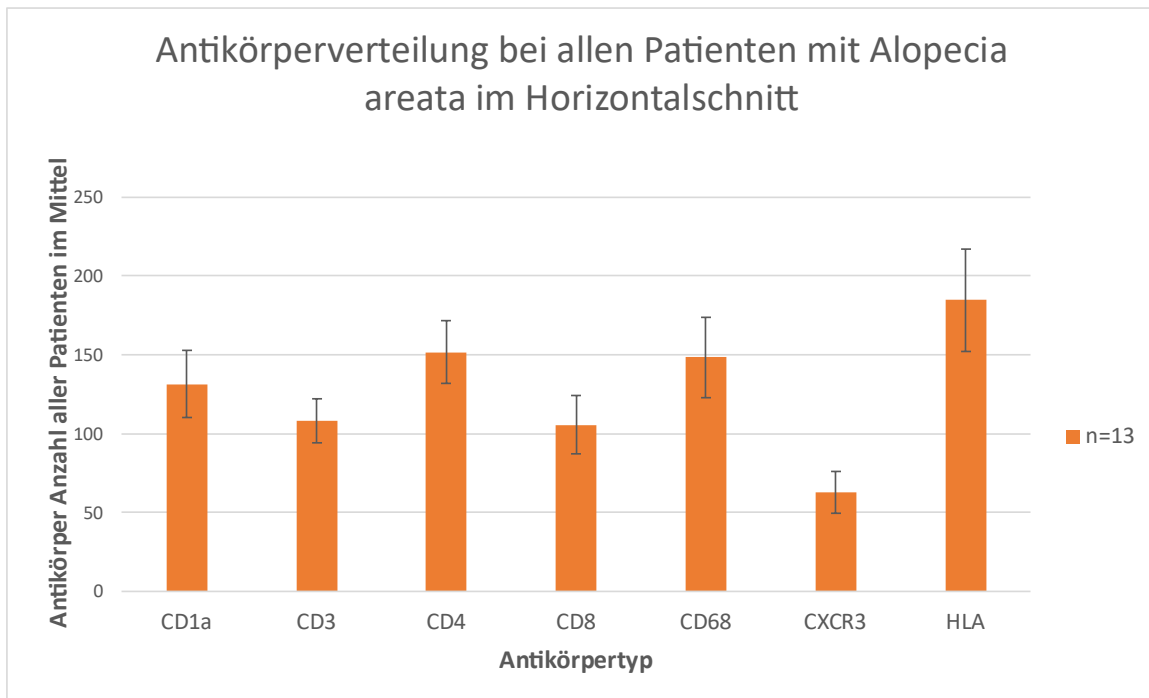


Abbildung 43: Häufigkeit der Antikörper bei n=13. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Horizontalschnitt

Antikörperverteilung Heatmap

	CD1a	CD3	CD4	CD8	CD68	CXCR3	HLA
P1	156,8	173,8	136,2	197	200	85,2	220,2
P2	169,6	87,6	102	39	57,8	16,2	57,6
P3	234,6	165,6	258,4	107,6	215,6	127	318,4
P4	191,6	145	185	143,6	246,8	80,2	163
P5	10,2	18,8	22,6	11,8	14,2	11,2	31,4
P6	210	158,8	188,6	168,2	235	48,2	276,6
P7	111,6	115,2	157,4	144,4	93,4	82,2	177,8
P8	142,8	144,2	202,4	210	214,6	113	294,8
P9	212,4	113,6	265,4	107,2	246,8	51,2	317,8
P10	45	64,8	99	39,6	40,4	25,8	39,4
P11	29,2	69,8	102,8	61	72,4	10	150,2
P12	40,8	32,6	66	19,8	56	15,4	26,2
P13	154,6	111,6	184	122,8	237,6	151	328

Abbildung 44: Heat-Map der Antikörperauszählung. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA im Horizontalschnitt, Fehlerindikator: Standardfehler

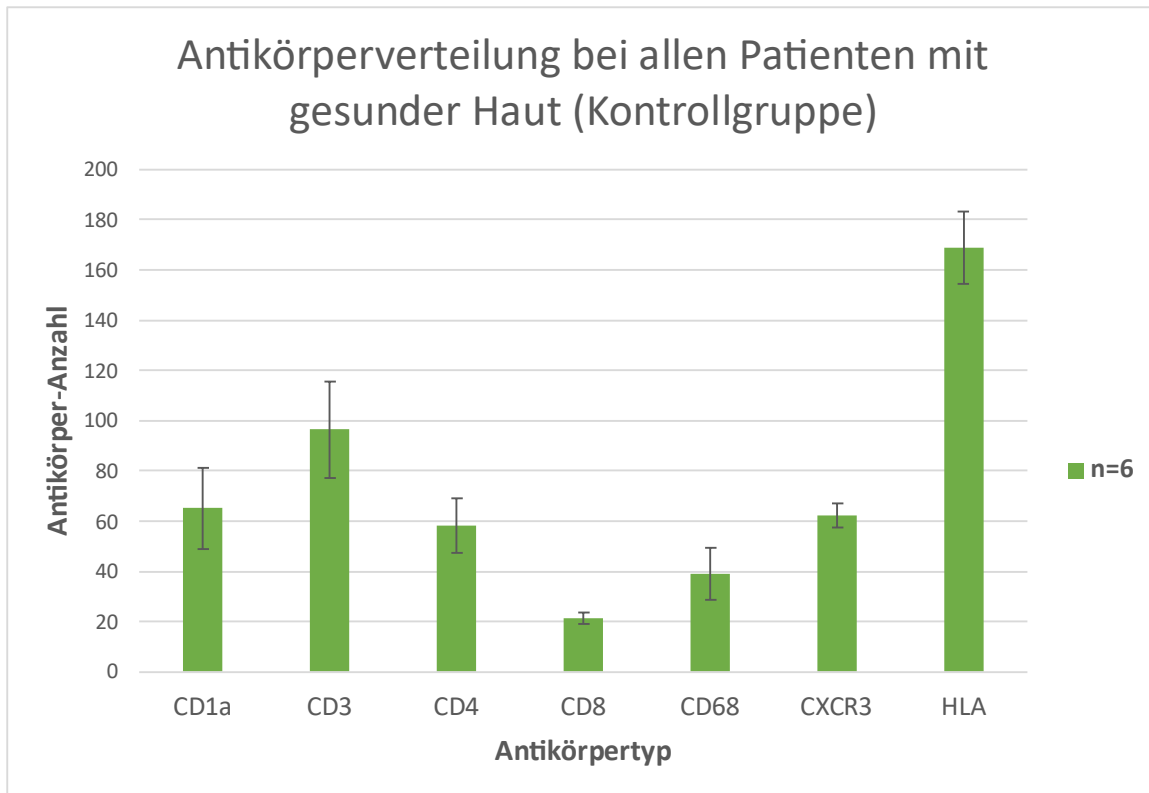


Abbildung 45: Häufigkeit der Antikörper bei n=6. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit gesunder Haut (Kontrollgruppe)

5.4 Gegenüberstellung der Auszählungen: Alopecia areata vs. Kontrollgruppe

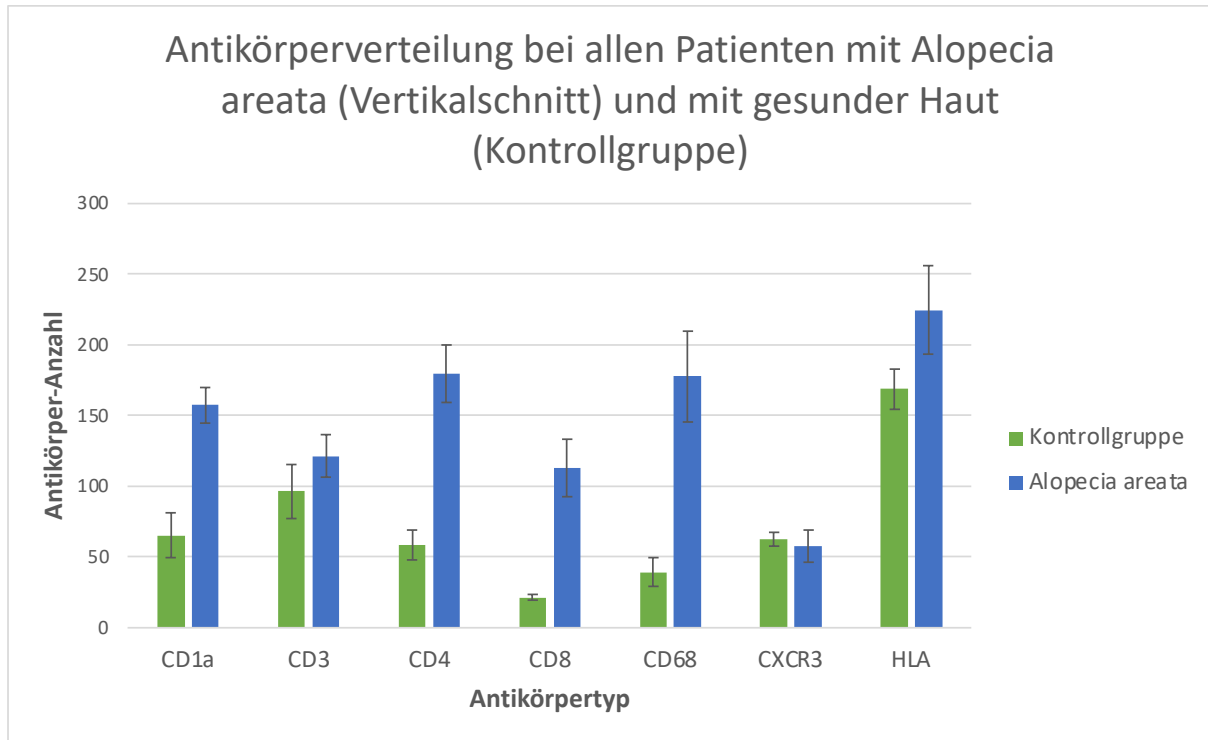


Abbildung 46: Antikörperauszählung. Gegenübergestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Antikörper bei allen Patienten mit AA und der Kontrollgruppe mit gesunder Haut; Fehlerindikator: Standardfehler

T-Test: Alopecia areata vs gesunde Haut

p-Value		
CD1a	0,0008206	signifikanter Unterschied
CD3	0,3304538	kein signifikanter Unterschied
CD4	6,9982E-05	signifikanter Unterschied
CD8	0,0007449	signifikanter Unterschied
CD68	0,0010088	signifikanter Unterschied
CXCR3	0,7123014	kein signifikanter Unterschied
HLA	0,1278727	kein signifikanter Unterschied

Abbildung 47: T-Test (Signifikanz der Unterschiede bei Patienten mit Alopecia areata und gesunden Patienten)

6. Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Biopsien der Kopfhaut von 13 Patientinnen im Alter vom 18 bis 74 Jahren der Haut- und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz analysiert, bei denen Alopecia areata diagnostiziert wurde.

Eine zweite Patientengruppe, bestehend aus sechs Patienten mit gesunder Haut, diente als Kontrollgruppe.

Die Biopsien wurden mit sieben verschiedenen Antikörpern immunhistochemisch gefärbt. Die an der Immunreaktion beteiligten Zellen wurden durch ein automatisiertes computergestütztes Programm ausgezählt und die Mittelwerte der Antikörperauszählung analysiert. Die Ergebnisse beider Patientengruppen wurden miteinander verglichen.

Die Auszählung der Antikörper der an AA erkrankten Patientengruppe ergab folgende Häufigkeitsverteilung in absteigender Reihenfolge: HLA-DR, CD4, CD68, CD1a, CD3, CD8, CXCR3.

Bei der Kontrollgruppe ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung in absteigender Reihenfolge: HLA-DR, CD3, CD1a, CXCR3, CD4, CD68, CD8.

Beim Vergleich beider Patientengruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei vier der sieben getesteten Antikörper: CD4, CD8, CD1a, CD68.

6.2 Diskussion der Methoden

Die Proben der AA-Patienten wurden vom Occipitalbereich des Kopfes entnommen. Vor der Probeentnahme erfolgte eine mündliche und schriftliche Aufklärung über die Risiken und Folgen einer Stanzbiopsie. Die Probeentnahme erfolgte mittels einer 5mm-Stanze, wobei darauf geachtet wurde auch Bereiche mit vereinzelt Kopfharen miteinzubeziehen. Bei Probanden mit AT konnten keine Haare in die Probe miteingebracht werden.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach dem Färbeprotokoll der Hautklinik der JGU Mainz. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop vom Typ Leica DMIL mikroskopiert. Dabei verglich man zunächst die jeweilige Gewebeprobe

mit einer Negativkontrolle, um fälschlich gefärbte Gewebeareale zu selektieren. Danach wurden die fünf reaktionsreichsten Areale bei 20-facher Vergrößerung mit einer Kamera vom Typ DFC295 und mithilfe der Leica Application Suite Software abfotografiert.

Die Bilddateien wurden mittels computergestütztem Verfahren (ImageJ mit Plugin ImageJ IHC-Profilier) analysiert und die darin befindlichen positiv angefärbten Zellen ausgezählt.

In der graphischen Darstellung der quantitativen Auswertung findet sich für jeden Antikörper jeweils der Mittelwert aus den Werten der fünf Gesichtsfelder. Zusätzlich wurde für jede Färbung der Standardfehler des Mittelwertes über alle Antikörper je Gewebeschnitt ermittelt.

Durch die automatisierte Auszählung kommt es zu einem deutlichen Zeitgewinn im Vergleich zur manuellen Auszählung und zu einer besseren Standardisierung der Ergebnisauswertung, da die Ergebnisse reproduzierbar sind. Im Vergleich zur manuellen Auszählung können menschliche Fehlerquellen wie Ablenkung und Ermüdung durch die computergestützte automatisierte Auszählung vermieden werden. Durch die erhöhte Geschwindigkeit der Auszählung kann zudem eine größere Anzahl von Biopsien und Antikörpern untersucht werden. Dadurch kann die Anzahl an ausgezählten Zellen wesentlich erhöht und die statistische Unsicherheit verringert werden, wodurch es zu genaueren Ergebnissen kommt.

Eine Limitation bei dieser Untersuchung ist die Anzahl der Gesichtsfelder pro Gewebeschnitt. Die fünf ausgewählten Areale mit den nach subjektivem Empfinden am stärksten gefärbten Zonen stehen repräsentativ für die gesamte Probe. Dieser subjektive Faktor kann zur Abschwächung der Resultate geführt haben, da Bereiche mit überall verteilten Antikörper-Antigen-Reaktionen stärker in die Zählung eingehen als Bereiche mit einem einzigen Reaktionsfokus. Um bessere Ergebnisse erzielen zu können, sollten daher bei zukünftigen Studien die histologischen Präparate auf Objektträgern in Whole Slide Images (WSI) digitalisiert werden, um die gesamte gefärbte Probe in die Auszählung miteinbeziehen zu können.

Auch bei der Qualität der Bilddateien der verschiedenen Biopsien kann es zu Unterschieden kommen, umso wichtiger ist die Anpassung der Farbeinstellung des Programmes ImageJ um Fehlerquellen zu vermeiden.

Resümierend ist zu sagen, dass durch die computergestützte Auszählung mit geringerem Zeitaufwand eine deutlich größere Anzahl an Biopsien untersucht

werden kann als bei alternativen Auszählungsmethoden, was genauere Ergebnisse und einen größeren Umfang zukünftiger Arbeiten ermöglicht.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

- 1. Welche Entzündungszellen kommen in den Biopsien der Patienten mit AA am häufigsten vor und in welchem Verhältnis stehen die verschiedenen Entzündungszellen zueinander?*

Zellmorphologie

Zellen tragen auf ihrer Oberfläche spezielle Merkmale. Meist handelt es sich dabei um membrangebundene Glykoproteine, die sich hinsichtlich ihres Immunphänotyps nach biochemischen und funktionellen Eigenschaften ordnen lassen. Diese Oberflächenmerkmale sind oft zellspezifisch und können mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden, was Rückschlüsse auf bestimmte Zellansammlungen ermöglicht. Unter Cluster of Differentiation (CD) sind die Oberflächenmerkmale zusammengefasst. (49)

HLA-DR (Humanes Leukozyten Antigen)

HLA-DR war der am häufigsten nachgewiesene Marker im Patientenkollektiv. HLA-DR ist ein Allel der MHC-II Moleküle, das mit CD4⁺-Zellen interagiert.

Im sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf dem humanen Chromosom 6 werden HLA-Oberflächenmoleküle kodiert, die zur Antigenpräsentation für die Lymphozyten dienen. (50) Das humane Leukozytenantigen (HLA) spielt eine zentrale Rolle im humanen Immunsystem, vor allem im Rahmen der Transplantationsforschung. Über das HLA unterscheidet das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. (51)

Das HLA-System wird in zwei Klassen unterteilt (MHC-I und MHC-II): Die Region der Klasse-I-Gene kodiert die HLA-Merkmale HLA-A, -B und -C, welche die Antigene für die CD8⁺-T-Zellen präsentieren. MHC-I Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Die MHC-II-Moleküle heißen HLA-DR, -DP und -DQ und werden nur auf speziellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, darunter dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen. (49) Die HLA-Klasse-2-Moleküle präsentieren phagozytierte und verarbeitete Antigenepitope den CD4⁺T-Helferzellen.

Im gesunden Haarfollikel werden keine MHC-Moleküle exprimiert, erst der Verlust des Immunprivilegs führt zur vermehrten Präsentation von Haarfollikelantigenen über MHC-Oberflächenmoleküle. (52)

Die höchsten Werte für HLA-DR kamen bei Patientin 8 vor. Die Ergebnisse von Patientin 8 und Patientin 12 lagen sehr weit auseinander (323:52,6 im Vertikalschnitt) trotz sehr ähnlichem klinischen Bild mit komplettem Verlust des Kopfhaares. Auch bei Patientin 2 zeigte sich eine eher geringe Färbung des HLA-DR Markers.

GWAS sehen den HLA-DR Marker als den entscheidenden Einflussfaktor in der Pathogenese der AA an, vor allem die Aktivierung der CD4⁺-Zellen durch die Antigenpräsentation der MHC-Klasse-2-Moleküle. (53)

CD4

Die zweithäufigste Färbungsreaktion wurde mit CD4 beobachtet. CD4 dient als Marker für Monozyten, Makrophagen und T-Helferzellen und erkennt als Co-Rezeptor die von Körperzellen exprimierten MHC-Klasse-2-Komplexe.

T-Helferzellen machen 30- 60% aller Lymphozyten aus und sind an der weiteren Aktivierung des Immunsystems beteiligt. CD4⁺-T-Helferzellen können in verschiedene Subtypen (Th1, Th2, Th17) mit bestimmten Effektoreigenschaften differenzieren. Sie koordinieren die Immunantwort über verschiedene Cytokine und aktivieren so bestimmte Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems oder unterdrücken diese in ihrer Funktion. (50)

Bei Patientin 4 und 9 lagen die höchsten Werte für CD4 vor. Patientin 5 und 12 zeigten bei identischer Klinik die geringste Färbereaktion bei diesem Antikörper.

Die insgesamt hohe Anzahl an gefärbten Antikörpern spricht für die T-Zell vermittelte Autoimmunpathogenese.

CD68

CD68 ist ein Marker für Makrophagen und Monozyten und wurde im Patientenkollektiv am dritthäufigsten angefärbt.

Makrophagen nehmen wahrscheinlich das zugrunde gegangene Zellmaterial auf und präsentieren es Autoantigenen, die zum Einwandern weiterer T-Zellen führen können. (2)

Eine hohe Anzahl an perifollikulären Makrophagen wird in Studien auch an gesunden Anagenhaarfollikeln beschrieben. Möglicherweise haben Makrophagen eine funktionale Rolle in der Kontrolle des Haarwachstums. (54)

CD1a (Langerhanszellen)

Man findet CD1a-Moleküle vorwiegend auf dendritischen Zellen wie Langerhanszellen. Neben der Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle, werden Lipidantigene über CD1-Moleküle präsentiert, die in ihrer Struktur Ähnlichkeit zu MHC-I-Molekülen besitzen. CD1-Moleküle werden von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen erkannt.

Als Helferzellen haben sie Einfluss auf die angeborene und adaptive Immunität. (50)

Eine Studie zeigt die signifikant erhöhte Anzahl von LZ in Biopsien von AA-Patienten im Vergleich zu gesunder Haut und gleichzeitig eine Korrelation zu den CD8⁺-Zellen. Eine mögliche Rolle der Langerhanszellen in der Antigenpräsentation und Stimulation der CD8⁺-Zellen wird somit vermutet. (55)

Auch in unserem Patientenkollektiv konnte CD1a relativ häufig nachgewiesen werden. Patientin 3, 6 und 9 hatten die höchsten Werte für CD1a. Bei Patientin 5 und 10 zeigte sich sowohl im Horizontal- als auch im Vertikalschnitt kaum eine Reaktion durch die CD1a-Färbung trotz sehr unterschiedlicher Klinik.

CD3

CD3 ist Bestandteil des T-Zell-Rezeptors und findet sich als Leitmarker auf der Membranoberfläche aller T-Lymphozyten, da es auf anderen Immunzellen nicht vorkommt. Auf MHC-Molekülen präsentierte Antigene werden vom T-Zell-Rezeptor erkannt. (49)

Die Werte für CD3 waren im hier ausgewerteten Patientenkollektiv inhomogen verteilt. CD3-Zellen konnten in ähnlich hoher Anzahl wie CD8-Zellen festgestellt werden. Auch die Färbereaktion der einzelnen Patientenschnitte hatte in der Verteilung der Zellanzahl die größte Ähnlichkeit mit den CD8-Färbungen.

CD8

CD8 ist wie CD4 ein Co-Rezeptor für die T-Zell-Antigen-Bindung. Die cytotoxischen CD8⁺-Zellen erkennen Antigenfragmente zusammen mit MHC-Klasse-I-Molekülen, die auf allen kernhaltigen Körperzellen vorkommen. Ihre Aufgabe besteht darin

infizierte Zellen und Tumorzellen zu töten, indem sie in ihnen den programmierten Zelltod auslösen (Apoptose). (50)

Die Literatur beschreibt eine zentrale Rolle der CD8⁺-Zellen in der Pathogenese der AA, so führte die Depletion von CD8⁺-Zellen im Tiermodell sogar zum Haarwiederwachstum. (45)

Zwar zeigt die Färbung der CD8⁺-Zellen in dieser Analyse eine eher durchschnittliche Reaktion, immunhistologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass sowohl bei Mensch als auch bei Tiermodellen der DEBR der Quotient der CD4/CD8 infiltrierenden Zellen bei 2:1 liegt. Dabei befinden sich die CD4⁺-Zellen vorwiegend perifollikulär, die CD8⁺-Zellen intrafollikulär. (44)

In den Schnitten konnte eine eher heterogene Reaktion mit diesem Antikörper beobachtet werden. Patientin 4 verzeichnete im Vertikalschnitt dabei den mit Abstand höchsten Wert an CD8⁺-Zellen, Patientin 1 und 8 jeweils im Horizontalschnitt. Bei allen drei Probandinnen konnten deutliche peribulbäre lymphozytäre Infiltrate festgestellt werden. Kaum angefärbte Zellen zeigten wiederum die Schnitte der Patienten 2, 5, 10 und 12.

CXCR3 (CD 183)

CXCR3 ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren und findet sich an der Oberfläche von TH1-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (56). Der CXCR3-Rezeptor wird stimuliert durch die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 und lenkt die Th1-zellvermittelte Immunantwort. (57)

Neueste Studien schreiben CXCR3 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Vitiligo und Psoriasis zu und sehen ihn als therapeutisches Ziel für die Entwicklung neuer Arzneistoffe.

Welche Bedeutung CXCR3 im Pathomechanismus der AA spielt, ist noch nicht hinreichend geklärt: Eine Studie aus dem Jahr 2016 fand heraus, dass die Chemokine CXCL9/10/11 und ihr Rezeptor CXCR3 in Hautläsionen von AA Patienten erhöht sind und die Blockade des CRXC3-Rezeptors hemmende Wirkung auf die Anreicherung von zytotoxischen T-Zellen zu haben scheint. (56)

CXCR3 wurde im vorliegenden Patientenkollektiv am seltensten nachgewiesen. Nur bei Patient 13 konnten größere Zellzahlen beobachtet werden.

2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Entzündungsmarker und der klinischen Ausprägung der Erkrankung?

Bei vier Probanden des Patientenkollektives (Patient 2, 5,10,12) fiel die Färbung der verschiedenen Antikörper eher gering aus. Besonders die Biopsien von Patientin 5 zeigten im Horizontalschnitt kaum Antikörperfärbung. Es konnten in den Biopsien kaum bis mäßige peribulbäre lymphozytäre Infiltrate festgestellt werden. Interessanterweise hatten die Patientinnen 2, 5 und 12 klinisch eine stärkere Ausprägung des Haarausfalles und waren zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme fast haarlos (AA fere totalis). Patientin 10 hingegen zeigte klinisch nur einzelne befallene Herde.

In der Literatur wurden keine wesentlichen Unterschiede im histologischen Erscheinungsbild zwischen Proben von AT, AU und AAP Patienten angeführt, trotzdem wurde beschrieben, dass die Erkrankungsdauer Auswirkung auf die Größe des peribulbären Infiltrates haben kann. So wurden in akuten Stadien verhältnismäßig mehr inflammatorische Zellen gefunden als in chronischen Fällen. (27)

Auch im Patientenkollektiv erkennt man keinen signifikanten Einfluss des Ausmaßes des Haarverlustes auf die histopathologischen Merkmale der AA. Diese scheinen eher mit dem Erkrankungsstadium (akute, subakute, chronische oder Genesungsphase) zusammenzuhängen. So sieht man bei Patientin 8 mit AAT und kompletten Haarverlust der Kopfhaut in den Biopsien Anschnitte von Haarfollikeln und kräftige peribulbäre Infiltrate. Bei Patientin 2 mit AAT nur einzelne Haarfollikelanschnitte und kaum entzündliche Infiltrate trotz identischer klinischer Merkmale.

Auch Patientin 10 und 13 weisen ein ähnliches klinisches Bild auf, doch erkennt man bei Patientin 10 eine deutlich geringere Färbereaktion in den Präparaten.

Sowohl Vertikal- als auch Horizontalschnitte werden zur Diagnostik der AA genutzt. Beide Schnittmethoden haben Vor- und Nachteile für die Diagnose der AA.(58, 59) Einige Studien beschreiben, dass Vertikalschnitte der Hautbiopsien weniger Haarfollikelanschnitte enthalten und darum Horizontalschnitte für die Diagnose der AA bevorzugt werden sollten. (60, 61) Das peribulbäre Lymphozyteninfiltrat als charakteristisches histopathologisches Merkmal der AA tritt oft im Akutstadium der Erkrankung auf, kann jedoch in chronischen Erkrankungsstadien gänzlich fehlen.

(27) Dennoch kann das Infiltrat sowohl in horizontalen als auch in vertikalen Anschnitten gefunden werden. (59, 60) In unserer Auswertung sind die Auszählungen der gefärbten Antikörper im Horizontal- und Vertikalschnitt sehr ähnlich, wobei erkennbar ist, dass bei allen Antikörperreaktionen in den Vertikalschnitten eine leicht größere Zellzahl angefärbt wurde.

Es zeigte sich insgesamt eine große Streuung der Ergebnisse. Zwar gab es deutliche Unterschiede zwischen der Häufigkeitsverteilung verschiedener Antikörper, jedoch keine Antikörperfärbung die bei allen Patienten annähernd gleich ausgefallen ist. Dieses Ergebnis könnte durch die Größe des Patientenkollektivs bedingt sein.

3. Welche Rückschlüsse können aus dem Vergleich der Biopsien der Patienten mit AA und den Biopsien der gesunden Patienten geschlossen werden?

Die Datenerhebung dieser Studie weist eine höhere Zellpopulation von Cd1a und CD68 Zellen bei erkrankten Patienten auf.

Makrophagen sind eher perifollikulär lokalisiert und nehmen ähnlich den CD4⁺-Zellen Helferfunktion ein, indem sie zugrunde gegangenes Zellmaterial aufnehmen und Autoantigene präsentieren. (2, 54)

Langerhanszellen kommen in der Wulstregion des Haarfollikels vor und stehen in Beziehung zu peripheren Nerven. Sie sind antigenpräsentierende Zelle, die immunologisch aktive Moleküle und verschiedene Neuropeptide exprimieren. (62) In einer Studie wird der Anstieg an Langerhanszellen neben CD8⁺-Zellen beobachtet und deutet auf eine mögliche Rolle der LZ in der Antigenpräsentation und Stimulation der CD8⁺-Zellen bei AA hin. (55, 63)

Die vorliegende Auswertung zeigt außerdem eine signifikante Expressierung von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen bei AA Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies deutet auf die T-zellvermittelte Pathogenese der AA hin:

Histologisch zeigt sich ein charakteristisches Bienenschwarmähnliches Entzündungsinfiltrat aus CD8⁺-, CD4⁺ T-Zellen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen in AA Läsionen. (64)

Zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten sind intrafollikulär lokalisiert und führen zur Schädigung des Haarfollikels, wohingegen CD4⁺-Zellen eher perifollikulär anzufinden sind und als Helferzellen agieren. (65, 66)

CD8⁺-Zellen sind weniger zahlreich als CD4⁺-Zellen, aber ihre Fähigkeit in intrafollikuläre Strukturen vorzudringen ermöglicht größere Schädigung.(65)

Studien an Tiermodellen unterstützen die Rolle autoreaktiver T-Zellen an der Pathogenese der AA (67): so ermöglicht die Depletion von CD4⁺- und CD8⁺ -Zellen in Maus und Rattenmodellen Haarwiederwachstum. (45, 68)

Daher wird davon ausgegangen, dass CD8⁺-Zellen die AA Pathogenese fördern und als zytotoxische Effektoren für die Autoimmunattacke auf die Haarfollikel verantwortlich sind. (69)

Der Haarfollikel ist bei gesunden Menschen ein immunprivilegiertes Organ und wird durch mangelnde MHC-Expression vor auto-inflammatorischen Vorgängen geschützt. (2) Noch unbekannte auslösende Faktoren tragen bei AA zum Kollaps des HF Immunprivilegs bei und aktivieren lokal das angeborene Immunsystem, vor allem über NKG2D⁺ Zellen, was zu einer anschließenden Interferon-Produktion (IFN- γ) und MHC-Klasse-I-Hochregulierung führt, die den Zusammenbruch des IP weiter verstärken. (64, 70) Es wird vermutet, dass die Hochregulierung von MHC -I die Autoimmunattacke der CD8⁺-Zellen erleichtert. (71)

Die Pathogenese der AA ist verbunden mit der Aktivierung von Zellen sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems und der Störung des Haarfollikels durch Ausbreitung der Zellen in peri- und intrafollikuläre Regionen.

Mehrere Studien beschreiben, dass die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen grundlegend erforderlich sind, um AA einzuleiten und aufrechtzuerhalten.

Der initiale Auslöser, die involvierten Autoantigene und der molekulare Signalweg bedürfen noch genauerer Erforschung. (65)

7. Zusammenfassung

Die Alopecia areata ist eine seltene, akut einsetzende, T-zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die zu kreisrundem Haarausfall unterschiedlicher Ausprägung führt. Das klinische Erscheinungsbild ist vielfältig und der Krankheitsverlauf weitgehend unvorhersehbar. Die genauen Ursachen der Erkrankung bleiben trotz zahlreicher Studien unzureichend geklärt, da man von einem sehr komplizierten, multifaktoriellen Pathomechanismus ausgehen muss. Vermutet wird jedoch ein Verlust des Haarfollikel-Immunprivilegs und ein dadurch verursachter Lymphozytenangriff auf die Haarfollikel, welcher zu oben genanntem Haarverlust führt. An AA erkrankte Patienten leiden häufig sehr unter diesem, vor allem unter dem negativen Einfluss dessen auf ihre Lebensqualität. Bereits bekannte Behandlungsstrategien und verfügbare Medikamente eignen sich eher für milde Verläufe, im Allgemeinen bleibt die Rezidivrate hoch. Alopecia areata ist demnach weiterhin eine unheilbare Erkrankung, obwohl sie seit Jahren erforscht wird. Den exakten Pathomechanismus des Haarverlustes zu verstehen bleibt damit von größter Bedeutung um neue Therapieoptionen entwickeln und den Betroffenen langfristig helfen zu können.

In der vorliegenden Studie wurden Immunzellarten untersucht, die Rückschlüsse auf deren Beteiligung am Pathomechanismus der AA ermöglichen sollen. Dazu wurden Biopsien der Kopfhaut von 13 AA-Patienten nach immunhistochemischer Vorbehandlung mit sieben verschiedenen Antikörpern durch eine computergestützte Auszählung analysiert und mit Hautproben gesunder Patienten verglichen. Die direkte Gegenüberstellung beider Auszählungen zeigte bei vier der getesteten Antikörper (CD4, CD8, CD68 und CD1a) eine signifikant höhere Expression in den erkrankten Hautproben. Die erhöhte CD4- und CD8-Konzentration belegt eine lymphozytär ausgelöste Alopezie und spricht für die T-Zell vermittelte Autoimmunpathogenese, die auf den Verlust des Haarfollikelimmunprivilegs hindeutet. Makrophagen und Langerhanszellen scheinen als Helferzellen ebenfalls eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der Erkrankung zuzukommen.

Zukünftige Untersuchungen zu neuen Therapieansätzen sollten die Wiederherstellung des Haarfollikel-Immunprivilegs für die Behandlung der Alopecia areata als Hauptziel in Betracht ziehen, da hier der Ursprung des Pathomechanismus und damit der effektivste Ansatzpunkt zu vermuten ist.

8. Literaturverzeichnis

1. Altmeyer P. Die Online-Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie und Umweltmedizin [Web Page]. [Available from: <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/alopecia-areata-ubersicht-370>].
2. Freyschmidt-Paul P, Happle R, Hoffmann R. [Alopecia areata. Clinical aspects, pathogenesis and rational therapy of a T-cell-induced autoimmune disease]. *Hautarzt*. 2003;54(8):713-22.
3. Moll I. *Duale Reihe- Dermatologie*: Thieme; 2016.
4. Wolff H, Fischer TW, Blume-Peytavi U. The Diagnosis and Treatment of Hair and Scalp Diseases. *Deutsches Arzteblatt international*. 2016;113(21):377-86.
5. Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan.
6. Hoffmann R. *Biologie des Haarfollikels*.
7. Paus R, Cotsarelis G. *The Biology of Hair Follicles*.
8. Rassner G. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*: Urban & Fischer; 2009.
9. Strazzulla LC, Wang EHC, Avila L, Lo Sicco K, Brinster N, Christiano AM, et al. Alopecia areata: Disease characteristics, clinical evaluation, and new perspectives on pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2018;78(1):1-12.
10. Mirzoyev SA, Schrum AG, Davis MDP, Torgerson RR. Lifetime Incidence Risk of Alopecia Areata Estimated at 2.1% by Rochester Epidemiology Project, 1990–2009.
11. Kyriakis K, Paltatzidou K, Kosma E, Sofouri E, Tadros A, Rachioti E. Alopecia areata prevalence by gender and age. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2009;23(5):572-3.
12. Trueb RM, Dias M. Alopecia Areata: a Comprehensive Review of Pathogenesis and Management. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2018;54(1):68-87.
13. van der Steen P, Traupe H, Happle R, Boezeman J, Strater R, Hamm H. The genetic risk for alopecia areata in first degree relatives of severely affected patients. An estimate. *Acta dermato-venereologica*. 1992;72(5):373-5.
14. Islam N, Leung PS, Huntley AC, Gershwin ME. The autoimmune basis of alopecia areata: a comprehensive review. *Autoimmunity reviews*. 2015;14(2):81-9.
15. Pratt CH, King LE, Jr., Messenger AG, Christiano AM, Sundberg JP. Alopecia areata. *Nature reviews Disease primers*. 2017;3:17011.
16. Petukhova L, Duvic M, Hordinsky M, Norris D, Price V, Shimomura Y, et al. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. *Nature*. 2010;466(7302):113-7.
17. Huang KP, Mullangi S, Guo Y, Qureshi AA. Autoimmune, Atopic, and Mental Health Comorbid Conditions Associated With Alopecia Areata in the United States. *JAMA dermatology*. 2013;149(7):789-94.
18. Katsarou-Katsari A, Singh LK, Theoharides TC. Alopecia areata and affected skin CRH receptor upregulation induced by acute emotional stress. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2001;203(2):157-61.
19. Alkhalifah A, Alsantali A, Wang E, McElwee KJ, Shapiro J. Alopecia areata update: part I. Clinical picture, histopathology, and pathogenesis. *J Am Acad Dermatol*. 2010;62(2):177-88, quiz 89-90.

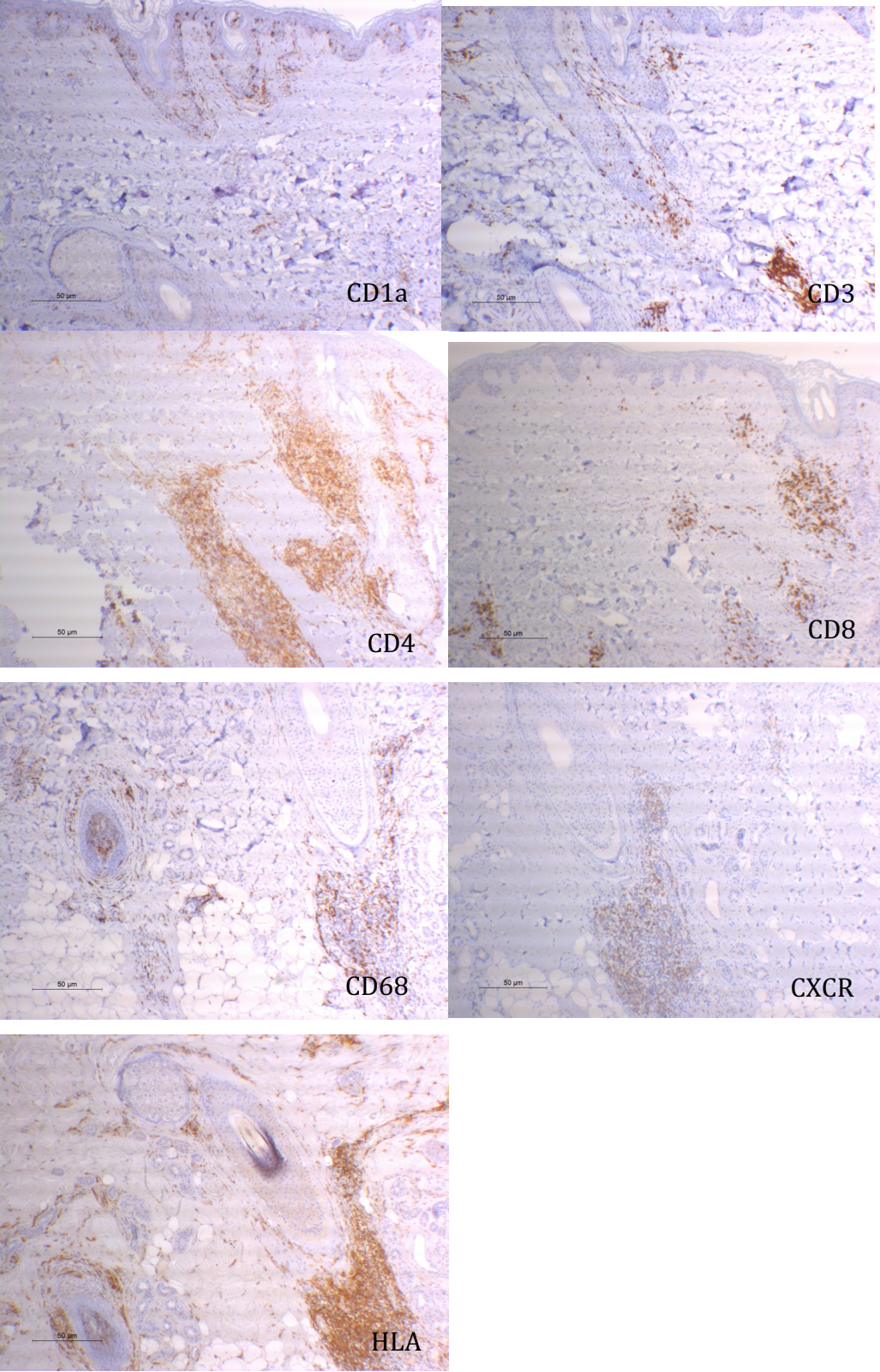
20. Spano F, Donovan JC. Alopecia areata: Part 1: pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*. 2015;61(9):751-5.
21. Rassner G. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas: Urban & Fischer - Elsevier*; 2009.
22. Finner AM. Alopecia areata: Clinical presentation, diagnosis, and unusual cases. *Dermatologic therapy*. 2011;24(3):348-54.
23. Olsen EA, Hordinsky MK, Price VH, Roberts JL, Shapiro J, Canfield D, et al. Alopecia areata investigational assessment guidelines—Part II. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004;51(3):440-7.
24. Rajabi F, Drake LA, Senna MM, Rezaei N. Alopecia areata: a review of disease pathogenesis. *The British journal of dermatology*. 2018;179(5):1033-48.
25. Gilhar A, Paus R, Kalish RS. Lymphocytes, neuropeptides, and genes involved in alopecia areata. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2019-27.
26. DY LC, WHITING DA. Histopathology of alopecia areata, acute and chronic: Why is it important to the clinician? *Dermatologic therapy*. 2011;24(3):369-74.
27. Whiting DA. Histopathologic features of alopecia areata: a new look. *Archives of dermatology*. 2003;139(12):1555-9.
28. Huang KP, Mullangi S, Guo Y, Qureshi AA. Autoimmune, atopic, and mental health comorbid conditions associated with alopecia areata in the United States. *JAMA dermatology*. 2013;149(7):789-94.
29. Spano F, Donovan JC. Alopecia areata: Part 2: treatment. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*. 2015;61(9):757-61.
30. Estefan J, Ribeiro M, Abad E, Saintive S, Ramos ESM. Alopecia Areata-Part III: Prognosis and Treatment. *Skinmed*. 2016;14(5):361-5.
31. Messenger AG, McKillop J, Farrant P, McDonagh AJ, Sladden M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of alopecia areata 2012. *British Journal of Dermatology* 2012.
32. Gupta AK, Carviel J, Abramovits W. Treating Alopecia Areata: Current Practices Versus New Directions. *American journal of clinical dermatology*. 2017;18(1):67-75.
33. Tosti A, Piraccini BM, Pazzaglia M, Vincenzi C. Clobetasol propionate 0.05% under occlusion in the treatment of alopecia totalis/universalis. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(1):96-8.
34. Kar BR, Handa S, Dogra S, Kumar B. Placebo-controlled oral pulse prednisolone therapy in alopecia areata. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(2):287-90.
35. Seiter S, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. High-dose pulse corticosteroid therapy in the treatment of severe alopecia areata. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2001;202(3):230-4.
36. Freyschmidt-Paul P, Happle R, McElwee KJ, Hoffmann R. Alopecia areata: treatment of today and tomorrow. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2003;8(1):12-7.
37. Wolff H. [Drug treatment of alopecia]. *Der Internist*. 2015;56(10):1196-208.
38. Schmoeckel C, Weissmann I, Plewig G, Braun-Falco O. Treatment of alopecia areata by anthralin-induced dermatitis. *Archives of dermatology*. 1979;115(10):1254-5.
39. Wu SZ, Wang S, Ratnaparkhi R, Bergfeld WF. Treatment of pediatric alopecia areata with anthralin: A retrospective study of 37 patients. *Pediatric dermatology*. 2018;35(6):817-20.
40. Alkhalifah A. Topical and intralesional therapies for alopecia areata. *Dermatologic therapy*. 2011;24(3):355-63.

41. Messenger AG. Alopecia areata: Management [Available from: <https://www.uptodate.com/contents/alopecia-areata-management>].
42. Craiglow BG, King BA. Killing two birds with one stone: oral tofacitinib reverses alopecia universalis in a patient with plaque psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(12):2988-90.
43. Liu LY, Craiglow BG, King BA. Tofacitinib 2% ointment, a topical Janus kinase inhibitor, for the treatment of alopecia areata: A pilot study of 10 patients.
44. Freyschmidt-Paul P, Happle R, Hoffman R. [Alopecia areata in animal models- new insights into pathogenesis and treatment of a T cell-mediated autoimmune disorder]. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2004;2(4):260-73.
45. McELWEE KJ, SPIERS EM, OLIVER RF. In vivo depletion of CD8+ T cells restores hair growth in the DEBR model for alopecia areata. *British Journal of Dermatology*. 1996;135(2):211-7.
46. Spektrum Akademischer Verlag H. Spektrum - Lexikon der Biologie [Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/monoklonale-antikoerper/43782>].
47. Heilmann KM, K.; Holzlöhner, P. Monoklonale Antikörper – Herstellung und Verwendung. *Biospektrum*. 2012:167-9.
48. Boenisch T HC, DakoCytomation GmbH. *Handbuch immunchemische Färbemethoden*. Hamburg: Hamburg DakoCytomation; 2003. 85 p.
49. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*: Springer Spektrum; 2011. 269 p.
50. Rink L, Kruse A, Haase H, Lay M. *Immunologie für Einsteiger*: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
51. GbR IfMDB-P. [Available from: <https://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/hla-assozierte-erkrankungen/genetik-funktion-und-nomenklatur-des-hla-systems.html>].
52. Bertolini M, McElwee K, Gilhar A, Bulfone-Paus S, Paus R. Hair follicle immune privilege and its collapse in alopecia areata. *Experimental dermatology*. 2020;29(8):703-25.
53. Betz RC, Petukhova L, Ripke S, Huang H, Menelaou A, Redler S, et al. Genome-wide meta-analysis in alopecia areata resolves HLA associations and reveals two new susceptibility loci. *Nat Commun*. 2015;6:5966.
54. Christoph T, Müller-Röver S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, et al. The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege. *British Journal of Dermatology*. 2000;142(5):862-73.
55. Zhang X, Zhao Y, Ye Y, Li S, Qi S, Yang Y, et al. Lesional infiltration of mast cells, Langerhans cells, T cells and local cytokine profiles in alopecia areata. *Archives of Dermatological Research*. 2015;307(4):319-31.
56. Dai Z, Xing L, Cerise J, Wang EH, Jabbari A, de Jong A, et al. CXCR3 Blockade Inhibits T Cell Migration into the Skin and Prevents Development of Alopecia Areata. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2016;197(4):1089-99.
57. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):620-31.
58. Elston DM, McCollough ML, Angeloni VL. Vertical and transverse sections of alopecia biopsy specimens: combining the two to maximize diagnostic yield. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(3):454-7.
59. Garcia C, Poletti E. Scalp biopsy specimens: transverse vs vertical sections. *Archives of dermatology*. 2007;143(2):268.

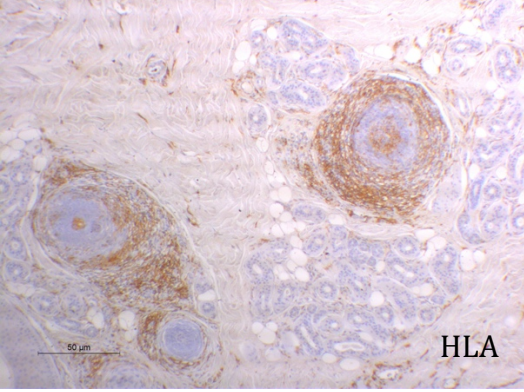
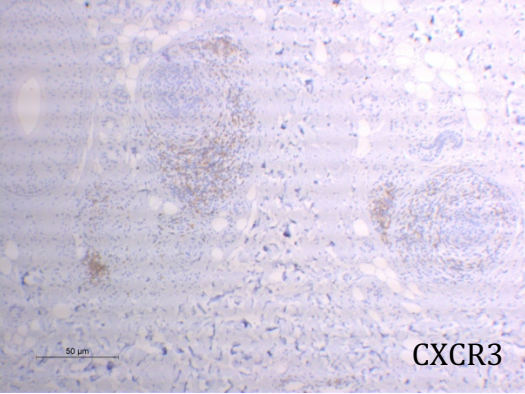
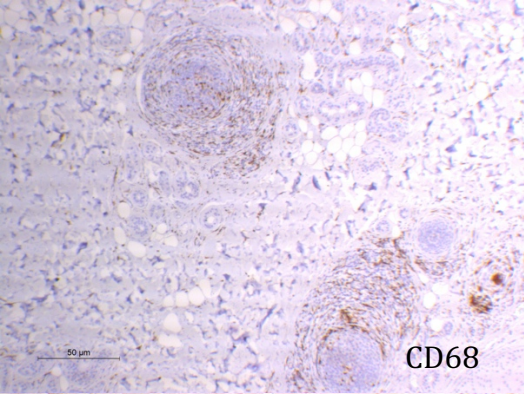
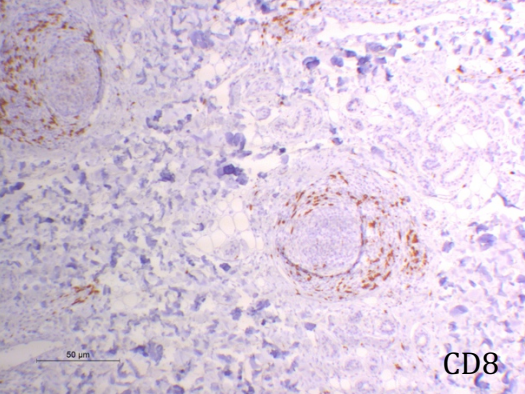
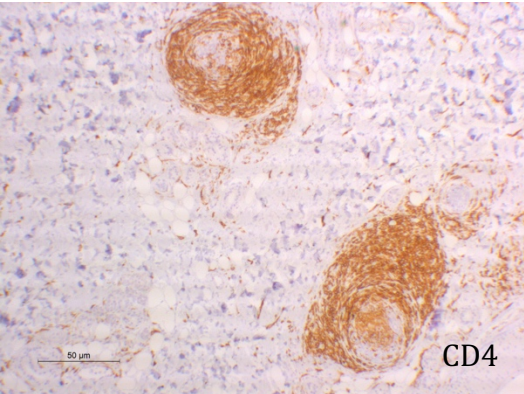
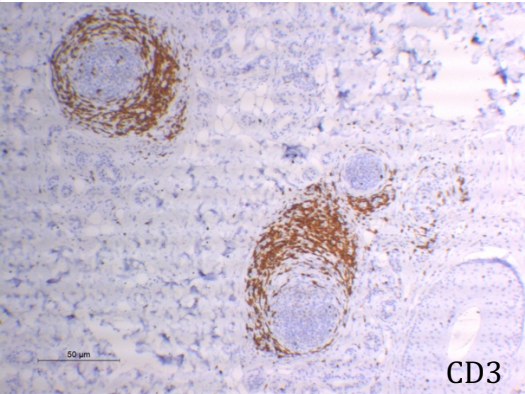
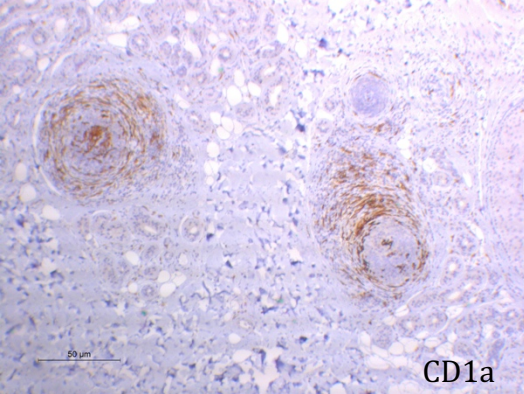
60. Singh K, Sharma S, Singh UR, Bhattacharya SN. A Comparison of Vertical and Transverse Sections in the Histological Diagnosis of Alopecia Areata Scalp Biopsy Specimens. *Int J Trichology*. 2016;8(3):111-5.
61. Whiting DA. Histopathology of alopecia areata in horizontal sections of scalp biopsies. *The Journal of investigative dermatology*. 1995;104(5 Suppl):26s-7s.
62. Taira K, Narisawa Y, Nakafusa J, Misago N, Tanaka T. Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles. *J Dermatol Sci*. 2002;30(3):195-204.
63. Cetin ED, Savk E, Uslu M, Eskin M, Karul A. Investigation of the Inflammatory Mechanisms in Alopecia Areata. *The American Journal of Dermatopathology*. 2009;31(1):53-60.
64. Lintzeri DA, Constantinou A, Hillmann K, Ghoreschi K, Vogt A, Blume-Peytavi U. Alopecia areata – Current understanding and management. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2022;20(1):59-90.
65. Guo H, Cheng Y, Shapiro J, McElwee K. The role of lymphocytes in the development and treatment of alopecia areata. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(12):1335-51.
66. Perret C, Wiesner-Menzel L, Happle R. Immunohistochemical analysis of T-cell subsets in the peribulbar and intrabulbar infiltrates of alopecia areata. *Acta dermato-venereologica*. 1984;64(1):26-30.
67. McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Sundberg JP, Hoffmann R. The Pathogenesis of Alopecia Areata in Rodent Models. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2003;8(1):6-11.
68. McElwee KJ, Spiers EM, Oliver RF. Partial restoration of hair growth in the DEBR model for Alopecia areata after in vivo depletion of CD4+ T cells. *The British journal of dermatology*. 1999;140(3):432-7.
69. Xing L, Dai Z, Jabbari A, Cerise JE, Higgins CA, Gong W, et al. Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nature medicine*. 2014;20(9):1043-9.
70. Paus R, Bertolini M. The role of hair follicle immune privilege collapse in alopecia areata: status and perspectives. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2013;16(1):S25-7.
71. Paus R, Slominski A, Czarnecki BM. Is alopecia areata an autoimmune-response against melanogenesis-related proteins, exposed by abnormal MHC class I expression in the anagen hair bulb? *Yale J Biol Med*. 1993;66(6):541-54.

9. Anhang

Übersichtsaufnahmen Patient 9 Vertikalschnitt



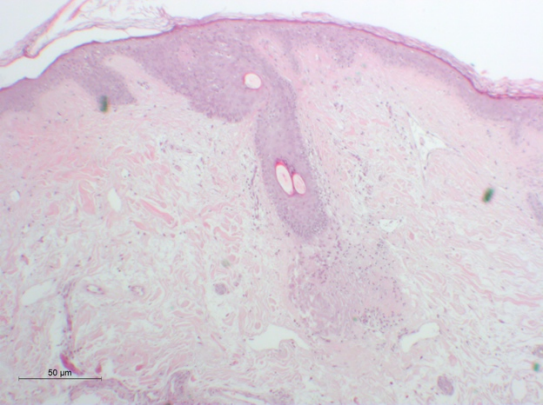
Übersichtsaufnahmen Patient 9 Horizontalschnitt



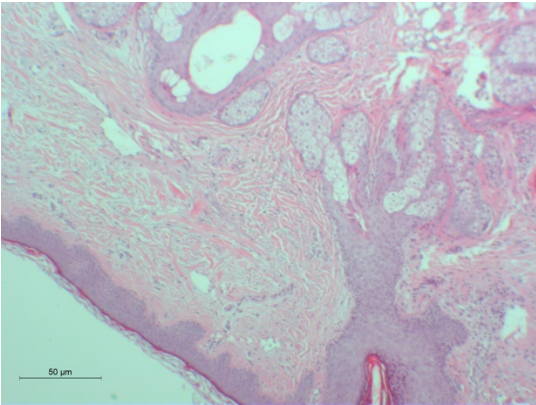
Histologische Übersichtsbilder (HE-Färbung)

Vertikalschnitte

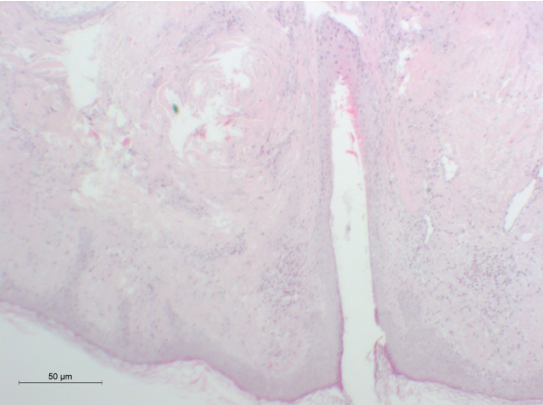
Patient 1 (Journal-Nr: 5466-I-2016)



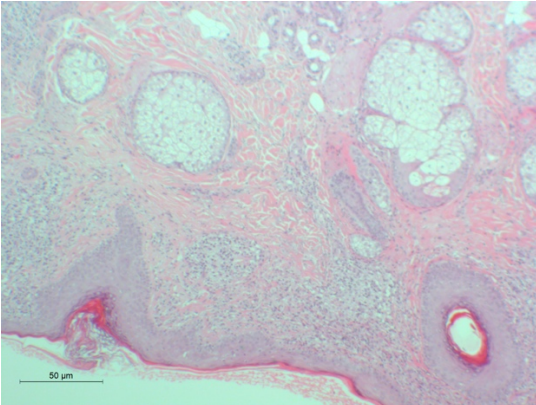
Patient 2 (Journal-Nr: 5636-I-2016)



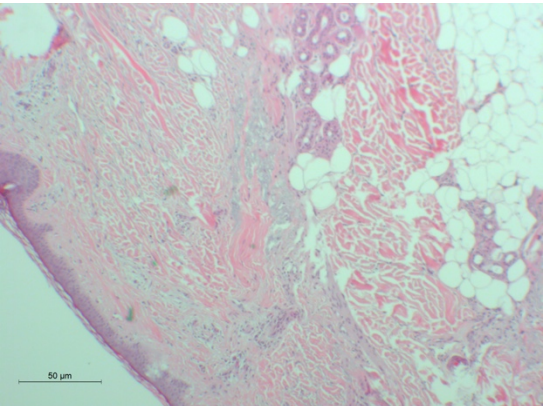
Patient 3 (Journal-Nr: 5637-I-2016)



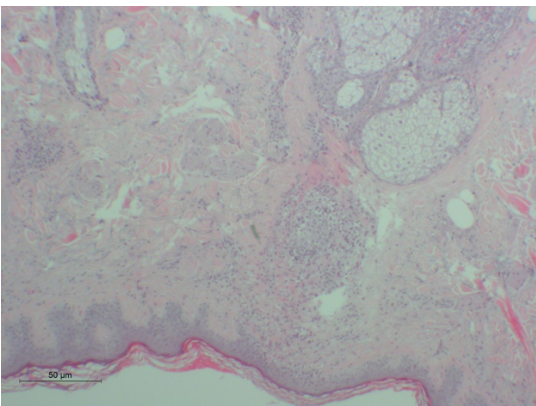
Patient 4 (Journal-Nr: 5689-I-2016)



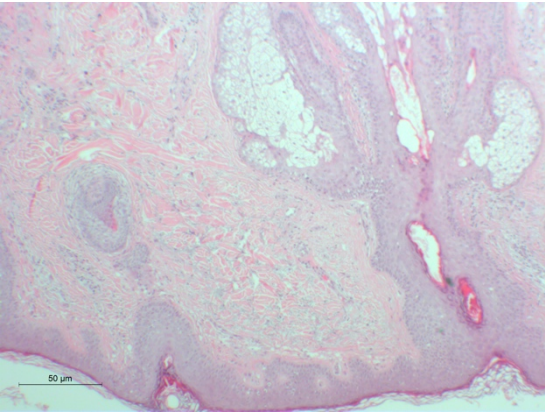
Patient 5 (Journal-Nr. 5736-I-2016)



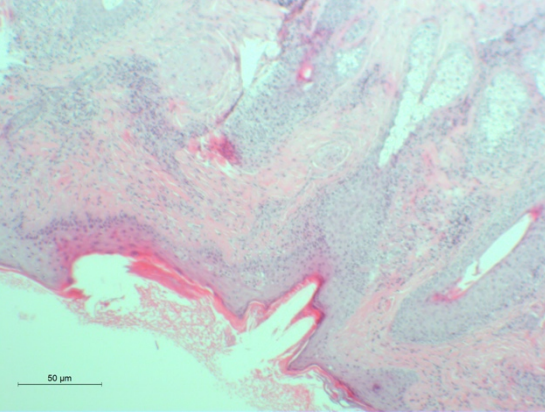
Patient 6 (Journal-Nr: 5737-I-2016)



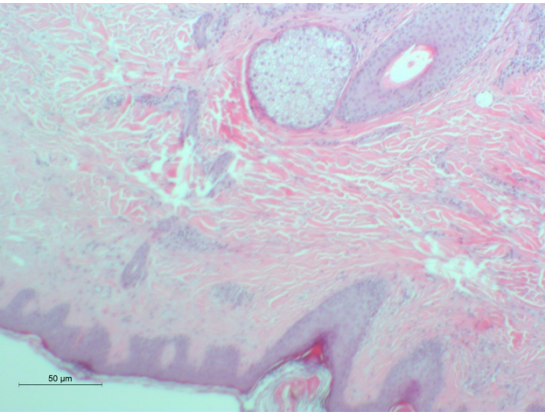
Patient 7 (Journal-Nr: 5853-I-2016)



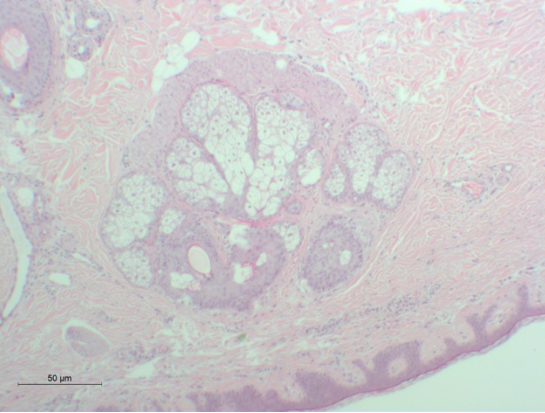
Patient 8 (Journal-Nr: 5854-I-2016)



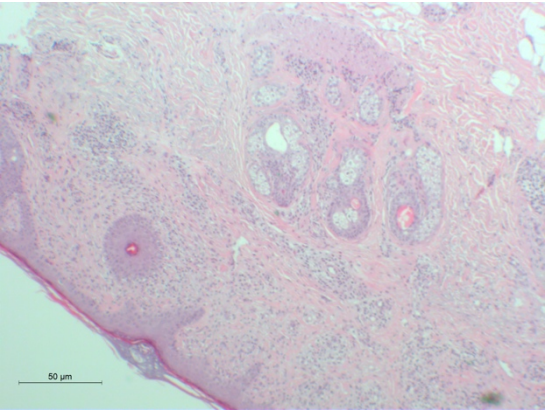
Patient 9 (Journal-Nr: 5871-I-2016)



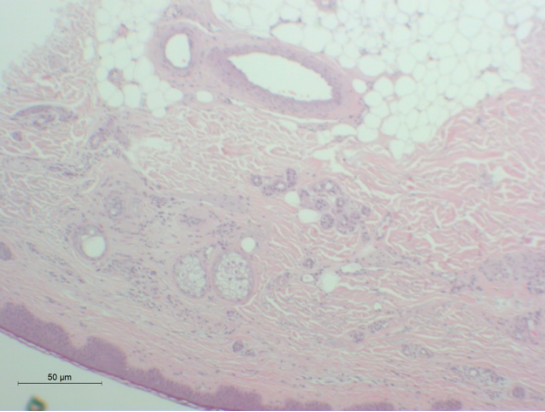
Patient 10 (Journal-Nr: 5967-I-2016)



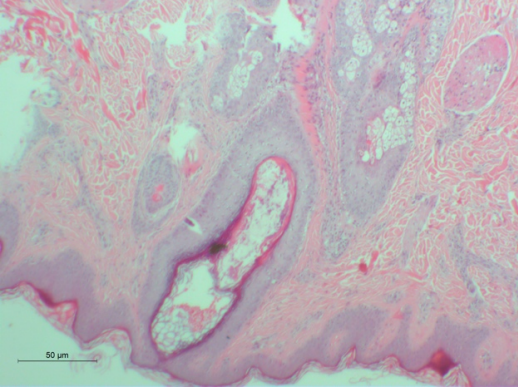
Patient 11 (Journal-Nr: 5968-I-2016)



Patient 12 (Journal-Nr: 5980-I-2016)

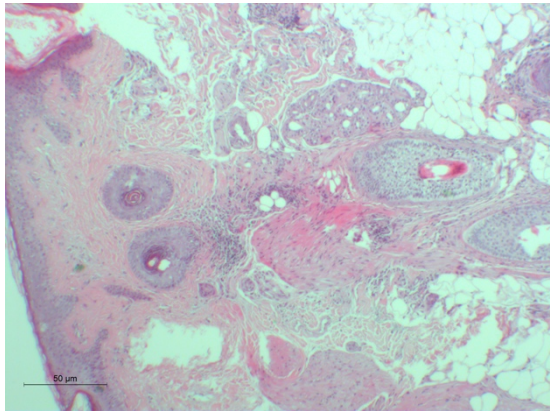


Patient 13 (Journal-Nr: 239-a-2017)

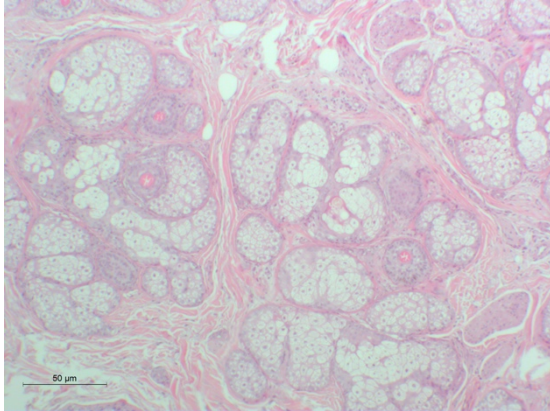


Horizontalschnitte

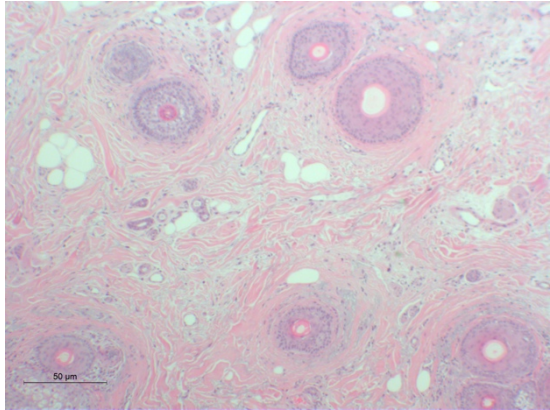
Patient 1 (Journal-Nr: 5466-II-2016)



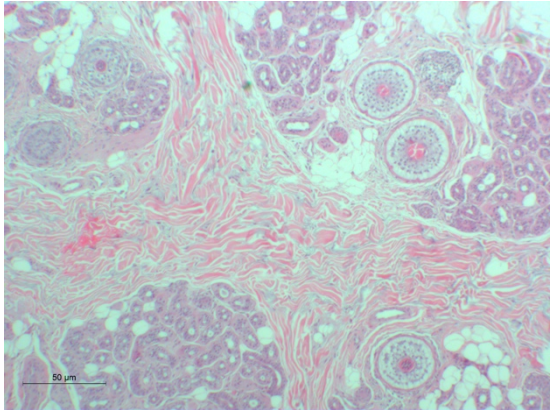
Patient 2 (Journal-Nr: 5636-II-2016)



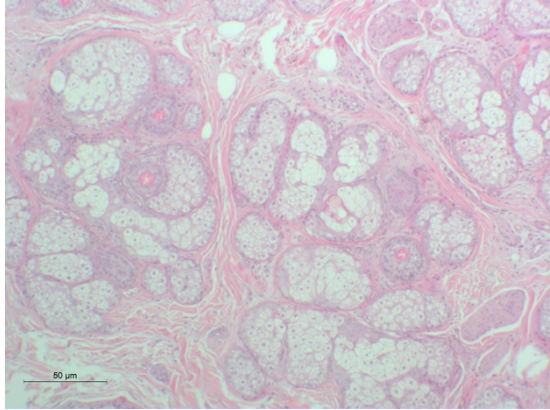
Patient 3 (Journal-Nr: 5637-II-2016)



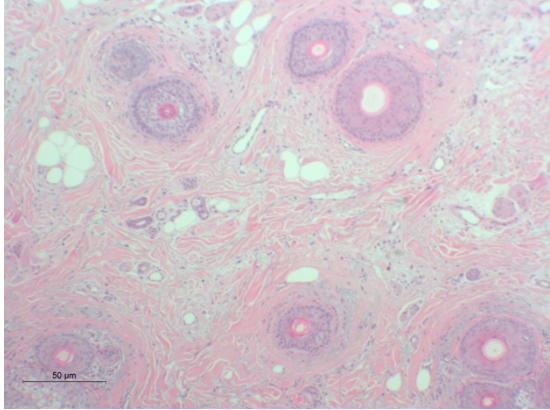
Patient 4 (Journal-Nr: 5689-II-2016)



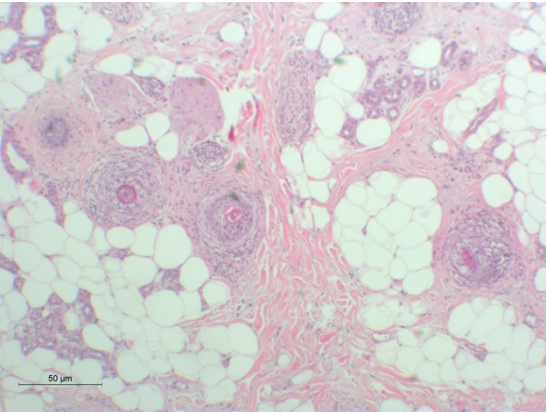
Patient 5 (Journal-Nr: 5736-II-2016)



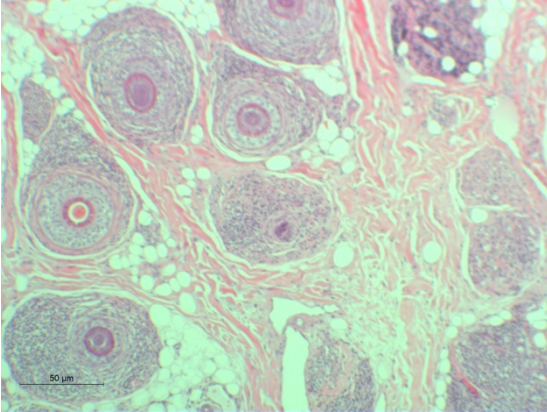
Patient 6 (Journal-Nr: 5737-II-2016)



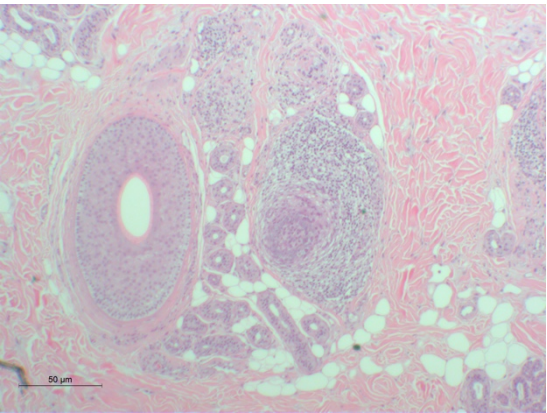
Patient 7 (Journal-Nr: 5853-II-2016)



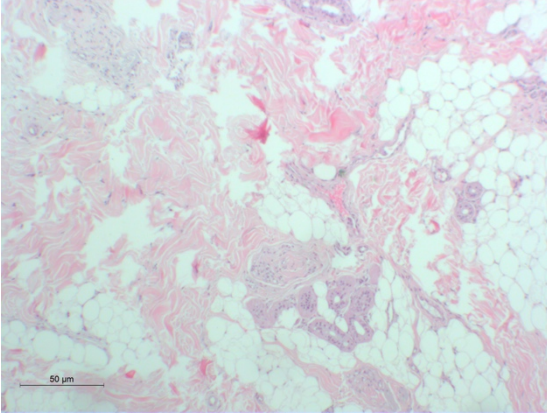
Patient 8 (Journal-Nr: 5854-II-2016)



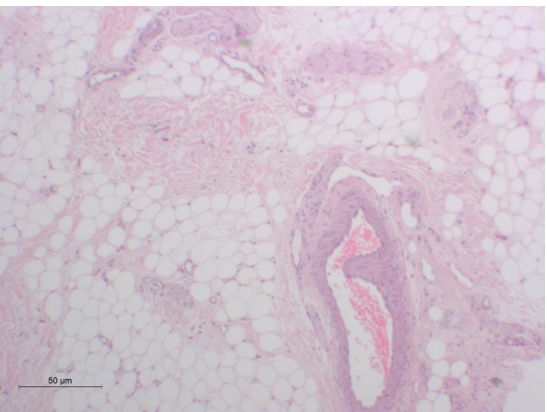
Patient 9 (Journal-Nr: 5871-2016)



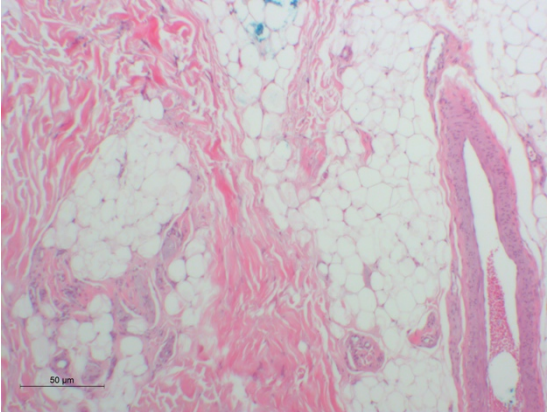
Patient 10 (Journal-Nr: 5967-II-2016)



Patient 11 (Journal-Nr. 5968-II-2016)



Patient 12 (Journal-Nr: 5980-II-2016)



Patient 13 (Journal-Nr: 239-b-2017)

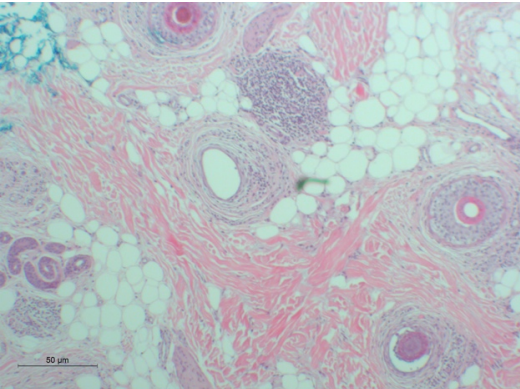


Tabelle Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Antigen- demas- kierung	Firma
Anti-CD 1a	1:100	EDTA	Dako Deutschland, M3571
Anti-CD 3	1:100	EDTA	Novocastra, NCL-L-CD3-565
Anti-CD 4	1: 50	EDTA	Cellmarque, 104R-24
Anti-CD 8	1:100	EDTA	Dako Deutschland, M7103
Anti-CD 68	1: 50	Citrat	Dako Deutschland, M0876
Anti-CXCR 3	1:100	Citrat	BD Pharmingen, 557183
HLA-DR	1: 50	keine	BioGenex, Mu 154-UC

Patientenfotos/ klinische Bilder

Patientin 7



Patientin 8



Patientin 9





Patientin 10





Patientin 11





Danksagung

Abschließend möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die zu der Entstehung und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater für die Überlassung meines Themas und die freundliche und sehr kompetente Betreuung dieser Dissertation.

Für das Herstellen der histologischen Präparate und ihren persönlichen Einsatz danke ich besonders den Damen der Histologie.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung.

Lebenslauf

aus Datenschutzgründen gelöscht