

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Veränderung der Ranvier'schen Schnürringarchitektur bei Patienten mit
diabetischer Neuropathie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Franziska Frank

aus Leipzig

Würzburg, Dezember 2018

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler

Korreferentin: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	- 1 -
1.1 Diabetische Neuropathie	- 1 -
1.1.1 Definition	- 1 -
1.1.2 Epidemiologie	- 1 -
1.1.3 Pathogenese	- 2 -
1.1.4 Klassifikation und klinisches Erscheinungsbild.....	- 3 -
1.1.5 Diagnostik	- 8 -
1.1.6 Therapie	- 13 -
1.2 Nervenfasern	- 16 -
1.2.1 Aufbau der Nervenfaser.....	- 16 -
1.2.2 Myelinisierung.....	- 16 -
1.2.3 Schnürringarchitektur	- 18 -
1.2.4 Hautinnervation	- 19 -
1.3 Hautbiopsien.....	- 21 -
1.3.1 Veränderungen in Hautbiopsien	- 22 -
1.3.2 Veränderungen in Hautbiopsien von Patienten mit diabet. Neuropathie	- 24 -
1.4 Studienvorhaben	- 28 -
1.4.1 Hypothese	- 28 -
1.4.2 Zielsetzung	- 28 -
1.4.3 Arbeitsplan.....	- 28 -
2. Material und Methoden	- 29 -
2.1 Studienteilnehmer	- 29 -
2.1.1 Patienten.....	- 29 -
2.1.2 Patientenanamnese	- 30 -
2.1.3 Klinisch-neurologische Untersuchung.....	- 30 -

2.1.4 Fragebogen	- 32 -
2.1.5 Elektroneurographie des Nervus suralis	- 34 -
2.1.6 Definition der Patientengruppen	- 34 -
2.2 Kontrollpersonen	- 35 -
2.3 Quantitative Sensorische Testung	- 36 -
2.4 Hautbiopsien.....	- 40 -
2.4.1 Gewinnung der Hautbiopsien	- 40 -
2.4.2 Aufarbeitung der Gewebeproben	- 42 -
2.4.3 Immunhistochemische Färbungen.....	- 43 -
2.5 Mikroskopische Auswertungsmethoden	- 51 -
2.5.1 Methode zur Auswertung der intraepidermalen Nervenfaserdichte	- 51 -
2.5.2 Methode zur Auswertung der dermalen Nervenfaserbündel.....	- 52 -
2.5.3 Analyse der Schnürringarchitektur	- 54 -
2.6 Statistische Auswertung	- 58 -
3. Ergebnisse	- 59 -
3.1 Demographische Daten	- 59 -
3.1.1 Studienteilnehmer	- 59 -
3.1.2 Kontrollen	- 61 -
3.2 Elektroneurographie des Nervus suralis.....	- 62 -
3.3 Quantitative sensorische Testung	- 68 -
3.4 Intraepidermale Nervenfaserdichte	- 74 -
3.4.1 Intraepidermale Nervenfaserdichte des Unterschenkels	- 74 -
3.4.2 Intraepidermale Nervenfaserdichte des Oberschenkels.....	- 75 -
3.4.3 Intraepidermale Nervenfaserdichte des Fingers.....	- 76 -
3.4.4 Übersicht der intraepidermalen Nervenfaserdichte	- 78 -
3.4.5 Korrelationen der intraepidermalen Nervenfaserdichte	- 79 -
3.5 Dermale Nervenfaserbündel	- 81 -
3.5.1 Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern	- 81 -

3.5.2 Bündel mit myelinisierten Nervenfasern	- 83 -
3.5.3 Gesamtanzahl Nervenfaserbündel.....	- 85 -
3.6 Schnürringarchitektur.....	- 87 -
3.6.1 Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Caspr.....	- 87 -
3.6.2 Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Neurofascin	- 95 -
3.6.3 Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Na-Kanal	- 104 -
3.6.4 Länge der Ranvier-Schnürringe.....	- 111 -
3.6.5 Übersicht.....	- 114 -
4. Diskussion.....	- 123 -
4.1 Diskussion „small-fiber“ Beteiligung.....	- 123 -
4.1.1 Quantitative sensorische Testung.....	- 123 -
4.1.2 Intraepidermale Nervenfaserdichte.....	- 125 -
4.2 Diskussion „large-fiber“ Beteiligung	- 129 -
4.2.1 Elektroneurographie des Nervus suralis	- 129 -
4.2.2 Dermale Nervenfaserbündel.....	- 130 -
4.2.3 Anzahl Schnürringe	- 133 -
4.3 Diskussion Schnürringarchitektur	- 134 -
4.3.1 Länge der Ranvier-Schnürringe.....	- 134 -
4.3.2 veränderte Schnürringarchitektur	- 136 -
5. Zusammenfassung.....	- 144 -
5.1 Ausblick.....	- 145 -
6. Literaturverzeichnis.....	- 146 -

1. EINLEITUNG

1.1 Diabetische Neuropathie

1.1.1 DEFINITION

Eine diabetische Neuropathie wird nach der „American Diabetes Association“ als eine klinisch oder subklinisch nachweisbare Störung definiert, welche das periphere Nervensystem betrifft und das autonome Nervensystem miteinbeziehen kann. Die Erkrankung tritt in Zusammenhang mit Diabetes mellitus auf, wobei andere Ursachen für eine periphere Neuropathie ausgeschlossen werden müssen (American Diabetes Association, 1988).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIE

Die Erkrankung an Diabetes mellitus hat sich zu einem der größten globalen Gesundheitsproblemen entwickelt und es wird angenommen, dass sich die Anzahl an erkrankten Patienten zwischen 2000 und 2030 verdoppeln wird (Juster-Switlyk et al., 2016). Im Jahr 2015 waren laut der Internationalen Diabetes Federation 415 Millionen Erwachsene weltweit an Diabetes mellitus erkrankt. In Europa waren hiervon 59,8 Millionen Menschen betroffen (International Diabetes Federation). Diabetes mellitus stellt weltweit, neben dem Alkoholabusus, die Hauptursache für eine Neuropathie dar (Boulton et al., 2004; Callaghan et al., 2012; Gupta et al., 2014). Im Krankheitsverlauf sind bis zu 50% der Patienten von einer diabetischen Neuropathie betroffen (Boulton et al., 2004; Callaghan et al., 2012). Die diabetische Neuropathie ist eine der häufigsten Komplikationen im Verlauf einer Diabetes mellitus Erkrankung. Sie stellt die Hauptursache für Ulzerationen des Fußes, Gangstörungen und Sturzverletzungen dar und ist für 50-75% der nicht-traumatischen Amputationen verantwortlich (Gupta et al., 2014; Juster-Switlyk et al., 2016). Die diabetische Neuropathie führt bei bis zu 50% der Patienten zu neuropathischen Schmerzen und reduziert die Lebensqualität der Patienten. Die Erkrankung geht mit einer erhöhten Morbidität der Patienten einher, führt zu einer gesteigerten Mortalität und erhöht die jährlichen Gesundheitsausgaben (Tesfaye et al., 2011; Juster-Switlyk et al., 2016).

1.1.3 PATHOGENESE

Die Pathogenese der diabetischen Neuropathie ist komplex und nicht vollständig geklärt. Metabolische und vaskuläre Faktoren spielen in der Krankheitsentstehung eine Rolle. Den Hauptfaktor scheint hierbei die Hyperglykämie darzustellen. Die chronische Erhöhung der Blutglukose führt zu Veränderungen von verschiedenen Stoffwechselwegen und kann dadurch zelluläre Schäden verursachen. Wichtig scheinen hierbei unter anderem mitochondriale Dysfunktionen, eine Aktivierung des Polyol-Stoffwechselweges und die Akkumulation von glykierten Reaktionsprodukten (advanced glycation end products, AGE) zu spielen. Auf unterschiedlichen Wegen kommt es zu oxidativem Stress und zu einer Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden, welche die biologische Funktion von Proteinen und somit die zelluläre Funktion beeinflussen (Callaghan et al., 2012; Kasznicki J. et al., 2012; Juster-Switlyk et al., 2016). Außerdem führen diese metabolischen Faktoren zu endothelialen Schäden, welche den Blutfluss beeinträchtigen. Diese Hypoxie führt wiederum zu oxidativem Stress im peripheren Nervengewebe und begünstigt die zellulären Dysfunktionen (Newrick et al., 1986; Wada et al., 2005). In Suralisbiopsien sind strukturelle und mikrovaskuläre Defekte, welche zu Mikroangiopathien beitragen können, zu beobachten. Verdickte Basalmembranen, reduzierte Kapillardurchmesser, sowie Hypertrophien und Hyperplasien der Endothelzellen und Perizyten in Patienten mit diabetischer Neuropathie scheinen den Blutfluss zu reduzieren und zu einer endo- und perineuralen Hypoxie zu führen (Malik et al., 1992; Malik et al., 1994). Weitere modifizierbare kardiovaskuläre Risikofaktoren scheinen ebenfalls eine Rolle bei der Krankheitsentstehung zu spielen. Erhöhte Werte an LDL-Lipoproteinen, Triglyceriden, ein erhöhter Body-Mass-Index, Hypertonie und Rauchen können mit dem Auftreten und der Entwicklung der diabetischen Neuropathie assoziiert sein (Tesfaye et al., 2005; Ziegler et al., 2008; Wiggin et al., 2009). Die Dyslipidämie bzw. das metabolische Syndrom zeigen eine hohe Inzidenz bei Patienten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus. Sie können Zellschäden verursachen, die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen fördern und oxidativen Stress verursachen (Callaghan et al., 2012). Eine weitere Rolle scheint der beeinträchtigte Insulin-Signalweg in der Entwicklung der diabetischen

Neuropathie zu spielen. Insulin soll einen positiven Einfluss auf das neuronale Wachstum und zelluläre Überleben haben (Xu et al., 2004; Toth et al., 2006). Ein Insulinmangel oder eine Insulinresistenz können ebenfalls zu einer mitochondrialen Dysfunktion und oxidativem Stress führen. Bei Patienten mit einem Typ 1 Diabetes mellitus soll außerdem die Reduktion an C-Peptid zu einer Dysfunktion der Nerven beitragen (Callaghan et al., 2012). Diese unterschiedlichen Mechanismen führen auf verschiedenen Wegen zu zellulärem Stress und Apoptose, welche Zellen, wie Neurone, Gliazellen und Endothelzellen betreffen können. Diese Dysfunktion und der Untergang von Nervenzellen manifestiert sich klinisch schließlich als Neuropathie.

1.1.4 KLASSIFIKATION UND KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD

Die *distal-symmetrische sensomotorische Neuropathie* ist mit ca. 80% die häufigste Erscheinungsform der diabetischen Neuropathie (Berlit, 2011). Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 können hiervon betroffen sein. Diese Form der Neuropathie tritt vermehrt mit höherem Lebensalter und mit längerer Krankheitsdauer in Erscheinung. Sie beginnt typischerweise in den distalen Körperabschnitten, wobei die untere Extremität stärker als die obere Extremität betroffen ist, und weist eine längenabhängige Verteilung auf (Llewelyn, 2003; Boulton et al., 2004; Boulton et al., 2005). Im Vordergrund der Erkrankung stehen Sensibilitätsstörungen und Parästhesien (siehe Tabelle 1.1), welche meist symmetrisch an den Zehen und Füßen beginnen und ein strumpf- und handschuhförmiges Ausbreitungsmuster zeigen (Llewelyn, 2003). Die Patienten können eine gestörte Schmerz- und Berührungsempfindung zeigen und unter Reizerscheinungen, wie Kribbeln, Brennen, Ameisenlaufen, Taubheit, Spannungs- und Schwellungsgefühl leiden (Hacke, 2010; Berlit, 2011). Auch neuropathische Schmerzen können in Erscheinung treten und typischerweise nachts an Intensität zunehmen (Boulton et al., 2005). Ungefähr 50% der Patienten berichten über solche Symptome, wobei die andere Hälfte der Patienten asymptomatisch sein kann und erst in der klinisch-neurologischen Untersuchung auffällige Ergebnisse zeigt (Boulton et al., 2004; Boulton et al., 2005). Als Frühzeichen der Erkrankung kann ein reduziertes Vibrationsempfinden an den distalen Körperabschnitten gefunden werden, sowie eine reduzierte Druck- und Temperaturempfindung (Boulton et al., 2005). Häufig

kann sich die Erkrankung auch durch Brennschmerzen und nächtliche Dysästhesien bemerkbar machen. Zu Beginn zeigt sich meist auch ein abgeschwächter oder fehlender Achillessehnenreflex (Llewelyn, 2003; Boulton et al., 2005). Weitere reduzierte Muskeleigenreflexe können im Verlauf bei der klinischen Untersuchung gefunden werden. Ein reduzierter Patellarsehnenreflex findet sich in ungefähr zwei Drittel der Fälle, ein Reflexverlust der oberen Extremität nur in einem Viertel der Patienten. Eine muskuläre Schwäche ist zu Beginn der Erkrankung meist nur mild ausgeprägt und auf die Füße beschränkt. Dies zeigt sich vor allem in einer Abschwächung des M. extensor hallucis longus und des M. extensor digitorum brevis. Größere motorische Ausfälle, eine proximale muskuläre Schwäche und eine Beteiligung der oberen Extremität zeigen sich meist nicht und sollten an andere Ursachen bzw. Diagnosen denken lassen (Llewelyn, 2003). Bei einer schwereren Ausprägung der Erkrankung und einer schlechten Stoffwechsellage kann es zu schmerzhaften Muskelkrämpfen und Atrophien kommen (Hacke, 2010). Die Patienten können hierbei auch unter einem gestörten Lagesinn leiden, welcher sich in einer sensiblen Ataxie mit Stand- und Gangunsicherheit äußern kann (Berlit, 2011). Der Erkrankungsverlauf der distal-symmetrischen Form ist schleichend und zeigt einen chronischen Verlauf mit einer nur langsamen und unvollständigen Rückbildung bei Besserung der Stoffwechsellage (Hacke, 2010).

Eine seltene Verlaufsform der sensiblen Neuropathie stellt die *akute sensible Neuropathie* dar. Sie wird in Zusammenhang mit metabolischen Entgleisungen, plötzlichen Veränderungen des Blutglukosewerts („Insulin Neuritis“), Gewichtsverlust und Essstörungen beobachtet. Diese Verlaufsform wird durch einen akuten oder subakuten Beginn von starken Schmerzen charakterisiert. Beschwerden der betroffenen Patienten umfassen unter anderem Brennschmerzen in den Füßen, Hyperästhesie und plötzliche scharf oder elektrisierende Empfindungen, welche sich nachts verstärken. Klinische Zeichen für einen Sensibilitätsverlust in der neurologischen Untersuchung finden sich selten, unter anderem kann eine Allodynie beobachtet werden oder auch ein abgeschwächter Achillessehnenreflex bei der Erhebung des Reflexstatus. Motorische Defizite in der Untersuchung fehlen meist.

Innerhalb eines Jahres kann es zu einer Rückbildung der Symptome kommen (Boulton et al., 2004; Boulton et al., 2005).

Die *proximale motorische Neuropathie* kann uni- oder bilateral auftreten und ist insgesamt seltener als die oben beschriebene Form. Diese Form wird auch als *diabetische Amyotrophie* bezeichnet und betrifft vor allem ältere Patienten zwischen 50-60 Jahren mit einem Typ 2 Diabetes mellitus (Boulton et al., 2004; Boulton et al., 2005). Hierbei sind vor allem der Plexus lumbosacralis und der N. femoralis betroffen, aber auch die Nn. obturatorius und glutei können beteiligt sein. Die Erkrankung beginnt meist mit starken Schmerzen und die Patienten leiden typischerweise unter einer motorischen Schwäche und im Verlauf auch unter einer Muskelatrophie, welche vor allem die Oberschenkel- und Beckenmuskulatur betrifft und zu Schwierigkeiten beim Treppensteigen und Aufstehen führen kann. Häufig kommt es zu einem Ausfall des Patellarsehnenreflexes, wobei Sensibilitätsstörungen meist fehlen. Die proximale, asymmetrische Neuropathie kann auch die obere Extremität und die Rumpfmuskulatur betreffen und zeigt generell einen subakuten und schubweisen Verlauf mit einer spontanen Besserungstendenz (Mumenthaler, 2008; Hacke, 2010). Andere Ursachen der muskulären Schwäche, wie eine CIDP oder eine Spinalkanalstenose müssen differentialdiagnostisch abgegrenzt werden (Boulton et al., 2005).

Auch einzelne Nerven können bei der diabetischen Neuropathie betroffen sein. Die *Mononeuropathie* tritt meist plötzlich auf, wobei mechanische und ischämische Faktoren eine Rolle spielen können. Es kann unter anderem zu einer Beteiligung des N. medianus, des N. ulnaris, des N. radialis und des N. peroneus communis kommen. Ungefähr ein Drittel der Patienten haben ein Engpasssyndrom, aber auch kraniale Neuropathien können bei Patienten mit Diabetes mellitus auftreten (Boulton et al., 2005). Das Karpaltunnelsyndrom ist hierbei das häufigste Engpasssyndrom, bei welchem es zu einer Einengung des N. medianus im Bereich der Handwurzel unter dem Ligamentum carpi transversum kommt. Ungefähr 5,8% der Patienten zeigen in der klinischen Untersuchung relevante Beschwerden. Seltener treten ein Sulcus-ulnaris-Syndrom mit 2,1% oder ein Kompressionssyndrom des N. radialis mit 0,6% auf (Boulton et al., 2004). Die Patienten leiden unter schmerzhaften Parästhesien und im

Verlauf unter Atrophien der betroffenen Muskulatur. Diabetes mellitus ist mit 5-12% eine seltene Ursache einer Peroneuslähmung, dabei kann es je nach Ausmaß der Beteiligung zu einem Sensibilitätsverlust im entsprechenden Areal und motorischen Ausfällen, wie einer gestörten Dorsalextension der Zehen und des Fußes mit resultierendem „Steppergang“ kommen (Boulton et al., 2004). Die Hirnnervenlähmungen bei Patienten mit Diabetes mellitus sind mit ca. 0,05% selten (Boulton et al., 2005). Häufig kommt es zu Paresen der äußeren Augenmuskeln im Sinne einer diabetischen Ophthalmoneuropathie, wobei vor allem der N. oculomotorius und N. abducens mit jeweils 3,3% betroffen sind. Seltener kann es auch zu einer Beteiligung der N. trochlearis (2,1%) kommen. Die Beschwerden treten meist akut auf und können Doppelbilder, Schmerzen, Ptosis oder auch Pupillenstörungen umfassen (Boulton et al., 2004). Auch andere Hirnnerven, wie der N. facialis, N. olfactorius und N. opticus können beteiligt sein. Die Symptome zeigen meist innerhalb einiger Monate eine spontane Rückbildungstendenz (Boulton et al., 2004; Boulton et al., 2005).

Eine Sonderform der sensiblen Polyneuropathie ist die Small-fiber Neuropathie. Hierbei sind überwiegend schmerzleitende kleinkalibrige dünn myelinisierte und unmyelinisierte A δ - und C-Nervenfasern betroffen (Berlit, 2011). Die Patienten leiden unter starken Schmerzen der distalen Körperabschnitte, vor allem in den Füßen, welche mit einer nächtlichen Schmerzexazerbation einhergehen können. Die Schmerzen werden unter anderem als brennend, elektrisierend oder stechend empfunden. In der klinischen Untersuchung können eine gestörte Temperaturempfindung, Dysästhesien und Allodynie beobachtet werden (Malik et al., 2011). Die Small-fiber Neuropathie tritt häufig bei Patienten mit Diabetes mellitus auf. Sie kann aber auch idiopathisch in Erscheinung treten oder auf andere Ursachen zurückgeführt werden, wie Para-, Dsyproteinämie oder Amyloidose (Hacke, 2010).

Die *diabetische autonome Neuropathie* kann verschiedenen Organsysteme umfassen und den Gastrointestinaltrakt, den Urogenitaltrakt, das kardiovaskuläre System, die Pupillenmotorik und die Sudomotorik betreffen (American Diabetes Association, 1988). Diese Form tritt häufig bei Patienten mit einer distal-symmetrischen

Neuropathie auf (Llewelyn, 2003). Es kann hierbei zu verschiedenen vegetativen Störungen (siehe Tabelle 1.1) kommen und zu einer signifikanten Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten führen (Boulton et al., 2005). Patienten mit Affektionen des Gastrointestinaltrakts beklagen unter anderem Ösophagusmotilitätsstörungen, Gastroparesen, Inkontinenz, Obstipation und nächtliche Diarrhoe. Eine Beteiligung des Urogenitaltrakts kann zu Blasenstörungen, wie Sphinkterinsuffizienz oder Blasenatonie mit Harnretention führen. Männliche Patienten können unter Impotenz und retrograder Ejakulation leiden (Boulton et al., 2005). Störungen der Sudomotorik, der Hauttrophik und der Gelenke führen zu schmerzlosen Hautatrophien (*Necrobiosis lipoidica diabetorum*) und Osteoarthropathien (Hacke, 2010). Die Patienten zeigen Ödeme, Nagel- und Haarwachstumsstörungen und eine dünne, glatte und trockene Haut. Ein häufiges Problem stellen die schmerzlosen perforierenden Ulzerationen der Fußsohle der Patienten dar. Die gestörte Hauttrophik begünstigt Infektionen und die Entwicklung des diabetischen Fußes, welcher in der westlichen Welt die häufigste Ursache für Fußamputationen darstellt (Caputo, 1994; Berlit, 2011). Des Weiteren können Pupillenstörungen auftreten, sowie orthostatische Regulationsstörungen (Orthostase-Syndrom) (Hacke, 2010). Besonders schwerwiegend für die Patienten ist die Beteiligung des kardiovaskulären Systems, welches zu lebensbedrohlichen kardialen Störungen führen kann, wie Ruhetachykardie, Herzfrequenzstarre, stummen Herzinfarkten und plötzlicher Herztod (Boulton et al., 2005).

Sensible Symptome:	
	Kribbeln, Ameisenlaufen Brennen, Stechen, Pochen, Elektrisieren Einschnüren, Einschneiden Druck-, Schwellungs-, Spannungs-, Taubheitsgefühl gestörte Temperaturempfindung Gangunsicherheit, Gefühl auf Watte zu gehen
Motorische Symptome:	
	Krämpfe, Faszikulationen Schwäche, Atrophie
Autonome Symptome:	
Kardiovaskulär:	orthostatische Hypotension, Synkopen Müdigkeit, Benommenheit, Schwächegefühl Ruhetachykardie, Herzfrequenzstarre stummer Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod
Gastrointestinal:	Gastroparese, Ösophagusmotilitätsstörung abdominelle Schmerzen, Unwohlsein Übelkeit, Erbrechen, Aufstoßen, Blähungen Obstipation, Diarrhoe anorektale Dysfunktion (Inkontinenz) schwankende Glukosekontrolle verminderte Hypoglykämiewahrnehmung
Urogenital:	Erektile Impotenz Blasenatonie, Harnretention, Inkontinenz Harnwegsinfekte
Sudomotorik:	Anhidrose, Hyperhidrose Hitzeintoleranz trockene Haut
Pupillomotorik:	Visuelle Unschärfe beeinträchtigte Lichtadaptation

Boulton et al., 2004; Boulton et al., 2005; Llewelyn, 2003

Tabelle 1.1: Symptomatik

1.1.5 DIAGNOSTIK

Zu den Basisuntersuchungen in der Diagnostik der diabetischen Neuropathie gehören die Anamnese, die klinisch-neurologische Untersuchung, die Elektrophysiologie und die Laboruntersuchung mit Nachweis des pathologisch erhöhten Blutglukosewerts.

In der Anamnese sollte zunächst nach der Symptomatik des Patienten, sowie nach der Dauer und dem Verlauf gefragt werden. Die Beschwerden umfassen sensible,

motorische und autonome Reiz- und Ausfallerscheinungen (Heuß et al., 2012). Die Diagnose des Diabetes mellitus ist für die Zuordnung zur diabetischen Neuropathie entscheidend, dennoch sollten weitere häufige differentialdiagnostische Ursachen für eine Neuropathie ausgeschlossen werden, wie Alkoholabusus, Chemotherapie, Hypothyreose, Mängelernährung, Hypovitaminosen oder auch eine Borrelien-Infektion. Weitere Begleiterkrankungen, Operationen und eine Familienanamnese sollten in die Anamnese miteingeschlossen werden (Hacke, 2010).

In der klinisch-neurologischen Untersuchung sind insbesondere die Sensibilität, die Motorik und der Reflexstatus zu erheben. Auch sollte auf eine Beteiligung der Hirnnerven und des autonomen Nervensystems geachtet werden. Bei der Untersuchung der Sensibilität sollte vor allem auf distale Sensibilitätsstörungen und Parästhesien geachtet werden, da diese bereits früh in Erscheinung treten können. Bei der Untersuchung des Berührungsempfindens können unter anderem eine taktile Hypästhesie oder selten sogar eine Anästhesie erhoben werden. In der Prüfung des Schmerzsinns können eine Hypalgesie, eine Analgesie oder auch eine Hyperalgesie auffällig sein. Bei einem gestörten Temperatursinn können eine Thermhypästhesie oder Thermanästhesie erhoben werden, sowie bei einer Beteiligung des Vibrationssinns eine Pallhypästhesie oder Pallanästhesie. Außerdem können ein gestörter Lagesinn, ein pathologischer Romberg-Test und Seiltänzerengang beobachtet werden (Heuß et al., 2012). Bei der Erhebung des Reflexstatus fallen zu Beginn häufig ein abgeschwächter oder fehlender Achillessehnenreflex auf. Im Verlauf kann es auch zu Ausfällen des Patellarsehnenreflexes und der Reflexe der oberen Extremität kommen. Motorische Störungen werden zunächst durch eine Kraftminderung der Dorsalextensoren der Großzehen und Füße auffällig, später kann es zu Druckdolenz, weiteren Paresen und Muskelatrophien kommen (Mumenthaler, 2008). Eine Inspektion der Haut kann trophische Störungen, wie Hautatrophien, trockene und glatte Haut oder Ulzerationen erkennen lassen und auf eine Beteiligung des autonomen Nervensystems hinweisen.

Eine elektrophysiologische Untersuchung bietet die Möglichkeit die Funktion und den Status der großen myelinisierten sensiblen und motorischen Nervenfasern zu erheben. Nerven der oberen und unteren Extremitäten können hierbei untersucht werden, wobei

pathologische Veränderungen vor allem in den distalen Abschnitten erhoben werden können und häufiger sensible Nerven betreffen (American Diabetes Association, 1988). Die Untersuchung ermöglicht eine Einteilung in eine vorwiegend axonale Schädigung mit einer Amplitudenreduktion, oder einer demyelinisierende Schädigung mit einer herabgesetzten Nervenleitgeschwindigkeit (Berlit, 2011; Hacke, 2010). Ein Ausfall vor allem der großen Fasern kann allerdings zu einer deutlichen Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit führen und damit zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit der Ergebnisse (Tankisi et al., 2007). Bei der diabetischen Neuropathie kommt es zu einem vorwiegenden Verlust von Axonen, welcher sich in einer Reduktion der Amplitude der motorischen Summenaktionspotenziale und der sensiblen Nervenaktionspotenziale zeigt. Für die sensible Neurographie können an den Beinen der N. suralis und der N. peroneus superficialis und für die motorische Neurographie der N. peroneus und der N. tibialis herangezogen werden. Für die sensible und motorische Neurographie der Arme dienen meist der N. medianus und der N. ulnaris (Heuß et al., 2012).

In der Laboruntersuchung sollte zunächst eine Basisdiagnostik durchgeführt werden und im Hinblick auf die diabetische Neuropathie der Verdacht auf eine Diabetes mellitus Erkrankung abgeklärt werden. Die laborchemische Untersuchung beinhaltet folgende Laborparameter: BSG, CRP, Differenzialblutbild, Elektrolyte, Leber- und Nierenwerte, Immunfixation, Bence-Jones-Proteine, TSH (Mumenthaler, 2008; Heuß et al., 2012). Zur diagnostischen Abklärung des Diabetes mellitus können ein Nüchternblutzucker, ein Gelegenheitsblutzucker, ein oraler Glukosetoleranztest, ein Blutzuckertagesprofil und der HbA1c-Wert erhoben werden. Der entscheidende Test für die Diagnose und zur Therapiekontrolle ist hierbei die Bestimmung des Nüchternblutzuckers. Ein unauffälliger venöser Plasma-Glukosewert liegt bei <100mg/dl. Bei einem Nüchternblutzucker-Wert von >126mg/dl liegt ein Diabetes mellitus vor, sowie bei einem Gelegenheits-Blutzucker von >200mg/dl mit entsprechenden Symptomen, wie Müdigkeit, Polyurie und Polydipsie. Bei einem Nüchternblutzucker-Wert zwischen 100mg/dl und 125mg/dl spricht man von einer abnormen Nüchtern-Glukose („impaired fasting glucose“=IFG). Zur weiteren Abklärung und bei unklaren Fällen kann ein oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT) durchgeführt

werden. Bei Werten von $<140\text{mg/dl}$ nach 2h liegen normale Ergebnisse vor. Bei Werten von $\geq 200\text{mg/dl}$ liegt ein Diabetes mellitus vor und bei Werten zwischen 140mg/dl und 199mg/dl eine gestörte Glukosetoleranz („impaired glucose tolerance“=IGT). Die Stoffwechsellage der letzten 8 bis 12 Wochen kann mithilfe der Bestimmung des HbA1c-Werts beurteilt werden, welcher durch Glykierung des Hämoglobins entsteht und das „Blutzuckergedächtnis“ darstellt. Zur weiteren Abklärung der Erkrankung kann eine Bestimmung der Glukose im Urin und bei speziellen Fragestellungen eine kontinuierliche Blutzucker-Messung über 72h durchgeführt werden (Herold, 2016).

Ergänzend können bei unklarer Ätiologie oder zum Ausschluss weiterer Ursachen weiterführende Untersuchungen folgen, wie zusätzliche Labor- und Liquor-Untersuchungen, genetische Untersuchungen und Haut-, Nerven oder Muskelbiopsien. In der Liquor-Untersuchung kann bei einer diabetischen Neuropathie eine leichte bis mäßige Eiweißvermehrung bei normaler Zellzahl auffällig sein (Hacke, 2010). Die quantitativ sensorische Testung (QST) ermöglicht die Funktionserhebung des Nervenstatus der Patienten indem mit unterschiedlichen Testverfahren unter anderem die Warm-, Kalt-, Vibrations- und Druckschmerzschwellen ermittelt werden (Hacke, 2010). Sie stellt eine wichtige ergänzende Untersuchung neben den elektrophysiologischen Messungen dar, da hierbei nur große Nervenfasern erfasst werden. Die QST bietet somit als zuverlässige Methode die Möglichkeit, sowohl den Funktionszustand der großen, als auch der kleinen Nervenfasern zu erheben (Siao et al., 2003; Jia et al., 2014). Dysfunktionen des peripheren oder zentralen Nervensystems verursachen auffällige Messergebnisse in der QST, welche somit erfasst werden können. In Patienten mit einer frühen diabetischen Neuropathie können unter anderem auffällige Warmschwellen erfasst werden (Jia et al., 2014). Äußere Einflussfaktoren, sowie ein Mangel an Objektivität können jedoch die Ergebnisse beeinflussen, weshalb eine Interpretation in Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Patienten vonnöten ist (Siao et al., 2003). Die Hautbiopsie stellt eine minimal-invasive Methode dar, welche es ermöglicht die intraepidermale Nervenfaserdichte mit standardisierten Methoden zu erheben. In Patienten mit

schmerzhafter sensibler Neuropathie, wie der Small-fiber Neuropathie, stellt diese eine geeignete diagnostische Methode der Quantifizierung von unmyelinisierten Nervenfasern dar, vor allem wenn die elektrophysiologische Untersuchung unauffällige Ergebnisse zeigt (Lauria et al., 2005; Sommer, 2008; Vlckova-Moravcova et al., 2008). Eine Nervenbiopsie ist zur Abklärung der diabetischen Neuropathie in der Regel nicht nötig, da diese eine invasive Methode darstellt und keine Therapiekonsequenz ergibt. Sie ist vorwiegend zur Abklärung von differentialdiagnostischen Ursachen, wie Vaskulitis, Sarkoidose, CIDP, Lepra oder Amyloidose indiziert (England et al., 2009; Sommer et al., 2010). Diese Methode sollte erst nach einer ausführlichen Diagnostik, wie Anamnese, klinische und laborchemische Untersuchungen sowie Elektrophysiologie zur Abklärung von Neuropathien mit unklarer Ätiologie zum Einsatz kommen (Sommer et al., 2010). Bei einer asymmetrischen diabetischen Neuropathie mit der Fragestellung auf eine zusätzliche Vaskulitis kann eventuell eine Nervenbiopsie des N. suralis erwogen werden (Heuß et al., 2012).

Die Diagnose der diabetischen Neuropathie sollte erst nach einer ausführlichen klinischen Untersuchung gestellt werden und andere Ursachen, wie u.a. eine chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP), ein Vitamin B12- Mangel, eine Hypothyreose und eine Urämie sollten ausgeschlossen werden. Die Kombination aus typischen Symptomen, wie distaler Sensibilitätsverlust, oder klinischen Zeichen in der neurologischen Untersuchung sollten an eine diabetische Neuropathie denken lassen (Boulton et al., 2005). Die Diagnose sollte weiterhin nicht anhand eines Symptoms, eines klinischen Zeichen oder einer Untersuchung gestellt werden. Mindestens zwei pathologische Ergebnisse in den Untersuchungen, wie Symptome, klinische Zeichen, Elektrophysiologie oder QST sollten als Diagnosekriterien herangezogen werden (Dyck, 2003). Weiterhin sollten Patienten mit Diabetes mellitus regelmäßig in Hinblick auf eine beginnende diabetische Neuropathie untersucht werden. Der neurologische Status der unteren Extremität kann hierbei mithilfe von Nadelreizen (Pinpricks), Reflextestung und Untersuchungen zur Temperatur-, Vibrations-, Druck- und Berührungsempfindung erhoben werden (Boulton et al, 2005).

Die Diagnostik der autonomen Neuropathie kann je nach betroffenem Organsystem und Ausprägung der Dysfunktion verschiedene Untersuchungen umfassen. Hierbei können unter anderem Langzeitblutdruckmessungen, EKG, Orthostase-Tests, Ermittlung der Herzfrequenzvariabilität, Bestimmung von Katecholaminen, Ruhe- und Stressszintigraphie, Sonographie, Endoskopie und Manometrie zum Einsatz kommen. Patienten mit Diabetes mellitus sollten regelmäßig bezüglich der Entwicklung von autonomen Symptomen befragt und untersucht werden (Boulton et al., 2005; England et al., 2009).

1.1.6 THERAPIE

In der Behandlung der diabetischen Stoffwechsellage und des neuropathischen Schmerzes spielen die nicht-medikamentöse und medikamentöse Therapie eine wichtige Rolle. Entscheidend sind hierbei eine Verbesserung der Lebensqualität und der Schlafqualität der Patienten, eine Schmerzreduktion und der Erhalt der Selbständigkeit (Baron et al., 2012). Zur Basistherapie des Diabetes mellitus gehört eine frühzeitige Patientenschulung, eine Gewichtsnormalisierung, diätetische Maßnahmen und eine ausreichende körperliche Aktivität (Herold, 2012). Bei Patienten mit einer eingeschränkten Glukosetoleranz, als mögliches Frühstadium einer diabetischen Neuropathie, können eine konsequente Ernährungsumstellung und eine ausreichende körperliche Betätigung zu einem Anstieg der Hautinnervation (IENFD) und zu einer Reduktion des neuropathischen Schmerzes führen (Smith et al., 2006). Neben dieser Basistherapie ist eine optimale medikamentöse Diabeteseinstellung mithilfe von oralen Antidiabetika, konventioneller oder intensivierter Insulintherapie entscheidend. Für Patienten mit Insulin-abhängigem Diabetes mellitus spielt die konsequente medikamentöse Therapie die wichtigste Rolle. Eine adäquate Blutzuckereinstellung durch eine intensivierte Insulintherapie kann hierbei den Beginn bzw. den Progress der Folgekomplikationen, wie diabetische Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie verhindern (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993).

Ein weiterer Aspekt in der Therapie ist die Ausschaltung und Therapie von Risikofaktoren. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie erhöhte Triglyceride, ein erhöhter

Body-Mass-Index, Rauchen und Hypertension spielen ebenso eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der diabetischen Neuropathie. Diese Risikofaktoren sollten daher regelmäßig kontrolliert und in die Behandlung der Patienten miteingeschlossen werden (Boulton et al., 2005; Tesfaye et al., 2005). Im Hinblick auf die Entwicklung eines diabetischen Fußes als Folge der Erkrankung sollten bei den Patienten regelmäßig Inspektionen der Füße durchgeführt werden, sowie Schulungen der Patienten zu Fußpflege und zu richtigem Schuhwerk. Bei bereits vorhandenen Ulzerationen und Infektionen können eine Unterpolsterung der betroffenen Areale, eine antibiotische Therapie, ein sorgfältiges Wundmanagement oder operative Maßnahmen helfen (Caputo et al., 1994). Die Therapie der autonomen Neuropathie ist vielfältig und richtet sich nach den Beschwerden der Patienten und der Ausprägung der Symptome. Es kommen unter anderem medikamentöse Behandlungen, wie ACE-Hemmer und β -Blocker bei kardialen Dysfunktionen oder Prokinetika und Antiemetika bei gastrointestinalen Beschwerden, mechanische Verfahren, wie Stützstrümpfe bei vaskulären und orthostatischen Dysfunktionen oder Katheterisierung bei Harnretention, diätetische Maßnahmen oder operative Maßnahmen, wie Schrittmacherimplantationen zum Einsatz (Boulton et al., 2005). Bei Patienten mit Typ-1-Diabetes können Pankreastransplantationen zur Verbesserung der diabetischen Neuropathie durch Herbeiführen eines normoglykämischen Blutzuckerhaushaltes führen (Kennedy et al., 1990; Navarro et al., 1997). Einheitliche Ergebnisse zur Nervenregeneration wurden allerdings bisher noch nicht gefunden und lassen an einen irreparablen Nervenschaden auch nach einer langen Observationszeit für eine postoperative Normoglykämie denken (Boucek et al. 2005, Boucek et al., 2008, Havrdova et al., 2016). Die Möglichkeit für Pankreastransplantationen steht allerdings nur ausgewählten Fällen zur Verfügung. Andere kausale Therapieansätze zur Behandlung der diabetischen Neuropathie stehen bisher nicht zur Verfügung.

Zur medikamentösen Therapie des neuropathischen Schmerzes werden als Mittel der Wahl trizyklische Antidepressiva (TCA), selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSNRI) und Antikonvulsiva empfohlen (Baron et al., 2012). Amitriptylin, als TCA, und Duloxetin, als SSNRI, werden hierbei zur Behandlung von

neuropathischen Schmerzen bei diabetischer Neuropathie empfohlen (Kaur et al., 2011). Die Antikonvulsiva Gabapentin und Pregabalin gehören ebenso zur ersten Wahl in der Behandlung der neuropathischen Schmerzen. In verschiedenen Studien konnte die gute Wirksamkeit dieser Antikonvulsiva bei diabetischer Neuropathie bestätigt werden (Attal et al., 2010; Wiffen et al., 2013). Bei einer Therapieresistenz kann die Indikation zur Gabe von Opioiden unter Beachtung der Nebenwirkungen, wie Sedierung, Obstipation und Miosis überprüft werden (Baron et al., 2012). Die Wirksamkeit von Oxycodon bei schmerzhafter diabetischer Neuropathie konnte in einigen Studien gezeigt werden (Gimbel et al., 2003; Watson et al., 2003). Als weitere Therapieoption steht die Anwendung eines Lidocain-Pflaster zur Verfügung (Baron et al., 2012). Die topische Anwendung des Pflasters kann zu einer Reduktion des neuropathischen Schmerzes beitragen (Meier et al., 2003; Baron et al., 2009). Neben diesen bevorzugten Behandlungsoptionen, gibt es noch einige weitere Therapiemöglichkeiten. In einigen Fällen kann die Gabe des Radikalfängers Alpha-Liponsäure erwogen werden, der zu einer Verbesserung neuropathischer Symptome und Schmerzen in diabetischer Neuropathie führen kann (Ziegler et al., 2004; Ziegler et al., 2006; Baron et al., 2012). In einer Studie konnte bei der Anwendung von Nabilon, einem Cannabinoid-Derivat, eine Verbesserung der Symptome, der Schlaf- und Lebensqualität von Patienten mit schmerzhafter diabetischer Neuropathie nachgewiesen werden (Toth et al., 2012). Neben der medikamentösen Therapie können weitere nicht-medikamentöse Behandlungsoptionen, wie physikalische Therapien, Ergotherapien, Psychotherapien und die transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS) zur Schmerzbewältigung und Verbesserung der Lebensqualität des Patienten beitragen (Baron et al., 2012).

1.2 Nervenfasern

1.2.1 AUFBAU DER NERVENFASER

Die Nervenzelle besteht aus einem Zellkörper (Soma) und mehreren Fortsätzen. Am Zellkörper verzweigen sich die Dendriten, welche über ihre synaptischen Kontakte den Informationseingang ermöglichen (afferent). Ein weiterer Fortsatz stellt das Axon (Neurit) dar, welches am initialen Segment abgeht und mit seinen Axonterminalen für eine Informationsweiterleitung sorgt (efferent). Das Axon kann eine Länge von 100 µm bis 1 m und einen Durchmesser von 0,5 µm bis 20 µm erreichen (Silbernagel et al., 2010).

1.2.2 MYELINISIERUNG

Im zentralen Nervensystem werden die Myelinscheiden von den Oligodendrozyten gebildet, welche gleichzeitig mehrere Axone umhüllen können. Im peripheren Nervensystem werden die Axone von den Schwann-Zellen umhüllt, wobei immer nur ein Abschnitt des Axons umhüllt werden kann (Garbay et al., 2000; Silbernagel et al., 2010). Hierbei ist es wichtig zwischen unmyelinisierten und myelinisierten Nervenfasern zu unterscheiden. Unmyelinisierte dünne Nervenfasern weisen keine Myelinscheide auf, werden jedoch in ihrem Verlauf von Schwann-Zellen bündelweise begleitet. Die Axonen der Nervenfasern sind von den Schwann-Zellen durch einen Spalt des Extrazellulärraumes getrennt und somit nicht myelinisiert. Bei myelinisierten Nervenfasern wickeln sich die Schwann-Zellen in mehreren Schichten um die Axone von dickeren Nervenfasern. Diese Myelinscheide hat jeweils eine Länge von 1-2 mm und bildet das Internodium (Silbernagel et al., 2010). Zwischen diesen Internodien der Schwann-Zellen liegt die Axonmembran frei und ist von Extrazellulärflüssigkeit umgeben. Diese Strukturen werden als Ranvier-Schnürringe bezeichnet (Garbay et al., 2000; Silbernagel et al., 2010). Sie bilden einen wichtigen Abschnitt für die Weiterleitung der Aktionspotenziale und somit für die Informationsübertragung. Außerdem spielt die Myelinhülle in diesem Bereich eine wichtige Rolle für die axonale Integrität (Simons et al., 2007).

Die Lipiddoppelschichten der Myelinhülle (Markhülle) bestehen aus hydrophoben Glykoproteinen und sorgen somit für einen hohen elektrischen Widerstand mit einer niedrigen elektrischen Leitfähigkeit. Der Widerstand an der Axonmembran ist im Gegensatz dazu relativ gering und weist eine hohe Anzahl an Na-Kanälen auf, welche für eine schnelle Fortleitung des Aktionspotenzials sorgen (Garbay et al., 2000; Silbernagel et al., 2010). Die elektrische Isolation durch die Myelinscheiden und der Aufbau der Ranvier-Schnürringe sorgen für eine sprunghafte (saltatorische) Erregungsleitung des Nervenaktionspotenzials (Garbay et al., 2000; Simons et al., 2007). Durch diese Strukturen wird die Nervenleitgeschwindigkeit der myelinisierten Nervenfasern auf bis zu 120 m/s erhöht. Dünne nichtmyelinisierte Nervenfasern weisen hingegen eine geringere Nervenleitgeschwindigkeit von 0,5-2 m/s auf. Die Nervenleitgeschwindigkeit steigt zusätzlich mit zunehmendem Durchmesser der Axone. Mit fortschreitendem Alter kommt es zu einem Verlust der Dicke der Myelinscheiden, zu einem geringeren Membranwiderstand und somit zu einer physiologischen Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit (Silbernagel et al., 2010).

Die Nervenfasern können nach Erlanger und Gasser anhand der Myelinisierung, des Durchmessers und somit der Nervenleitgeschwindigkeit eingeteilt werden (siehe Tabelle 1.2).

Fasertyp	Myelinisierung	Durchmesser (µm)	NLG (m/s)	Funktion: Efferenz	Funktion: Afferenz
Aα	myelinisiert	10-20	60-120	Skelettmuskulatur (extrafusal)	Muskelspindel, Golgi-Sehnenorganen
Aβ	myelinisiert	5-12	30-75		Mechanorezeptoren der Haut (Berührung, Druck, Vibration), Tiefensensibilität
Aγ	myelinisiert	4-8	20-40	Spindelmuskulatur (intrafusal)	
Aδ	dünn myelinisiert	2-5	10-30		Mechano-, Thermorezeptoren, Nozizeption der Haut („schneller Schmerz“)
B	dünn myelinisiert	1-3	3-20	Präganglionäre vegetative Fasern	
C	nicht-myelinisiert	0,5-1,5	0,5-2	Postganglionäre vegetative Fasern	Mechano-, Thermo-, Chemorezeptoren, Nozizeption („langsamer Schmerz“)

Tabelle 1.2: Einteilung der Nervenfasern nach Erlanger und Gasser (Silbernagel et al., 2010).

1.2.3 SCHNÜRRINGARCHITEKTUR

Die beteiligten Strukturen der myelinisierten Nervenfasern sind stark komprimiert und lassen einen spezifischen Bereich mit vier Kompartimenten erkennen. Dieser setzt sich aus der nodalen Region des Ranvier-Schnürrings, der paranodalen Region, der juxtapanodalen Region und den Internodien zusammen. Jede Region besteht hierbei aus spezialisierten nicht-überlappenden Protein-Komponenten (Myers et al., 2013). Die nodalen Regionen der Ranvier-Schnürringe sind verantwortlich für die saltatorische Erregungsleitung der Nervenaktionspotenziale. In diesem Bereich befinden sich diskrete Banden von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen, vor allem Nav1.6 aber auch 1.2, 1.8 und 1.9, welche durch AnkyrinG (480 und 270kDa) in der nodalen Region verankert sind. Weitere interagierende Komponenten sind Neurofascin-186 und Spectrin (Scherer et al., 2002; Sherman et al., 2005). Daneben befindet sich die paranodale Region, welche die Windungen der Myelinhülle der Schwann-Zellen beinhaltet. Wichtige Komponenten in dieser Region sind Contactin-associated protein (Caspr), Contactin und Neurofascin-155, welche als Zelladhäsionsproteine für eine Interaktion zwischen den Schwann-Zellen und den Axonen („axogliale Junction“)

sorgen und für die elektrische Isolation der nodalen Region verantwortlich sind (Scherer et al., 2002; Sherman et al., 2005; Myers et al., 2013). Diskrete und symmetrische Banden mit Caspr flankieren den Ranvier-Schnürring in diesem Bereich und sind auch spiralförmig entlang des Mesaxons der umgebenden Schwann-Zelle zu erkennen (Scherer et al., 2002; Myers et al., 2013). Angrenzend befindet sich die juxtaparanodale Region mit den spannungsabhängigen Kalium-Kanälen (Kv1.1 und 1.2), deren β 2-Untereinheit und Caspr2 (Scherer et al., 2002). Im Bereich zwischen zwei Schnürringen befinden sich die Internodien. Sie beinhalten strukturelle Proteine des Myelins, wie MPZ (myelin protein zero), PMP22 (peripheral myelin protein 22) und MBP (myelin basic protein). Diese Proteine sorgen für eine stark verdichtete Myelinhülle und reduzieren damit den elektrischen Widerstand der Internodien (Myers et al., 2013). Durch immunhistochemische Färbungen lassen sich diese Strukturen darstellen. Die Myelinscheide der Internodien lässt sich mithilfe von Antikörpern gegen MBP (myelin basic protein), MPZ (myelin protein zero) und PMP22 (peripheral myelin protein 22) darstellen. Mit Antikörpern gegen PGP 9.5 (protein gene product 9.5) kann das Axon der Nervenfasern dargestellt werden. Die paranodale Region kann mit Antikörpern gegen Caspr (contactin-associated protein), die juxtaparanodale Region mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalium-Kanäle (Kv1.2) und die nodale Region mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Natrium-Kanäle (Pan.Na.) identifiziert werden (Li et al., 2005).

1.2.4 HAUTINNERVATION

Die Haut dient nicht nur als Schutzbarriere vor äußeren Einflüssen, sondern ist auch das größte Sinnesorgan des Körpers. Die Axonterminalen formen innerhalb der Haut sensible Nervenendigungen, welche Reize in einem bestimmten Hautareal wahrnehmen. In Hautarealen, in welchen eine hohe Auflösung für taktile Wahrnehmungen erforderlich ist, findet sich eine hohe Innervationsdichte an Nervenfasern, wie zum Beispiel in der unbehaarten Haut der palmaren Seite der Hände oder der plantaren Seite der Füße (Proviterra et al., 2007; Rice et al., 2008; Silbernagel et al., 2010). Als afferente Nervenfasern versorgen die A β -, A δ - und C-Fasern mit ihren sensiblen Nervenendigungen ein Innervationsgebiet der Haut, sowie Blutgefäße und

Schweißdrüsen. Sie sind als Sinnesrezeptoren für die Wahrnehmung von sensiblen Reizen und Gefäßwandveränderungen verantwortlich. Dabei ist zwischen den korpuskulären und freien Nervenendigungen zu unterscheiden. Die freien Nervenendigungen werden von den dünn myelinisierten A δ -Fasern und den unmyelinisierten C-Fasern gebildet und vermitteln verschiedene Modalitäten, wie mechanische, thermische, chemische und nozizeptive Reize (Silbernagel et al, 2010; Myers et al., 2013). Bei Temperaturveränderungen, welche durch die Thermorezeptoren vermittelt werden, werden warme Reize von den C-Fasern weitergeleitet und kalte Reize vor allem von den A δ -Fasern (Provitera et al., 2007; Silbernagel et al, 2010). Die freien Nervenendigungen verzweigen sich aus dem subepidermalen Nervenplexus und enden entweder in der Dermis oder verlaufen nach Durchbrechen der Basalmembran in der Epidermis. Die dünn myelinisierten A δ -Fasern verlieren ihre Myelinscheide bevor sie in die Dermis eintreten und erscheinen folglich unmyelinisiert und nicht von den C-Fasern unterscheidbar (Provitera et al., 2007). Die korpuskulären Nervenendigungen werden von den myelinisierten schnell leitenden A β -Fasern gebildet und nehmen als Mechanorezeptoren mechanische Sinneseindrücke auf. Diese großkalibrigen Nervenfasern verlaufen im Stratum reticulare und Stratum papillare der Dermis. In der Haut befinden sich unterschiedliche Mechanorezeptoren für die Wahrnehmung von verschiedenen Modalitäten. Für die Wahrnehmung von Druck und Berührung sind die Merkel-Zellen in der untersten Schicht der Epidermis (Lamina basalis) und der äußersten Schicht der Haarfollikel zuständig. Die Wahrnehmung von schnell wechselnder Berührung und Vibration wird von den Meissner-Körperchen vermittelt, welche sich in den dermalen Papillen der unbehaarten Haut befinden. In der behaarten Haut wird diese Funktion von den Haarfollikelrezeptoren übernommen. Die Ruffini-Körperchen sind in der Dermis der Haut lokalisiert und sind für die Wahrnehmung von Druck und Spannung verantwortlich. Die in der Subkutis der Haut gelegenen Pacini-Körperchen übernehmen die Vermittlung von Vibration und Berührung (Rice et al., 2008; Silbernagel et al., 2010; Myers et al., 2013).

1.3 Hautbiopsien

Hautbiopsien stellen eine zuverlässige, minimal-invasive diagnostische Methode dar, um neuropathische Prozesse untersuchen zu können. Als diagnostische Methode zur Quantifizierung der kleinen Nervenfasern bei der Small-fiber Neuropathie, eine Erkrankung welche vorwiegend die A δ - und C-Fasern betrifft, spielen sie eine wichtige Rolle (Nolano et al., 2003; Provitera et al., 2007). Die Hautbiopsien werden meist mit einer Stanzbiopsie mit einem Durchmesser von 3-5 mm entnommen. Die Prozedur kann an verschiedenen Körperstellen wiederholt durchgeführt werden (Nolano et al, 2003; Li et al, 2005;). Die Hautbiopsien sollten nach einer sorgfältigen Schulung unter einer standardisierten Vorgehensweise entnommen und verarbeitet werden. Sie stellt eine sichere Methode dar, solange eine sterile Durchführung und ausreichende Blutstillung garantiert wird (Lauria et al., 2010). Die Proben der Haut enthalten die Epidermis und die oberflächliche Dermis mit dem Stratum reticulare und Stratum papillare. Durch immunhistochemische Färbungen der Schnitte lassen sich die verschiedenen Strukturen, wie Nervenfasern, Schweißdrüsen und Gefäße in den unterschiedlichen Hautschichten untersuchen (Nolano et al, 2003; Li et al, 2005; Sommer et al., 2007). Die Hautbiopsie kann als ergänzende Methode zu elektrophysiologischen Messungen und zur Nervenbiopsie des N. suralis in der Diagnostik von Polyneuropathien eingesetzt werden (Nolano et al., 2003; Provitera et al., 2007). Mithilfe der Suralisbiopsie können myelinisierte Nervenfasern untersucht werden, welche jedoch einen operativen Eingriff erfordert und zu einem Sensibilitätsverlust im entsprechenden Innervationsgebiet führt (Nolano et al., 2003; Li et al., 2005; Sommer et al., 2010). Die Funktion der großkalibrigen myelinisierten Nervenfasern kann außerdem mit elektrophysiologischen Messungen untersucht werden. Neuropathische Prozessen, welche auf die am weitesten distal gelegenen Abschnitte der Nervenfasern beschränkt sind oder die kleinen Nervenfasern („small-fibers“) betreffen, werden allerdings nicht erfasst. Die Quantifizierung der kleinen Nervenfasern in Hautbiopsien bietet hierbei eine hilfreiche diagnostische Möglichkeit (Nolano et al., 2003; Lauria et al. 2005; Provitera et al., 2007; Lauria et al., 2010).

Die Hautbiopsien ermöglichen die Quantifizierung von sensiblen myelinisierten Nervenfasern („large-fibers“), epidermalen unmyelinisierten Nervenfasern („small-fibers“) und sudomotorischen bzw. vasomotorischen Fasern in der unbehaarten und behaarten Haut (Nolano et al., 2003). In Proben der unbehaarten Haut befinden sich unmyelinisierten Nervenfasern und zahlreiche myelinisierte Nervenfasern. Letztere verlaufen vor allem in der oberen Dermis zu den dermalen Papillae und den Mechanorezeptoren, wie Merkel-Zellkomplexe und Meissner-Körperchen. In der tieferen Schicht der Dermis verlaufen Bündel mit myelinisierten Nervenfasern zu Ruffini-Körperchen, Pacini-Körperchen und vaskulären Strukturen (Li et al., 2005; Provitera et al., 2007). In Hautbiopsien der behaarten Haut finden sich unmyelinisierte Nervenfasern und weniger zahlreich auch myelinisierte Nervenfasern, welche unregelmäßig verteilt vor allem in tieferen Schichten der Dermis verlaufen. Hauptziele der Nervenfasern stellen vaskuläre Strukturen und Haarfollikel dar (Li et al., 2005; Provitera et al., 2007). Als Biopsiestellen der behaarten Haut dienen bevorzugt der distale Unterschenkel und der proximale Oberschenkel (Lauria et al., 2010). Die Untersuchung der Biopsien des Ober- und Unterschenkels ermöglicht es eine längenabhängige Beteiligung der myelinisierten und unmyelinisierten Nervenendigungen feststellen zu können (Li et al., 2005; Provitera et al., 2007).

1.3.1 VERÄNDERUNGEN IN HAUTBIOPSIIEN

Die Ermittlung der intraepidermalen Nervenfaserdichte in Hautbiopsien stellt eine zuverlässige Methode dar, um die Diagnose einer Small-fiber Neuropathie bestätigen zu können (Lauria et al., 2010). Hautbiopsien können bei verschiedenen anderen Erkrankungen und Krankheitsprozessen hilfreich für die Diagnostik und die Ursachensuche sein. Bei Patienten mit Neuropathien werden Hautbiopsien eingesetzt, um die unterschiedlichen Veränderungen der Nervenfasern untersuchen zu können. In Hautbiopsien von Patienten mit diabetischer Neuropathie können sowohl eine reduzierte Anzahl an epidermalen, als auch dermalen Nervenfasern gefunden werden (Kennedy et al., 1996; Hirai et al., 2000). In einer Studie von Doppler et al. wurde eine reduzierte Anzahl an myelinisierten Nervenfasern in Hautbiopsien des Oberschenkels von Patienten mit einer Polyneuropathie gefunden, dabei war der Verlust stärker bei

Patienten mit einer axonalen Neuropathie, als bei Patienten mit einer demyelinisierenden Neuropathie ausgeprägt (Doppler et al., 2012). In Patienten mit immunologisch-vermittelten und hereditären Neuropathien können solche Veränderungen auch beobachtet werden. Bei Patienten mit der hereditären Charcot-Marie-Tooth Neuropathie können in Hautbiopsien Abnormitäten der Myelinhülle in dermalen myelinisierten Nervenfasern beobachtet werden (Li et al., 2005; Saporta et al., 2009). Bei einigen weiteren Erkrankungen, wie Lepra, Hypothyreose, Parkinson oder nach Einnahme von neurotoxischen Medikamenten ermöglicht die Hautbiopsie die Beteiligung der Nervenfasern zu untersuchen und zu quantifizieren (Lauria et al., 2009). Auch bei Patienten mit einer HIV-Erkrankung, welche eine schmerzhaft Neuropathie verursachen kann und vorwiegend die kleinen Nervenfasern betrifft, werden Veränderungen in Hautbiopsien, wie eine reduzierte Anzahl der epidermalen Nervenfasern beobachtet (Polydefkis et al., 2002).

Erkrankungen des peripheren Nervensystems betreffen vorwiegend die Axone (axonale Neuropathie) oder die Myelinhülle (demyelinisierende Neuropathie). Demyelinisierende Erkrankungen betreffen primär die Myelinscheide und zerstören häufig die molekulare Architektur der myelinisierten Nervenfasern mit falscher, fehlender oder gesteigerter Proteinexpression, veränderten Ionenkanal-Lokalisationen und führen zu einer nachlassenden Verdichtung der Myelinhülle (Myers et al., 2013). In Hautbiopsien von Patienten mit einer hereditären Charcot-Marie-Tooth (CMT) Neuropathie konnten Li et al. eine segmentale Demyelinisierung mit einer verkürzten Länge der Internodien beobachten. Die Caspr-Färbung zeigte eine verbreiterte Ausdehnung bis in den Bereich der Internodien, anstelle der diskreten Banden in der paranodalen Region (Li et al., 2005). Saporta et al. konnten ebenfalls eine veränderte Schnürringarchitektur in Hautbiopsien von Patienten mit einer CMT-Erkrankung und Patienten mit einer chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) beobachten. Bei Patienten mit einer CMT wurden im Vergleich zu den Kontrollen verkürzte Internodien gefunden. Auch bei den Patienten mit einer CIDP wurden verkürzte Internodien und segmentale Demyelinisierungen in den paranodalen Regionen mit einer Verlängerung der Ranvier-Schnürringen nachgewiesen. Die

auffälligen Proben zeigten zusätzlich eine asymmetrische Caspr-Anfärbung der paranodalen Region (Saporta et al., 2009). In einer Studie von Doppler et al. konnten in Hautbiopsien des Oberschenkels verlängerte Schnürringe in Patienten mit einer demyelinisierenden Neuropathie gefunden werden, jedoch nicht in Patienten mit einer axonalen Neuropathie (Doppler et al., 2012). In einer weiteren Studie von Doppler et al. wurde die Schnürringarchitektur in Hautbiopsien des Fingers und des Oberschenkels von Patienten mit demyelinisierender und axonaler Neuropathie und Kontrollen untersucht. Verlängerte Schnürringe und verbreiterte Caspr-Anfärbungen wurden häufiger bei Patienten mit einer demyelinisierenden Neuropathie gefunden, als bei Patienten mit einer axonalen Neuropathie. Verbreiterte Neurofascin-Anfärbungen wurden ebenso in den Hautbiopsien der Patienten beobachtet (Doppler et al., 2013).

1.3.2 VERÄNDERUNGEN IN HAUTBIOPSIIEN VON PATIENTEN MIT DIABETISCHER NEUROPATHIE

Hautbiopsien von Patienten mit diabetischer Neuropathie wurden schon früh auf Veränderungen der intraepidermalen Nervenfasern untersucht. Eine Reduktion der epidermalen Nervenfasern konnte hierbei nachgewiesen werden (Kennedy et al., 1996). In Patienten mit Diabetes mellitus wurde eine längenabhängige Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) gefunden, welche ein Merkmal für eine frühe asymptomatische diabetische Neuropathie darstellen soll. Korrelationen zwischen der Erkrankungsdauer bzw. dem HbA1c-Wert und der IENFD wurden hierbei nicht gefunden (Umapathi et al., 2007). In einer weiteren Studie wurde eine Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der reduzierten Nervenfaserdichte in Hautbiopsien von Patienten mit diabetischer Neuropathie gefunden. Eine Korrelation mit dem HbA1c-Wert zeigte sich nicht (Shun et al., 2004). In vielen weiteren Studien konnten die Ergebnisse der signifikanten Reduktion der IENFD in Patienten mit Diabetes mellitus und diabetischer Neuropathie im Vergleich zu Kontrollen bestätigt werden. Die Patienten mit diabetischer Neuropathie zeigten hierbei im Vergleich zu den Gruppen ohne Neuropathie bzw. zu den Kontrollgruppen die geringste Dichte an intraepidermalen Nervenfasern (Kennedy et al., 1996; Polydefkis et al., 2001; Loseth et al., 2008; Timar et al., 2016). Die IENFD wurde als Marker für den Krankheitsverlauf

einer diabetischen Neuropathie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der jährliche Verlust der Nervenfasern bei Patienten mit Diabetes mellitus und bei Patienten mit diabetischer Neuropathie höher war als in der Kontrollgruppe (Divisova et al., 2016). In einer weiteren Studie wurde der Krankheitsprogress über einen Zeitraum von fünf Jahren in Patienten mit einer diabetischen Neuropathie in Bezug auf eine „small-fiber“- und „large-fiber“-Beteiligung untersucht. In der elektrophysiologischen Untersuchung wurde sowohl in den Patienten mit einem Typ 1, als auch in den Patienten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus ein Verlust der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials und somit ein langsamer Funktionsverlust der „large-fibers“ gefunden. Allerdings wurde ein größerer Verlust der intraepidermalen Nervenfaserdichte und somit eine schnellere Progression der „small-fibers“ über diesen Zeitraum gefunden (Loseth et al., 2016). Die Hautbiopsien wurden bisher häufig dafür verwendet, unmyelinisierte Nervenfasern bei Patienten mit diabetischer Neuropathie zu untersuchen. Eine Beteiligung der myelinisierten Nervenfasern oder eine Kombination der Beteiligung der Nervenfasern in Hautbiopsien wurde bisher selten analysiert. Meist wurden hierfür Nervenbiopsien des N. suralis zur Analyse der unmyelinisierten und myelinisierten Nervenfasern herangezogen. Die charakteristischen pathologischen Merkmale der diabetischen Neuropathie, wie die axonale Degeneration und die segmentale Demyelinisierung wurden hierbei in einigen Studien untersucht und bestätigt. In Bezug auf die axogliale Dysjunktion, als weiteres pathologisches Merkmal der diabetischen Neuropathie, bei welcher die komplexe Struktur der axonalen Integrität beeinträchtigt wird, wurden keine einheitlichen Ergebnisse gefunden (Sima et al., 1988; Thomas et al., 1996; Said et al., 2008). So zeigte sich bei Sima et al. eine Häufung von axogliale Dysjunktion bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I, jedoch nicht bei Typ II Patienten im Vergleich zu den Kontrollen (Sima et al., 1988). Thomas et al. konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Thomas et al., 1996). In experimentellen Studien wurden pathologische Merkmale der Nervenfasern auch anhand von Tiermodellen untersucht und Veränderungen der Schnürringarchitektur beobachtet. Es konnte mittels Immunhistochemie unter anderem eine veränderte und reduzierte Anzahl an Natrium-Kanal-Anfärbungen an

den Schnürringen sowie an paranodalen Caspr-Anfärbungen und in elektronenmikroskopischen Untersuchungen axogliale Separationen gefunden werden (Sima et al., 2004; Hong et al., 2005; Lennertz et al., 2011). In einer Studie von Peltier et al. wurden in Hautbiopsien des Fingers von Patienten mit einer diabetischen Neuropathie Mechanorezeptoren mit den dazugehörigen myelinisierten Nervenendigungen untersucht. Hierbei konnten auch bei Patienten mit einer schweren Erkrankungsform Nervenfasern aufgrund der hohen Anzahl an Fasern in der unbehaarten Haut untersucht werden. In Patienten mit diabetischer Neuropathie zeigte sich in der Studie eine signifikant reduzierte Anzahl an Meissner-Körperchen und deren afferenten myelinisierten Nervenfasern. Dieser axonale Verlust korrelierte mit der reduzierten sensiblen und motorischen Antwort des N. medianus und der motorischen Antwort des N. ulnaris in der elektrophysiologischen Untersuchung. Ein stärkerer Verlust an myelinisierten Nervenfasern wurde in Patienten mit einem Typ I Diabetes mellitus gefunden, welche auch einen längeren Krankheitsverlauf und eine größere Amplitudenreduktion in der Elektrophysiologie zeigten. In der Gruppe der Patienten mit einem Typ II Diabetes mellitus ergaben sich keine Hinweise auf einen signifikanten Unterschied in der Dichte der Meissner-Körperchen und den myelinisierten Nervenfasern im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Außerdem wurde die Integrität der Myelinhülle der myelinisierten Nervenfasern in der papillaren und in der tieferen Schicht der Dermis analysiert. Hierbei waren an verkürzten Internodien segmentale Demyelinisierungen, die Bildung von Heminodien und eine Ausbreitung der Natrium-Kanal Färbung entlang des Axolemmas erkennbar. In dieser Studie konnten somit charakteristische Pathologien wie der Verlust an Axonen und die segmentale Demyelinisierung mit einzelnen Auswirkungen auf die Schnürringarchitektur bei Patienten mit diabetischer Neuropathie untersucht werden (Peltier et al., 2013).

Die Methode der Hautbiopsie ermöglicht es somit sowohl unmyelinisierte, als auch myelinisierte Nervenfasern zu untersuchen. Hierbei können die am weitesten distal gelegenen Nervenabschnitte, welche im Krankheitsverlauf der diabetischen Neuropathie meist zuerst betroffen sind, untersucht werden. Durch die

immunohistochemische Färbung und Darstellung der myelinisierten Nervenfasern wird zudem eine Möglichkeit geschaffen, die Struktur der Proteine im Bereich der Schnürringe zu untersuchen. In den bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei der diabetischen Neuropathie zu einer Beteiligung der „small-fibers“ und „large-fibers“ kommt. Im Krankheitsverlauf konnte ein zunehmender Verlust an Nervenfasern gezeigt werden. Durch die Analyse der myelinisierten Nervenfasern wurden zudem segmentale Demyelinisierungen und einzelne Veränderungen der Schnürringarchitektur beschrieben. Die charakteristischen pathologischen Merkmale, wie die axonale Degeneration und die segmentale Demyelinisierung sollen auch in dieser Studie untersucht werden. Außerdem liegt ein Schwerpunkt auf der Analyse der Schnürringarchitektur, um Veränderungen als mögliches Korrelat einer axoglialen Dysjunktion erfassen zu können.

1.4 Studienvorhaben

1.4.1 HYPOTHESE

Demyelinisierende Vorgänge an Ranvier'schen Schnürringen bei Patienten mit diabetischer Neuropathie sind Teil der Pathogenese und äußern sich in einer Veränderung der Schnürringarchitektur dermalen myelinisierter Nervenfasern im Vergleich zur Kontrollgruppe.

1.4.2 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung und Quantifizierung peripherer Nerven in Patienten mit diabetischer Neuropathie und die Ermittlung einer „small- und large-fiber“ Beteiligung. Die Gruppe der Patienten mit Diabetes mellitus ohne Neuropathie sollte hierbei Veränderungen in einem frühen Krankheitsstadium aufzeigen.

1.4.3 ARBEITSPLAN

- Prospektive Rekrutierung von Patienten mit diabetischer Neuropathie, Patienten mit Diabetes mellitus ohne Hinweise auf eine Neuropathie und gesunden Probanden.
- Anamnesegespräch zur Erhebung relevanter Patientendaten, klinisch-neurologische Untersuchung mit Schwerpunkt auf die untere Extremität, Klassifizierung des neuropathischen Schmerzes und autonomer Symptome anhand von Fragebögen.
- Quantitative sensorische Testung und Elektroneurographie des Nervus suralis zur Erhebung des Status der „small- und large-fiber“ Beteiligung.

Probenentnahme von Hautbiopsien an Unterschenkel, Oberschenkel und Finger zur immunhistochemischen Untersuchung und Vergleich zwischen den drei Gruppen:

- Quantifizierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD)
- Quantifizierung dermalen myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenfaserbündel und Ermittlung der Gesamtanzahl an Bündeln
- Analyse der Schnürringarchitektur (Caspr, Neurofascin, Natrium-Kanal) in dermalen Nervenfasern und Ermittlung von verlängerten Schnürringen

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienteilnehmer

2.1.1 PATIENTEN

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in einem Zeitraum von Oktober 2012 bis Juli 2015 in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg. Um eine ausreichende Anzahl an Patienten erreichen zu können, wurden zusätzlich im Zeitraum Mai 2013 bis August 2014 Studienteilnehmer in der Diabetesambulanz der Endokrinologie des Universitätsklinikums Würzburg rekrutiert. Darüber hinaus wurden im Mai 2013 Mitglieder der Diabetes-Sportgruppe des DJK Sportzentrums Würzburg und im Oktober 2014 Mitglieder der Diabetes Selbsthilfegruppe Würzburg zur Teilnahme an der Studie befragt.

Die Patienten wurden schriftlich und mündlich über die Teilnahme an der Studie aufgeklärt. Der Ablauf der Untersuchung sowie mögliche Komplikationen wurden ausführlich erläutert. Von allen Teilnehmern wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt, die jederzeit widerrufen werden konnte. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg positiv bewertet (AZ 189/12).

Insgesamt konnten 54 Patienten für die Studie gewonnen werden. Zwei Studienteilnehmer wurden aufgrund möglicher anderer Ursachen der Neuropathie ausgeschlossen, sodass sich letztendlich ein Patientenkollektiv von 52 Teilnehmern ergab. Davon wurden 17 Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* zugeteilt und 35 Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie*.

Von dieser Gesamtanzahl an Studienteilnehmern konnten 18 Patienten aus der Diabetesambulanz rekrutiert werden, wobei ein Patient einer der ausgeschlossenen Teilnehmer war. Folglich wurden 17 Patienten aus der Diabetesambulanz in die Studie eingeschlossen, wovon sieben Teilnehmer der Gruppe *Diabetes mellitus* und zehn Teilnehmer der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zugeteilt werden konnten. Ein Teilnehmer der Selbsthilfegruppe, von insgesamt fünf anwesenden Personen, erklärte

sich zur Teilnahme an der Studie bereit und wurde der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zugeteilt. Aus dem Bekanntenkreis konnten drei weitere Patienten rekrutiert werden, wovon zwei Teilnehmer der Gruppe *Diabetes mellitus* und ein Teilnehmer der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zugeteilt werden konnten. Aus der Diabetes-Sportgruppe ergaben sich keine weiteren Studienteilnehmer. Die übrigen 31 Patienten konnten aus der Neurologischen Klinik gewonnen werden. Acht Patienten wurden in die Gruppe *Diabetes mellitus* und 24 Patienten in die Gruppe *Diabetische Neuropathie* eingeschlossen.

2.1.2 PATIENTENANAMNESE

In einem ausführlichen Anamnesegegespräch wurden die Patienten zu ihrer Diabetes mellitus Erkrankung und einer bereits diagnostizierten Neuropathie befragt. Es wurde der Krankheitsbeginn, die Krankheitsdauer, Typ I oder Typ II Diabetes, der aktuelle *HbA1c-Wert* sowie die Therapie der Erkrankung dokumentiert und mithilfe der Krankenakteinsicht erhoben. Die Patienten wurden zudem zu typischen neuropathischen Symptomen, wie Taubheitsgefühl, insbesondere in den Händen und Füßen, Missempfindungen, muskulärer Schwäche und Gangunsicherheit befragt. Daneben wurden weitere Begleit- und Vorerkrankungen in der Anamnese erfasst.

2.1.3 KLINISCH-NEUROLOGISCHE UNTERSUCHUNG

In der klinisch-neurologischen Untersuchung wurden insbesondere die Muskelkraft, die Sensibilität und der Reflexstatus der unteren Extremität getestet. Um bessere Vergleichswerte erreichen zu können, wurde die Auswertung anhand des *Neuropathy Impairment Score in the Lower Limbs (NIS-LL)* (European Neurology, 1999) durchgeführt:

Die motorische Funktion wurde in Hüftbeugung und Hüftstreckung, Kniebeugung und Kniestreckung, Dorsalextension und Plantarflexion des Fußes, sowie Extension und Flexion der Großzehe getestet. Die Einteilung erfolgte in den sechs Kraftgraden in Anlehnung an das British Medical Research Council, 1978. Nach Erhebung des motorischen Status wurden die Ergebnisse in die NIS-LL Skala modifiziert (siehe Tabelle 2.1). Jeweils eine Körperhälfte wurde erfasst, wobei bei einer asymmetrischen

Ausprägung die stärker betroffene Seite zur Auswertung herangezogen wurde. Pro untersuchter Muskelgruppe wurden 0 bis maximal 4 Punkte vergeben. Bei einer vollständigen Lähmung aller Muskelgruppen ergab sich somit eine maximale Gesamtanzahl von 32 Punkten. Schmerzen in den betreffenden Muskeln und Gelenken aufgrund von Erkrankungen anderer Ätiologie konnten jedoch die Beurteilung der Muskelkraft beeinflussen und mussten bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Kraftgrade	Motorische Funktion	NIS-LL Skala
5	Normale Kraft	0
4,5	25 % reduzierte Kraft	1
4	50 % reduzierte Kraft	2
3,5	75 % reduzierte Kraft	3
3	Aktive Bewegung gegen die Schwerkraft möglich	3,25
2	Bewegung bei Ausschaltung der Schwerkraft möglich	3,5
1	Sichtbare Muskelanspannung, keine Bewegung möglich	3,75
0	Fehlende Muskelkontraktion	4

Tabelle 2.1: Kraftgrade, motorische Funktion und Neuropathy Impairment Score in the Lower Limbs (NIS-LL)

Zur Erhebung des Reflexstatus wurde der Patellarsehnen- (PSR) und Achillessehnenreflex (ASR) getestet. Auch hier wurde der Status einer Körperseite bzw. der stärker betroffenen Seite dokumentiert. Die Reflexe des Patellarsehnen- und Achillessehnenreflexes wurden als normal (0 Punkte), abgeschwächt (1 Punkt) und erloschen (2 Punkte) eingestuft. Anhand der NIS-LL Skala ergab sich eine modifizierte Graduierung von 0 bis maximal 4 Punkten. Der Achillessehnenreflex wurde zudem an das Alter der Patienten angepasst, da dieser physiologisch mit zunehmendem Alter abnimmt. Ein reduzierter ASR wurde bei Patienten zwischen 50-69 Jahren als normal bewertet und ein erloschener ASR bei Patienten, welche älter als 70 Jahre waren.

Die Sensibilität der unteren Extremität wurde anhand der Modalitäten Vibration, Berührung, Schmerz und Lagesinn getestet und auch hierbei für eine Körperseite bzw. die schwerer betroffene Seite dokumentiert. Anhand der NIS-LL Skala ergab sich eine modifizierte Gesamtpunktzahl von 0 bis 8 Punkten. Die Erhebung des Status erfolgte an der Endphalanx des Großzehen und wurde als normal (0 Punkte), reduziert (1 Punkt) und aufgehoben (2 Punkte) bewertet.

Das Vibrationsempfinden wurde mithilfe einer 64 Hertz Stimmgabel mit einer 8/8-Skala am Grundglied der Großzehe getestet. Die Graduierung wurde auch hierbei am Alter der Patienten angepasst, da sich der Vibrationssinn auch im Laufe des Alters abschwächt. Ein reduziertes Vibrationsempfinden wurde bei Patienten unter 60 Jahren mit einer Messung von weniger als 6/8 erfasst und bei Patienten über 60 Jahren mit weniger als 4/8. Das Berührungsempfinden wurde anhand eines leichten Berührens der Dorsalseite der Großzehe mit dem Finger des Untersuchers getestet und mit der Gegenseite bzw. dem Empfinden der oberen Extremität verglichen. Zur Prüfung des Schmerzempfindens wurde ein kurzer „Nadelreiz“ mit einem Pinprick-Stimulator oder ggf. einer aufgebogenen Büroklammer gesetzt. Zur Prüfung des Lagesinns wurde die Großzehe des Patienten seitlich gehalten und im Grundgelenk passiv bewegt. Der Patient musste nun bei geschlossenen Augen bzw. bei abgewandtem Gesicht die Richtung des passiven Lagewechsels angeben. Symptome, welche aufgrund einer anderen Erkrankung, z.B. Arthritis oder Trauma, zu einer Auffälligkeit führten, wurden in der Bewertung berücksichtigt und ggf. als normal (0 Punkte) gewertet. Für alle Modalitäten ergab sich eine Gesamtpunktzahl von 0 bis 44 Punkten.

2.1.4 FRAGEBOGEN

2.1.4.1 Fragebogen neuropathische Schmerzen

Zur Erfassung und Objektivierung der verschiedenen Symptome des neuropathischen Schmerzes erhielten die Patienten einen standardisierten Fragebogen, den Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) (Bouhassira et al., 2004; Crawford et al., 2008) in der deutschen Version (NPSI-G) (Sommer et al., 2011).

Der gesamte Fragebogen bezog sich auf die Symptomerfassung der letzten vier Wochen. Im ersten Abschnitt des Fragebogens wurde den Patienten in einer kurzen Beschreibung das unterschiedliche Auftreten des neuropathischen Schmerzes erläutert. Anhand eines Körperschemas wurden die Studienteilnehmer aufgefordert ihre schmerzhaften Areale zu kennzeichnen, um einen besseren Überblick zu bekommen. Ein weiterer Punkt war die Frage nach der medikamentösen Therapie in den letzten vier Wochen und der Häufigkeit des Medikamentenbedarfs.

Im nächsten Abschnitt sind die Patienten zu Spontanschmerzen befragt worden. Dies sind Schmerzen, welche ohne äußere Auslöser auftreten. Dabei wurde zwischen den Schmerzqualitäten brennend (Q1), einschnürend (Q2) und drückend (Q3) unterschieden. Außerdem wurde nach der Dauer der Spontanschmerzen (Q4) gefragt, wobei zwischen fünf Möglichkeiten ausgewählt werden konnte: weniger als 1 Stunde, 1-3 Stunden, 4-7 Stunden, 8-12 Stunden, mehr als 12 Stunden. Eine weitere Frage bezog sich auf das Auftreten von Schmerzattacken und unterbrochenen Schmerzen. Dabei wurden die beiden Qualitäten elektrische Schläge (Q5) und Stechen (Q6) unterschieden. Die Frage nach der Anzahl an Schmerzattacken pro Tag (Q7) umfasste folgende Auswahlmöglichkeiten: keine, 1-5, 6-10, 11-20, mehr als 20. Eine weitere Fragestellung befasste sich mit möglichen Auslösern der Schmerzen, wie Reiben (Q8), Druck (Q9) und kalte Gegenstände (Q10). Im letzten Abschnitt wurde gezielt nach Gefühlsstörungen der Patienten gefragt. Hierbei wurden die Qualitäten Kribbeln (Q11), Ameisenlaufen (Q12) und Taubheitsgefühl (Q13) unterschieden. Als Antwortmöglichkeiten der Fragen Q1 - Q3, Q5 – Q6, Q8 – Q13 diente eine Intervallskala von 0 bis 10 Punkten, wobei 0 keinen Schmerzen und 10 der maximalen Symptomausprägung entsprach.

Zur Auswertung wurde der Summenscore der zehn Fragen Q1 - Q3, Q5 - Q6, Q8 -Q 12 gebildet. Dieser Gesamtscore umfasste insgesamt 0 bis 100 Punkte.

2.1.4.2 Fragebogen autonome Symptome

Zur Erfassung von autonomen Symptomen, welche häufig bei Patienten mit Diabetes mellitus und Diabetischer Neuropathie auftreten, wurde der Fragebogen *The Survey of*

Autonomic Symptoms (SAS) (AAN Enterprises, Inc., 2011) verwendet. Der Fragebogen beinhaltete 11 Fragen für weibliche und 12 Fragen für männliche Studienteilnehmer. Die Gesundheitsbeschwerden bezogen sich in der Fragestellung auf die letzten 6 Monate und es wurden folgende Aspekte der autonomen Symptome erfasst: orthostatische, vasomotorische, sudomotorische, gastrointestinale, urogenitale und sexuelle Dysfunktionen. Die Patienten wurden dazu aufgefordert die Fragen mit *ja* oder *nein* zu beantworten. Bei einer zutreffenden Frage wurde zusätzlich nach dem Schweregrad des Symptoms in einer Intervallskala von 1 bis 5 gefragt. Der Wert 1 entsprach hierbei einem Symptom, welches den Patienten überhaupt nicht störte und der Wert 5 entsprach einem starken Beschwerdebild. Somit wurde die Anzahl der Symptome mit maximal 11 bzw. 12 Punkten und der Summenscore des Schweregrades der Symptome mit 0-55 Punkten für Frauen und 0-60 Punkten für Männer erfasst.

2.1.5 ELEKTRONEUROGRAPHIE DES *NERVUS SURALIS*

Alle Patienten erhielten in der elektrophysiologischen Abteilung der neurologischen Klinik eine Elektroneurographie des *Nervus suralis*. Dabei wurde der Nerv in antidromer Technik in Höhe der Wadenmitte mithilfe einer Oberflächenelektrode stimuliert. Das sensible Nervenaktionspotenzial (SNAP) wurde distal der Reizung entsprechend des Nervenverlaufs hinter dem Malleolus lateralis abgeleitet. Anschließend konnte aus dem Abstand von Reiz- und Ableitelektrode und der Latenz die sensible Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) ermittelt werden (Berlit, 2011). Die Ergebnisse wurden mit den Referenzwerten der Klinik verglichen und hatten folgende Normwerte: NLG > 40 m/s; SNAP > 10 µV für Patienten < 65 Jahre und > 5 µV für Patienten > 65 Jahre.

2.1.6 DEFINITION DER PATIENTENGRUPPEN

Zur Definierung der Gruppe *Diabetische Neuropathie* wurde die Einteilung nach Tesfaye (Tefaye et al. 2010) vorgenommen. Anhand dieser Einteilung wurden vier Untergruppen der diabetischen Neuropathie gebildet: mögliche, wahrscheinliche, bestätigte und subklinische distal symmetrische Polyneuropathie (DSPN). In der Gruppe *mögliche DSPN* wurden Patienten erfasst, welche Symptome oder klinische Zeichen einer Neuropathie zeigten. Als Symptome wurden ein reduziertes

Empfindungsvermögen und Missempfindungen, wie zum Beispiel Brennen, Kribbeln und Stechen, vor allem in den Zehen und Füßen gewertet. Ein distal symmetrisch reduziertes Empfindungsvermögen und ein abgeschwächter bzw. aufgehobener Achillessehnenreflex wurden als klinische Zeichen für eine Neuropathie erfasst. Die Gruppe *wahrscheinliche DSPN* beinhaltete Patienten mit einer Kombination aus mindestens zwei Symptomen und Zeichen. Patienten mit einem pathologischen Ergebnis in der Elektroneurographie und Symptomen oder klinischen Zeichen, oder einer Kombination aus beiden, wurden in der Gruppe *bestätigte DSPN* erfasst. Die Gruppe *subklinische DSPN* beinhaltete Patienten mit einem pathologischen Ergebnis in der Neurographie des N. suralis ohne Symptome oder klinische Zeichen für eine Neuropathie. In der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden somit alle Patienten erfasst, die keine Symptome, klinische Zeichen und Auffälligkeiten in der Elektroneurographie des N. suralis zeigten.

2.2 Kontrollpersonen

In einem Zeitraum von November 2012 bis Dezember 2014 wurden Kontrollpersonen in der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg prospektiv rekrutiert. Die Probanden befanden sich zu diesem Zeitpunkt aufgrund von Schlaganfällen, Kopfschmerzen und anderen neurologischen Erkrankungen, welche keine Auswirkungen auf das periphere Nervensystem hatten, in stationärer Behandlung. Des Weiteren erklärten sich Familienmitglieder und Bekannte zur Studienteilnahme bereit. Die Probanden wurden mündlich und schriftlich über den Ablauf der Studie, die Untersuchungen und mögliche Komplikationen aufgeklärt. Jeder Studienteilnehmer unterzeichnete eine schriftliche Einverständniserklärung, welche jederzeit widerrufen werden konnte. Probanden, bei welchen sich anamnestisch Hinweise auf Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Neuropathie sowie Parkinson ergaben oder auf sonstige Erkrankungen, welche das periphere Nervensystem betreffen, wurden von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen.

2.3 Quantitative Sensorische Testung

Zur Überprüfung der Funktion des somatosensorischen Nervensystems wurde bei allen Studienteilnehmern eine *Quantitative Sensorische Testung (QST)* im QST-Labor der neurologischen Klinik durchgeführt. Der Ablauf dieser Testung erfolgte anhand der Empfehlungen des *Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerzen (DFNS)* (Rolke et al., 2006; Rolke et al., 2010). In einer standardisierten Vorgehensweise wurden verschiedenen Sinnesmodalitäten getestet und mit Referenzwerten verglichen (Magerl et al., 2010). Dabei wurde die *thermische Detektions- und Schmerzschwelle*, die *taktile Detektionsschwelle*, die *mechanische Schmerzschwelle*, die *mechanische Schmerzsensitivität* und die *dynamische mechanische Allodynie*, die *Wind-up Ratio*, die *Vibrationsdetektionsschwelle* und die *Druckschmerzschwelle* ermittelt. Die Berechnung der Mittelwerte und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Softwareprogramms *Sense52* (Somedic SenseLab AB; Hörby, Schweden).

Der Ablauf der Testung wurde den Studienteilnehmern ausführlich vor der Durchführung erläutert. Die Patienten wurden dazu aufgefordert, sich bei Unklarheiten während der gesamten Prozedur zu melden. Die Testung erfolgte an zwei Körperarealen einer Körperhälfte, auf der Wange des Gesichts und auf der Dorsalseite des Fußes. Die Wange diente hierbei als *Kontrollareal* und wurde zuerst getestet. Im Anschluss folgte die Testung des eigentlichen *Testareals* auf dem Fußrücken. Bei einer asymmetrischen Symptomverteilung wurde die stärker betroffene Seite herangezogen.

Zur Bestimmung der *thermischen Detektions- und Schmerzschwellen* wurde ein Modular Sensory Analyzer (MSA, Somedic SenseLab AB; Hörby, Schweden) verwendet. Mit diesem thermischen Gerät wurde die Messung zur Wahrnehmung der Temperaturveränderungen durchgeführt. Bei dieser Messungsreihe wurden die Kälte- (CDT) und Wärmedetektionsschwelle (WDT), die thermische Unterschiedsschwelle, sowie die Kälte- (CPT) und Hitzeschmerzschwelle (HPT) bestimmt (Fruhstorfer et al., 1976; Yarnitsky et al., 1995). Vor Beginn der Durchführung wurde die Temperatur des Kontroll- und Testareals gemessen, welche ungefähr 32 °C betragen sollte. Bei einer niedrigeren Temperatur wurde diese mithilfe einer Wärmeflasche auf den

entsprechenden Wert gebracht. Eine Thermode, welche für die jeweiligen Temperaturunterschiede sorgte, wurde auf das Kontroll- bzw. Testareal aufgebracht. Die Ausgangstemperatur betrug bei allen Messungen 32 °C. Die Ober- und Untergrenze der Temperatur war auf 50 °C bzw. 0 °C festgelegt. Die Patienten wurden zur Ermittlung der Kälte- bzw. Wärmedetektionsschwelle aufgefordert in jeweils drei aufeinanderfolgenden Messungen eine Stopp-Taste zu tätigen, sobald sie eine Temperaturveränderung im Sinne von *kälter* bzw. *wärmer* verspürten. Analog wurden die Kälte- und Hitzeschmerzschwellen bestimmt. Die Patienten wurden hierbei aufgefordert auf die Wahrnehmung von zusätzlichen schmerzhaften Empfindungen, wie *Brennen, Stechen, Ziehen* und *Bohren* zu achten. Bei der thermischen Messung der Unterschiedsschwelle, als Abfolge von aufeinanderfolgenden warmen und kalten Reizen, wurden die Patienten aufgefordert auf die Wahrnehmung der Temperaturveränderung zu achten und diese durch Drücken der Stopp-Taste zu äußern. Zusätzlich wurden bei dieser Messung paradoxe Hitzeempfindungen (PHS) erfasst, welche bei Abkühlung der Thermode in Form von Wärme- und Hitzeschmerz in Erscheinung treten konnten. Für alle Messungen wurde der Mittelwert errechnet und dokumentiert.

Die Messung der *taktilen Detektionsschwelle* (MDT) erfolgte mithilfe der *von Frey Haare* (Weinstein 1968; Fruhstorfer et al., 2001), welche in fünf Abläufen mit auf- und absteigenden Reizintensitäten getestet wurde (Baumgärtner et al., 2002). Hierbei wurde die Fähigkeit zur Wahrnehmung von leichten Berührungen erfasst und die Patienten waren dazu aufgefordert, diese nach einer Reizapplikation zu äußern. Folgende Intensitäten der *von Frey Haare* wurden hierfür verwendet: 0,25mN, 0,5mN, 1 mN, 2mN, 4mN, 8mN, 16mN, 32mN, 64mN, 128mN, 256mN und 512mN. Begonnen wurde diese Testreihe mit einem *von Frey Haar* mit 16 mN. In absteigender Intensität wurden die Reize mittels der *von Frey Haare* gesetzt, bis der Patient keine Reizwahrnehmung mehr äußerte. Damit wurden die unter-schweligen Werte ermittelt. Zur Ermittlung der überschwelligen Werte wurde die Testung in umgekehrter Reihenfolge fortgesetzt, bis der Patient wieder eine Berührung spürte. Die ermittelten Werte wurden dokumentiert und der Mittelwert berechnet.

Zur Ermittlung der *mechanischen Schmerzschwelle* (MPT) wurden Nadelreizstimulatoren (Pinpricks) verwendet. Mit dieser Messung wurde die Fähigkeit zur Wahrnehmung von *spitzen* und *stumpfen* Reizen getestet. Die über- und unterschwelligen Werte wurde auch hierbei in fünf Abläufen mit auf- und absteigenden Intensitäten ermittelt (Hampf et al., 1990; Chan et al., 1992; Greenspan und McGillis 1994; Ziegler et al., 1999). Pinpricks mit folgenden Intensitäten wurden für die Messung verwendet: 8mN, 16mN, 32mN, 64mN, 128mN, 256mN und 512mN. Begonnen wurde die Testung mit einem Pinprick der Intensität 8mN. Die Nadelreize wurden zunächst in aufsteigender Reihenfolge bis zu der Empfindung *spitz* appliziert und anschließend in absteigender Reihenfolge bis zur Wahrnehmung *stumpf*. Die fünf Schwellenwerte wurden für das Kontroll- und Testareal ermittelt und jeweils der Mittelwert berechnet.

Die *mechanische Schmerzsensitivität* (MPS) und die *dynamische mechanische Allodynie* (DMA) wurden mittels der *Stimulus/Response- (S/R-) Funktionen* ermittelt. Bei dieser Testreihe wurden Reize in einer standardisierten Reihenfolge auf die jeweiligen Körperareale appliziert. Die Schmerzempfindlichkeit der Patienten wurde mithilfe einer numerischen Rating-Skala von 0 bis 100 Punkten ermittelt. Nach jeder Reizapplikation wurde von den Patienten ein entsprechender Wert aus der Skala zugeteilt. Bei keinerlei Schmerzen wurde der Wert 0 vergeben. Ein Wert von 100 Punkten entsprach einem maximal vorstellbaren Schmerzereignis. Zur Ermittlung der mechanischen Schmerzsensitivität wurden die Nadelreizstimulatoren (Pinpricks) verwendet. Zur Applikation von Berührungsreizen und zur Ermittlung der dynamischen mechanischen Allodynie dienten Wattebausch, Q-Tip und Pinsel (LaMotte et al., 1991; Ziegler et al., 1999). Hierbei war es wichtig auf eine gleichmäßige Reizapplikation zu achten (Samuelsson et al., 2005). Insgesamt wurden pro Areal 50 Reize gesetzt und anschließend der Mittelwert berechnet.

Zur Ermittlung der *Wind-up Ratio* (WUR) wurden Nadelreizstimulatoren verwendet. Für die Wange, als Kontrollareal, ein Pinprick mit einer Intensität von 128mN und für das Testareal auf dem Fußrücken eine Intensität von 256mN. Es wurden jeweils zunächst Einzelreize appliziert, gefolgt von einer Reizserie mit 10 Reizapplikationen.

Diese wurden in einem Abstand von einem Reiz pro Sekunde auf das entsprechende Hautareal in einem Bereich von 1cm² aufgebracht. Eine numerische Ranking-Skala von 0 bis 100 Punkten diente zur Ermittlung der jeweiligen Empfindungsstärke. Die Studienteilnehmer wurden dazu aufgefordert, jeweils dem Einzelreiz und der Reizabfolge einen Wert entsprechend der wahrgenommenen Intensität zuzuordnen. Diese Abfolge wurde fünfmal wiederholt und die Ergebnisse wurden nach jeder Messreihe dokumentiert. Anschließend wurde der Quotient der Werte gebildet, welcher zur Ermittlung der Mittelwerte diente (Price et al., 1977; Magerl et al., 1998).

Die *Vibrationsdetektionsschwelle* (VDT) wurde mit einer 64Hz-Stimmgabel ermittelt. Als Kontrollareal diente die *Squama frontalis* des *Os frontale* und als Testareal der knöchernen Vorsprung des *Malleolus medialis*. Die Stimmgabel wurde pro Areal dreimal angeschlagen und über den entsprechenden Knochenvorsprung zur Messung des Vibrationsempfindens aufgesetzt. Anhand der 8/8-Skala konnte die Schwelle der Vibrationswahrnehmung abgelesen und dokumentiert werden (Goldberg und Lindblom 1979; Fagius und Wahren 1981). Zur Bestimmung der Detektionsschwelle wurde anschließend der Mittelwert berechnet.

Zur Ermittlung der *Druckschmerzschwelle* (PPT) wurde ein Druckalgometer verwendet. Mit diesem mechanischen Stimulator konnte der Tiefenschmerz über der entsprechenden Muskulatur der Areale ermittelt werden. Im Gesicht wurde als Kontrollareal der *Musculus masseter* verwendet und am Fußgewölbe als Testareal der *Musculus abductor hallucis*. Über beiden Muskeln wurden jeweils dreimal an nebeneinanderliegenden Stellen möglichst gleichmäßige Messungen mit 50 kPa/s und zunehmender Intensität vorgenommen. Die Werte zur Bestimmung der Druckschmerzschwellen wurden dokumentiert und anschließend wurde der Mittelwert für das jeweilige Areal ermittelt.

2.4 Hautbiopsien

2.4.1 GEWINNUNG DER HAUTBIOPSIEN

Von jedem Studienteilnehmer wurden an drei Körperstellen Hautbiopsien unter Einhaltung einer standardisierten sterilen Vorgehensweise entnommen. Die Patienten und Probanden wurden mündlich und schriftlich über die Prozedur der Gewebeentnahme und über mögliche Komplikationen aufgeklärt. Es wurde explizit auf Komplikationen, wie Wundheilungsstörungen und Infektionen der Wunde hingewiesen, sowie auf potenzielle allergische Reaktionen auf das Lokalanästhetikum und auf eine verstärkte Blutungsneigung bei Einnahme von blutverdünnenden Medikamenten oder bereits bekannten hämorrhagischen Diathesen. Patienten und Probanden mit diesbezüglichen Risiken wurden von der Studie ausgeschlossen.

Es wurde eine Gewebeprobe am Unterschenkel ca. 10 cm proximal des Malleolus lateralis, eine an der lateralen Außenseite des Oberschenkels ca. 20 cm distal der Spina iliaca anterior und eine an der unbehaarten lateralen Außenseite des Zeigefingers entnommen. Die Hautbiopsien an Unter- und Oberschenkel wurden mit einer Biopsiestanze (Biopsy Punch, Stiefel GmbH; München, Deutschland) mit einem Durchmesser von 5 mm entnommen und am Finger mit einem Durchmesser von 3 mm. Die Entnahmeorte der behaarten Haut am Ober- und Unterschenkel wurden unter anderem ausgewählt, um die Gewebeprobe auf eine längenabhängige Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte zu untersuchen. Die Gewebeprobe am Finger wurde gewählt, um die Möglichkeit zu haben ein unbehaartes Hautareal mit einer hohen Innervationsdichte an myelinisierten Nervenfasern untersuchen zu können.

Die Stellen der Gewebeentnahme wurden zunächst viermal mit einem Hautantiseptikum (Cutasept F, Bode Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland) desinfiziert. Bei stark behaarter Haut war es zunächst notwendig das Hautareal mit einem Einwegrasierer zu rasieren. Anschließend wurden die Hautareale mit dem Lokalanästhetikum Scandicain 1% (AstraZeneca GmbH; Wedel, Deutschland), welches subkutan unter Ausschluss einer arteriellen oder venösen Injektion injiziert wurde, betäubt. Nach Prüfen einer ausreichenden Anästhesie an den Entnahmeorten wurden

die Hautproben mittels einer Stanzbiopsie entnommen. Die Wunde wurde dann zunächst mit einer Mullkomresse (Gazin Mullkompressen, Lohmann & Rauscher GmbH; Rengsdorf, Deutschland) für ca. 3 Minuten komprimiert, um die Blutstillung zu unterstützen. Diese Maßnahme wurde gegebenenfalls bei unzureichender Blutstillung für einige Minuten verlängert. Im nächsten Schritt wurden die Wundränder mit Wundnahtstreifen (Leukostripe, Smith & Nephew GmbH; Hamburg, Deutschland) adaptiert und mit einem Pflasterverband (Leukomed, BSN Medical GmbH; Hamburg, Deutschland) versorgt. Bei stärkerer und länger andauernder Blutung wurde zusätzlich ein Kompressionsverband angelegt. Nach der Gewebeentnahme wurden die Studienteilnehmer nochmals daraufhin gewiesen eine Verunreinigung der Wunde zu vermeiden, um die Wundheilung nicht zu verzögern. Nach ca. 7 bis 10 Tagen war die Wundheilung in der Regel unter Bildung einer kleinen Narbe am Entnahmeort abgeschlossen. Bei einer Patientin verzögerte sich jedoch die Wundheilung aufgrund einer Wundheilungsstörung. Nach Einleitung einer oralen antibiotischen Therapie erfolgte eine vollständige Ausheilung.

Material	Firma	Detail
Biopsy Punch	Stiefel GmbH	Einmalhautstanze
Hautstanze	München, Deutschland	Ø 3mm; Ø5mm
Cutasept F	Bode Chemie GmbH Hamburg,	Sprühdesinfektion
Haut-Antiseptikum	Deutschland	farblos
Gazin Mullkompressen	Lohmann & Rauscher GmbH Rengsdorf, Deutschland	steril und unsteril
Leukostripe	Smith & Nephew GmbH	6,4mmx76mm
Wundnahtstreifen	Hamburg, Deutschland	steril
Leukomed Pflaster	BSN Medical GmbH Hamburg, Deutschland	steril
Scandicain	AstraZeneca GmbH	1% Injektionslösung
Lokalanästhetikum	Wedel, Deutschland	Mepivacainhydrochlorid
Skalpellklingen	Braun Aesculap AG Tuttlingen, Deutschland	Steril

Tabelle 2.2: Materialübersicht Gewinnung der Hautbiopsie

2.4.2 AUFARBEITUNG DER GEWEBEPROBEN

Nach der Entnahme der Hautproben wurden diese zunächst in 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten fixiert. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe in 0,1-molarem Phosphatpuffer dreimal für jeweils 10 Minuten gewaschen und anschließend in einer 10% Saccharose Lösung über Nacht bei 4°C konserviert.

Am nächsten Tag wurden die Hautbiopsien in Einbettförmchen mit dem Einbettmedium Tissue-Tek (Sakura Finetek Germany GmbH; Staufen, Deutschland) eingebettet, um ein problemloses Schneiden der Proben zu ermöglichen. Anschließend wurden die Förmchen in ein Becherglas, welches mit dem Lösungsmittel 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe Deutschland) gefüllt war, gegeben. Dies ermöglichte im nächsten Schritt ein Schockfrieren der Proben in einem Behälter

mit Flüssigstickstoff. Die gefrorenen Gewebeproben wurden in nummerierte Röhren gegeben und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur weiteren Aufbereitung der Hautproben wurden diese mit einem Kryostaten (Kryostat CM3050S, Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch, Deutschland) vertikal geschnitten. Es wurden jeweils drei 40 µm dicke Hautschnitte auf einen Objektträger mit SuperFrost-Beschichtung (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik; Emmendingen, Deutschland) aufgetragen. Nach einer Trocknungszeit von ca. 30 Minuten wurden die Objektträger mit den Schnitten bei -20° C gelagert.

2.4.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

2.4.3.1 Fluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die kryokonservierten Schnitte für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Pap-Pen (Science Services GmbH; München, Deutschland) umrandet, um eine hydrophobe Begrenzung zu erhalten und somit ein Auslaufen der aufzutragenden Lösungen zu verhindern. Die Objektträger wurden mit einem jeweiligen Zahlencode beschriftet, um eine anonymisierte und verblindete Vorgehensweise zu ermöglichen und anschließend in eine Feuchtkammer gelegt, um ein Austrocknen zu verhindern. Während der gesamten Färbeprozedur wurde auf eine möglichst geringe Sonnenlichtexposition geachtet, um ein vorzeitiges Verblässen der Antikörper zu vermindern.

Anschließend wurde eine 10%ige BSA/PBS-Lösung auf die Schnitte aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt erfolgte zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers im Hintergrund des Gewebes und sollte somit ein falsch positives Anfärben verhindern. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung vorsichtig von den Objektträgern abgekippt. Am ersten Tag der Färbung wurden die Primärantikörper in 1% BSA/PBS-Lösung unter Zugabe von 0,3% TritonX (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland) verdünnt. Pro Objektträger wurden jeweils ca. 50-100µl der Lösung aufgetragen und diese anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zunächst vorsichtig dreimal in PBS gewaschen. Danach konnten die Sekundärantikörper aufgetragen werden. Diese wurden in einer 1% BSA/PBS-Lösung verdünnt und nach Auftragen auf die Schnitte 2 Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger nochmals dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit jeweils ca. 25 µl des Eindeckmediums Vectashield (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories Inc.; Burlingame, USA) eingedeckt, um ein Verblässen der Fluoreszenzantikörper zu vermindern. Es wurde vorsichtig ein Deckglas auf die Schnitte gelegt und diese wurden schließlich mit einem Deckglaslack umrandet, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Durch diese Maßnahmen konnten die Objektträger geschützt in einem dunklen und auf 4°C gekühlten Raum in Objektträgermappen gelagert werden.

Geräte und Material	Firma	Detail
Kryostat CM3050S	Leica Biosystems GmbH Nussloch, Deutschland	
Deckglas Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik Emmendingen, Deutschland	SuperFrost; 76mmx26mm, 24mmx40mm
Tissue-Tek Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH Staufen, Deutschland	
Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services GmbH München, Deutschland	
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe Deutschland	
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Hamburg, Deutschland	
4% Paraformaldehyd	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland	
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe Deutschland	
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Hamburg, Deutschland	
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA	

Tabelle 2.3: Geräte- und Materialübersicht

Lösungen und Puffer	Herstellung
Stammlösung A	178g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat / 5Liter Aqua
Stammlösung B	31,2g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat / 1 Liter Aqua
Phosphatpuffer 0,1M	405ml Stammlösung A + 95ml Stammlösung B auf pH 7,4 austitrieren auf 1 Liter auffüllen mit Aqua dest. auffüllen
4% Paraformaldehyd	40g Paraformaldehyd in 1 Liter 0,1M Phosphatpuffer
10% Saccharoselösung	10g Saccharose in 100ml Phosphatpuffer
PBS 0,1M	800ml Stammlösung A (0,2M) + 160ml Stammlösung B (0,2M) auf pH 7,4 austitrieren +60ml 5M NaCl auf 2 Liter mit Aqua dest. auffüllen
10% BSA/PBS	10g BSA in 100ml Phosphatpuffer (0,1M)
1% BSA/PBS + 0,3% TritonX	1ml 10% BSA/PBS + 9ml PBS + 30µl TritonX
1% BSA/PBS	1ml 10% BSA/PBS + 9ml PBS

Tabelle 2.4: Lösungen und Puffer

2.4.3.2 Immunfluoreszenz Doppelfärbungen

Für alle Färbungen mit den jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern erfolgten die Schritte, wie oben beschrieben. Unterschiede ergaben sich lediglich in den verschiedenen Verdünnungen.

Für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und PGP 9.5 wurde als axonaler Marker der polyklonale Anti-PGP 9.5 Antikörper aus Kaninchenserum (UltraClone Limited; Isle of Wight, England) und zur Darstellung der Myelinscheide der monoklonale Maus Anti-MBP Antikörper (GeneTex Inc.; Irvine, USA) verwendet (siehe Tabelle 2.5). Als Sekundärantikörper wurden der Cy3-konjugierte Esel Anti-Kaninchen Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europa Ltd.; Suffolk, Großbritannien) und der Alexa Fluor488-konjugierte Esel Anti-Maus Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Suffolk, Großbritannien) eingesetzt (siehe Tabelle 2.6).

Für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Caspr wurden der polyklonale Kaninchen Anti-Caspr Antikörper (Abcam Inc.; Cambridge, UK), als Marker für die paranodale Region und der monoklonalen Maus Anti-MBP Antikörper (GeneTex Inc.;

Irvine, USA) verwendet (siehe Tabelle 2.5). Als Sekundärantikörper dienten der Alexa Fluor488-konjugierte Esel Anti-Kaninchen Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Suffolk, Großbritannien) und der Cy3-konjugierte Esel Anti-Maus Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europa Ltd.; Suffolk, Großbritannien) (siehe Tabelle 2.6).

Für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Neurofascin wurden der polyklonale Kaninchen Anti-Neurofascin Antikörper (Abcam Inc.; Cambridge, UK) und der monoklonale Maus Anti-MBP Antikörper (GeneTex Inc.; Irvine, USA) eingesetzt (siehe Tabelle 2.5). Als Sekundärantikörper wurden der Alexa Fluor488-konjugierte Esel Anti-Kaninchen Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Suffolk, Großbritannien) und der Cy3-konjugierte Esel Anti-Maus Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Suffolk, Großbritannien) verwendet (siehe Tabelle 2.6).

Für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Na-Kanäle wurden der monoklonale Maus Anti-Natrium Kanal (Pan) Antikörper (Sigma-Aldrich Inc.; Missouri, USA) und der polyklonale Kaninchen Anti-MBP Antikörper (Merck KGaA, Millipore Corporation; Darmstadt, Deutschland) verwendet (siehe Tabelle 2.5). Als Sekundärantikörper dienten der Alexa Fluor488-konjugierte Esel Anti-Kaninchen Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Suffolk, Großbritannien) und der Cy3-konjugierte Esel Anti-Maus Antikörper (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; Suffolk, Großbritannien) (siehe Tabelle 2.6).

Antikörper	Firma	Herstellung	Antigen	Verdünnung	Färbung
Anti-Human PGP 9.5 Antikörper	UltraClone Limited Isle of Wight, England	Polyklonaler Kaninchen Antikörper	Humanes PGP 9.5 Protein	1:800	PGP
Anti-MBP Antikörper	GeneTex Inc. Irvine, USA	Monoklonaler Maus Antikörper	Bovines myelin basic protein	1:200	MBP (MBP/PGP, MBP/Caspr, MBP/NF)
Anti-MBP Antikörper	Merck KGaA Millipore Corporation Darmstadt, Deutschland	Polyklonaler Kaninchen Antikörper	MBP	1:1000	MBP (MBP/Na)
Anti-Caspr Antikörper	Abcam Inc. Cambridge, UK	Polyklonaler Kaninchen Antikörper	Maus Caspr	1:1000	Caspr
Anti-Neurofascin Antikörper	Abcam Inc. Cambridge, UK	Polyklonaler Kaninchen Antikörper	Maus Neurofascin	1:400	Neurofascin
Anti-Natrium Kanal Antikörper (Pan)	Sigma-Aldrich Inc. Missouri, USA	Monoklonaler Maus Antikörper	Synthetisches Na Kanal Peptid	1:100	Natrium-Kanal

Tabelle 2.5: Immunfluoreszenz Doppelfärbungen; Primärantikörper

Antikörper	Firma	Herstellung	Antigen	Verdünnung	Färbung
Cy3-konjugiertes Esel Anti- Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, GB	Esel	Kaninchen IgG	1:100 (1:50; vorverdünnt)	PGP
Alexa Fluor488- konjugiertes Esel Anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, GB	Esel	Maus IgG	1:400 (1:200; vorverdünnt)	MBP (MBP/PGP)
Alexa Fluor488- konjugiertes Esel Anti- Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, GB	Esel	Kaninchen IgG	1:400 (1:200; vorverdünnt)	Caspr, Neurofascin, MBP (MBP/Na)
Cy3-konjugiertes Esel Anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Suffolk, GB	Esel	Maus IgG	1:100 (1:50; vorverdünnt)	MBP (MBP/Caspr, MBP/NF), Na- Kanal

Tabelle 2.6: Immunfluoreszenz Doppelfärbungen; Sekundärantikörper

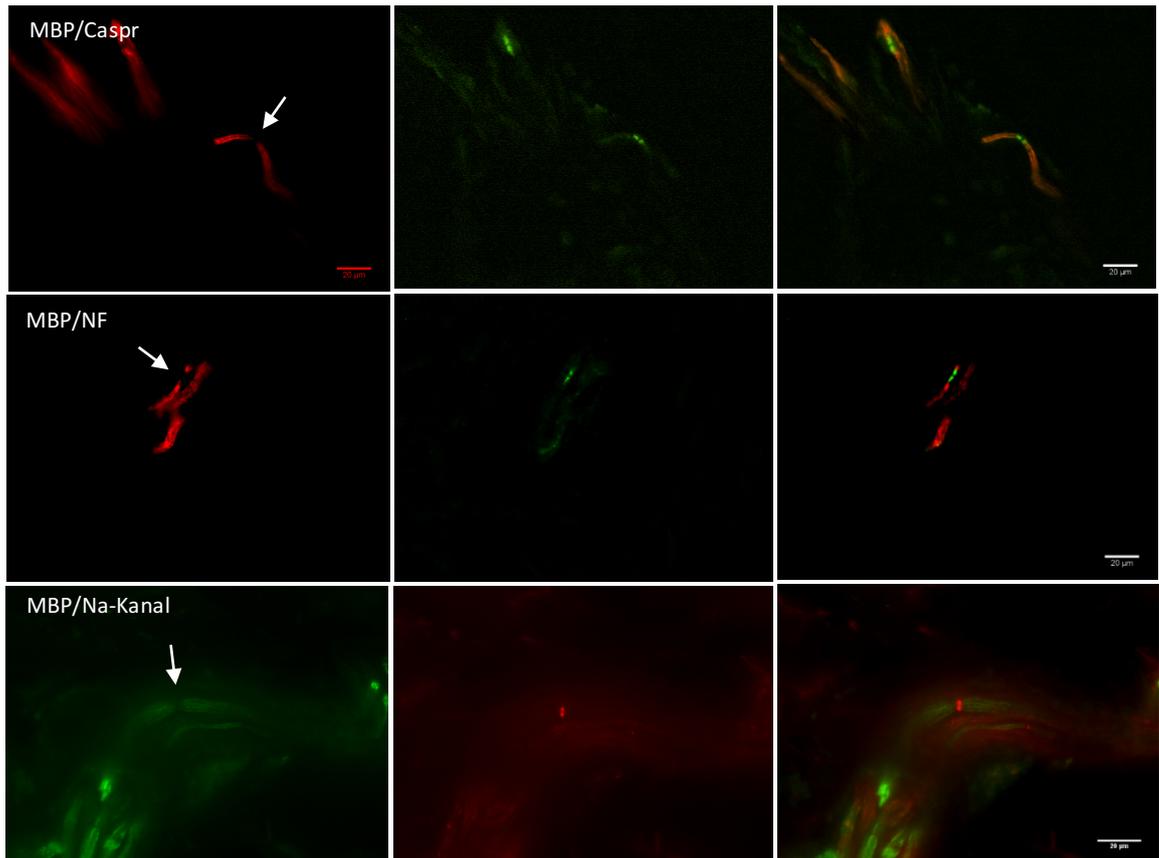


Abbildung 2.1: Immunfluoreszenz Doppelfärbungen. **A:** Beispiel für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Caspr. Im ersten Bild ist eine MBP-positive (rot) Nervenfasern dargestellt. Die kurze Unterbrechung der Kontinuität stellt einen normalen Ranvier-Schnürring dar (weißer Pfeil). Im zweiten Bild ist die Caspr-positive (grün) paranodale Schnürringregion dargestellt. Die Färbung ist symmetrisch und nicht verlängert. Das dritte Bild zeigt das Fusionsbild aus beiden Färbungen. **B:** Beispiel für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Neurofascin. Im ersten Bild sind MBP-positive (rot) Nervenfasern mit einem Schnürring (weißer Pfeil) dargestellt. Im mittleren Bild ist eine Neurofascin-positive (grün) Anfärbung der nodalen und paranodalen Region des Schnürrings zu erkennen. Das dritte Bild stellt das Fusionsbild dar. **C:** Beispiel für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Na-Kanal. Im ersten Bild sind MBP-positive (grün) Nervenfasern mit Ranvier-Schnürringen (weißer Pfeil) dargestellt, die eng aneinander liegen. Im zweiten Bild sind zwei Na-Kanal-positive (rot) nodale Regionen der Schnürringe dargestellt. Das dritte Bild zeigt das Fusionsbild.

2.5 Mikroskopische Auswertungsmethoden

2.5.1 METHODE ZUR AUSWERTUNG DER INTRAEPIDERMALEN NERVENFASERDICHTE

Zur Auswertung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) wurde das Fluoreszenz Phasenkontrast Mikroskop Axiophot 2 (Carl Zeiss GmbH; Oberkochen, Deutschland) mit der AxioCam MRm Mikroskopie-Kamera (Carl Zeiss GmbH; Oberkochen, Deutschland) und die SPOT Imaging Software (Diagnostic Instruments, Inc.; Sterling Heights, Michigan, USA) verwendet.

Als Grundlage zur Bestimmung der IENFD diente die Immunfluoreszenz Färbung PGP 9.5, welche im Abschnitt Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und PGP 9.5 beschrieben wurde. Diese führte zu einer Darstellung der Axone und ermöglichte somit eine Quantifizierung der Nervenfasern. Um die intraepidermale Nervenfaserdichte (IENF/mm) berechnen zu können, war es notwendig sowohl die Länge (in mm) des jeweiligen Schnittes, als auch die Anzahl der intraepidermalen Nervenfasern (IENF) zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte verblindet ohne Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit und das Körperareal der jeweiligen Hautprobe. Die Schnitte der Kontrollen wurden zudem von zwei unabhängigen Untersuchern analysiert.

Von jeder Gewebeprobe wurden jeweils drei vertikale Hautschnitte mit einer Dicke von 40µm analysiert. Zuerst wurde die Länge der Epidermis mit einem 2,5-fachen Objektiv und mithilfe der SPOT Software ausgemessen. Nachdem dies für alle drei Schnitte einer Hautprobe wiederholt wurde, konnte der Mittelwert berechnet werden, welcher als Berechnungsgrundlage der IENFD benötigt wurde. Die durchschnittliche Dicke der Epidermis wurde bestimmt, indem von jedem Schnitt drei Messungen vorgenommen wurden und anschließend der Mittelwert berechnet wurde.

Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der Nervenfasern in der Epidermis mithilfe von spezifischen Kriterien zum Zählen der IENF (Kennedy et al., 2005; Lauria et al. 2005; Lauria et al. 2010) bestimmt. Dabei wurde jede einzelne Nervenfaser gezählt, welche die Basalmembran zwischen Dermis und Epidermis überquerte. Nervenfasern, die sich nach Durchbrechen der Basalmembran aufteilten, wurden ebenfalls als eine

Nervenfaser gezählt. Nervenfasern, die sich vor oder innerhalb der Basalmembran aufgeteilt haben, wurden als zwei oder mehr Fasern gezählt. Fragmente von Nervenfasern, welche die Basalmembran durchbrochen haben, wurden ebenfalls gezählt. Ausgeschlossen von der Zählung wurden jedoch Fragmente von Nervenfasern innerhalb der Epidermis und Fasern, welche nicht die Basalmembran überquert haben.

Nach der Quantifizierung der Nervenfasern in den drei Hautschnitten einer Gewebeprobe, wurde der Mittelwert berechnet. Mit den Berechnungsgrundlagen des Mittelwertes der IENF und der Länge (mm), konnte anschließend die Dichte der intraepidermalen Nervenfasern (IENF/mm) berechnet werden.

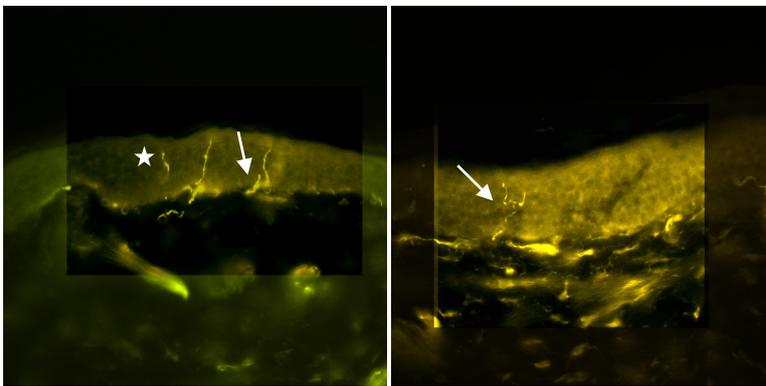


Abbildung 2.2: Beispiele zur Auswertung der intraepidermalen Nervenfaserdichte. Im ersten Bild ist ein Fragment einer Nervenfaser markiert (weißer Stern), welches nicht gezählt wurde. Der weiße Pfeil markiert eine Nervenfaser, welche kurz nach Durchlaufen der Basalmembran endet und in der Zählung erfasst wurde. Daneben befinden sich zwei weitere Nervenfasern, welche ebenfalls gezählt wurden. Somit sind in diesem Abschnitt der Epidermis insgesamt drei Nervenfasern erfasst worden. Im zweiten Bild ist eine Nervenfaser zu erkennen (weißer Pfeil), welche sich nach Durchlaufen der Basalmembran aufteilt und als eine Nervenfaser gezählt wurde.

2.5.2 METHODE ZUR AUSWERTUNG DER DERMALen NERVENFASERBÜNDEL

Zur Auswertung der dermalen Nervenfaserbündel wurde die Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und PGP 9.5 verwendet. Der Anti-PGP 9.5 Antikörper als axonaler Marker sorgte hierbei für eine Darstellung der dermalen Nervenfasern und mithilfe der Anti-MBP Immunfluoreszenz Färbung konnten zusätzlich myelinisierte Fasern identifiziert werden. Es wurden jeweils drei Hautschnitte einer Gewebeprobe analysiert. Auch hierbei erfolgte die Analyse verblindet und mithilfe der oben beschriebenen technischen Ausstattung.

Mit einem 2,5-fachen Objektiv und der SPOT Imaging Software wurde zunächst die Fläche (mm^2) der Hautschnitte vermessen und anschließend der Mittelwert aus den drei Messungen gebildet. Dabei wurden die Epidermis und der subepidermale Nervenplexus von der Messung ausgeschlossen. Zur Zählung der dermalen Bündel wurde, je nach Darstellung und Qualität des Schnittes, ein 20-faches oder 40-faches Objektiv verwendet. Als Bündel wurde eine Anhäufung von mindestens fünf Nervenfasern definiert (Doppler et al., 2012). Dabei wurde unterschieden, ob es sich um ein Bündel mit oder ohne myelinisierte Nervenfasern handelte. Zunächst wurde mithilfe der Anti-PGP 9.5 Immunfluoreszenz Färbung nach dermalen Nervenfaserbündeln gesucht. Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob in einem Bündel auch myelinisierte Nervenfasern, welche sich mithilfe der Anti-MBP Immunfluoreszenz Färbung darstellten, enthalten waren. Falls sich keine Anfärbung der Myelinscheide zeigte, wurden die Nervenfasern als Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern gezählt. Bei entsprechender Anfärbung als Bündel mit myelinisierten Nervenfasern. Diese beiden Kategorien ergaben schließlich die Gesamtanzahl an Bündel pro Schnitt. Anschließend wurden für die Kategorien Gesamtanzahl an Bündel, Bündel ohne und mit myelinisierte Nervenfasern die Mittelwerte aus den drei Hautschnitten berechnet, sowie die jeweilige Anzahl an Bündeln pro Fläche ($\text{Bündel}/\text{mm}^2$).

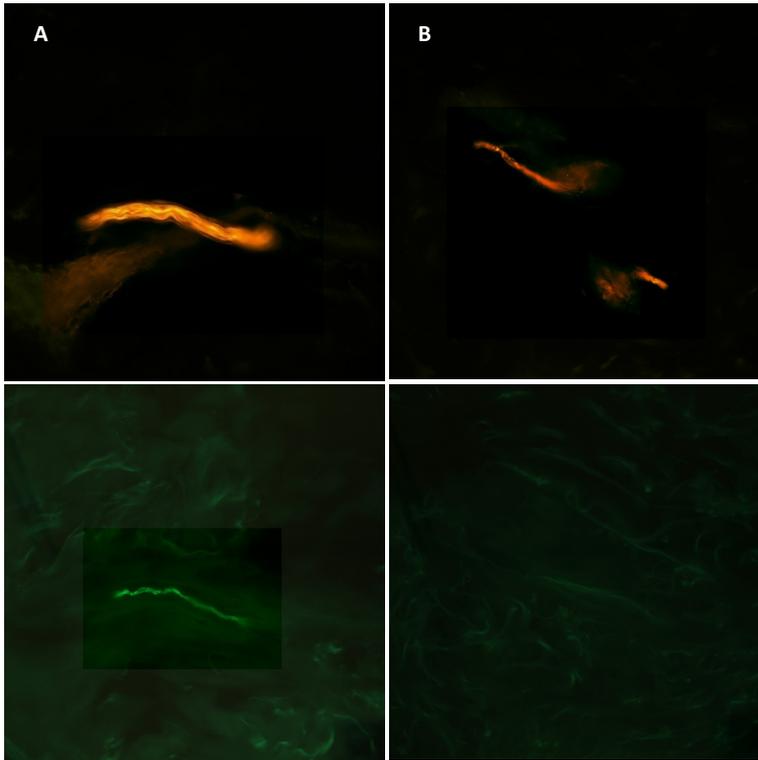


Abbildung 2.3: Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und PGP 9.5. **A:** Beispiel für ein dermales Nervenfaserbündel mit myelinisierten Nervenfasern. Im oberen Bild sind PGP-positive Nervenfasern (rot) und im unteren Bild MBP-positive Nervenfasern (grün) dargestellt. **B:** Beispiel für Nervenfaserbündel ohne myelinisierte Nervenfasern. Im oberen Bild sind PGP-positive Nervenfaserbündel (rot) dargestellt. Im unteren Bild keine Darstellung von myelinisierten Nervenfasern.

2.5.3 ANALYSE DER SCHNÜRRINGARCHITEKTUR

Zur Analyse der Schnürringarchitektur wurde ein Fluoreszenzmikroskop (AX10; Carl Zeiss GmbH; Oberkochen, Deutschland) mit einem CARVII-System und die VisiView Software (Visitron Systems GmbH; Puchheim, Deutschland) verwendet. Die Bildanalyse erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ.

2.5.3.1 Auswertung der Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Caspr

Zunächst wurde mithilfe eines 40-fachen Objektivs und der Anfärbung der Markscheiden, welche durch den Anti-MBP Antikörper markiert wurden, nach myelinisierten Nervenfasern gesucht. Wurde eine unterbrochene Kontinuität dieser Myelinscheide entdeckt, handelte es sich um einen Ranvier-Schnürring. Im nächsten Schritt konnte nun mithilfe des Anti-Caspr Antikörpers untersucht werden, ob die

paranodale Region in diesem Bereich dargestellt wurde. Bei einer solchen Markierung von Caspr wurde mithilfe der VisiView Software ein Bild dieser Nervenfasern zur Dokumentation und genaueren Analyse gespeichert. Von jeder Gewebeprobe wurden jeweils wieder drei Schnitte untersucht und die Gesamtanzahl an gefundenen Caspr Markierungen dokumentiert. Außerdem wurden Auffälligkeiten, wie eine Verlängerung eines Schnürrings und verbreiterte Caspr Anfärbungen notiert.

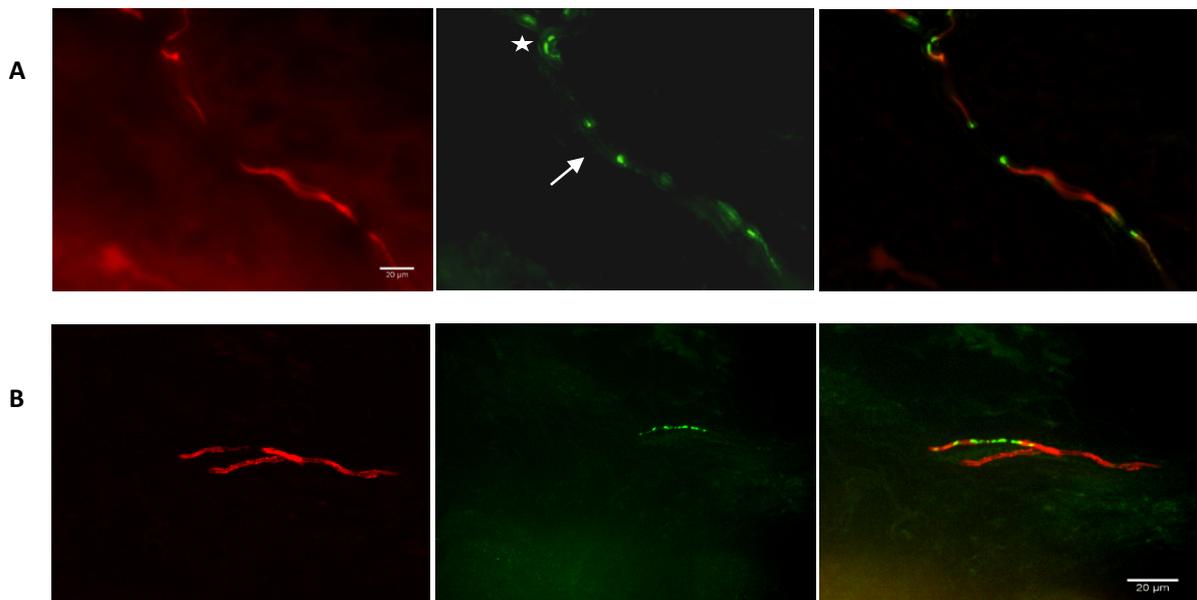


Abbildung 2.4: Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Caspr. **A:** Beispiel für einen verlängerten Schnürring bei einem Patienten mit Neuropathie. Das erste Bild zeigt eine MBP-positive (rot) Nervenfasern mit einer verlängerten Unterbrechung der Färbung. Im zweiten Bild ist die Caspr-positive (grün) Färbung der paranodalen Region des verlängerten Schnürrings (Pfeil) zu erkennen. Am oberen Bildrand ist eine regelrecht angefärbte paranodale Region (Stern) zu erkennen. Das dritte Bild stellt das Fusionsbild dar. **B:** Beispiel für eine Verbreiterung der Caspr Färbung bei einem Patienten. Das erste Bild zeigt MBP-positive (rot) Nervenfasern. Im Bild in der Mitte ist eine Caspr-positive (grün) Anfärbung der paranodalen Region gezeigt, welche verbreitert erscheint. Das dritte Bild zeigt das Fusionsbild.

2.5.3.2 Auswertung der Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Neurofascin

Die Analyse der nodalen und paranodalen Struktur des Ranvier'schen Schnürrings mithilfe der Neurofascin Färbung erfolgte mit selbiger Methode. Es wurden ebenfalls alle gefundenen Neurofascin Markierungen dokumentiert. Auffälligkeiten, wie

Verlängerungen der Schnürringe und Veränderungen der Neurofascin Markierungen wurden notiert.

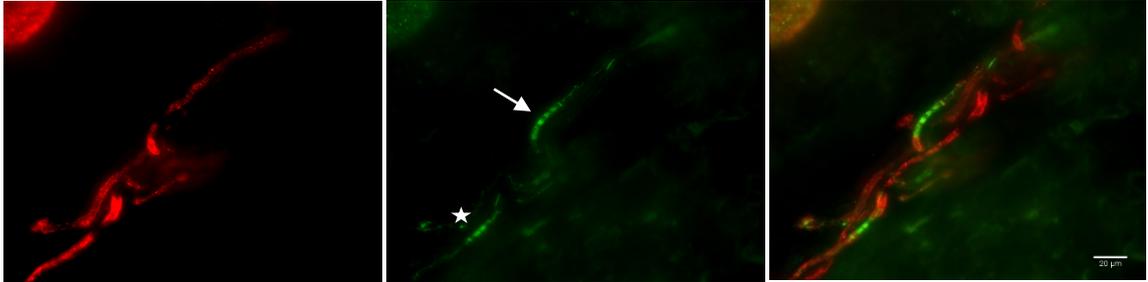


Abbildung 2.5: Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Neurofascin. Beispiel für eine Verbreiterung der Neurofascin Färbung bei einem Patienten mit Neuropathie. Das erste Bild zeigt MBP-positiv (rot) angefärbte Nervenfasern mit kurzen Kontinuitätsunterbrechungen als Hinweise auf Ranvier-Schnürringe. Das Bild in der Mitte zeigt eine Verbreiterung (Pfeil) der Neurofascin-positiven (grün) Anfärbung und einen Schnürring mit einer normalen Anfärbung (Stern) der nodalen und paranodalen Region. Das rechte Bild stellt das Fusionsbild dar.

2.5.3.3 Auswertung der Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Natrium-Kanal

Die Auswertung der Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Natrium-Kanal wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Es ergab sich lediglich ein Unterschied in der Markierung der neuronalen Strukturen durch die Verwendung der Sekundärantikörper. Die Markscheide wurde hierbei im Vergleich zu den beiden obigen Färbungen durch den Alexa Fluor488-konjugierten Antikörper markiert und die Natriumkanäle, als Element der nodalen Region, durch den Cy3-konjugierten Antikörper. Auch bei dieser Auswertung wurden alle gefundenen Markierungen der Natriumkanäle und Auffälligkeiten dokumentiert. Es wurde auf Verlängerungen der Ranvier-Schnürringe, sowie auf Veränderungen und Verdopplungen der Natrium-Kanal Markierungen geachtet.

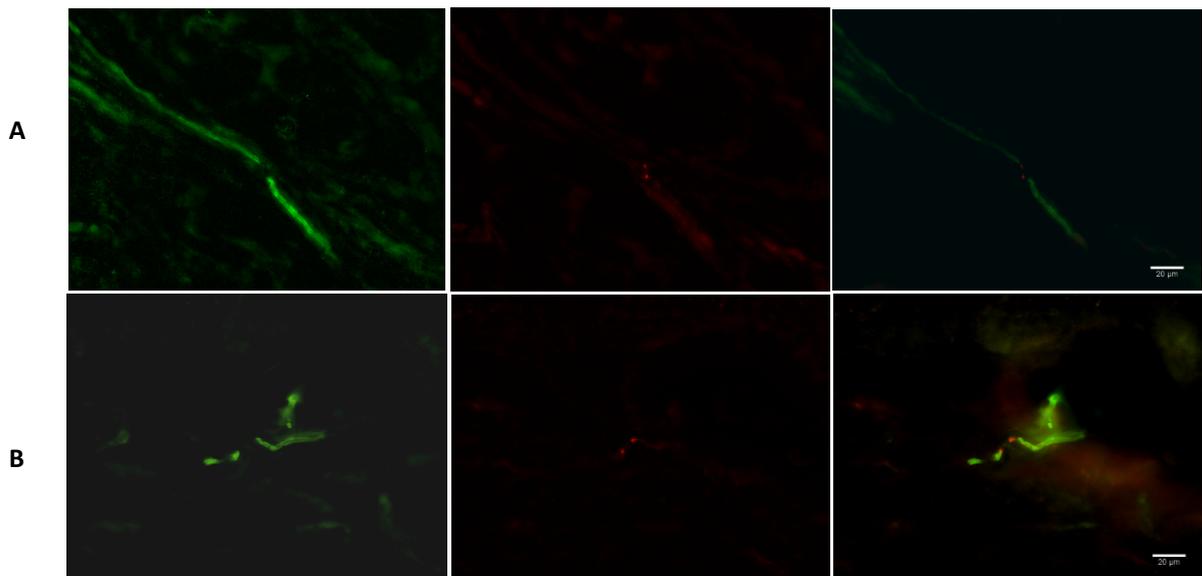


Abbildung 2.6: Immunfluoreszenz Doppelfärbung MBP und Natrium-Kanal. **A:** Beispiel für einen verlängerten Schnürring und eine Verdopplung der Natriumkanal Anfärbung bei einem Patienten mit D. mellitus. Im ersten Bild ist eine MBP-positive Nervenfasern (grün) mit einem verlängerten Schnürring dargestellt. Das zweite Bild zeigt eine Verdopplung der Natriumkanal-positiven (rot) nodalen Region. Das dritte Bild stellt das Fusionsbild dar. **B:** Beispiel für eine Verlängerung des Schnürrings und eine Verdopplung der Natriumkanal Anfärbung bei einer Kontrollperson. Das erste Bild zeigt eine MBP-positive (grün) Nervenfasern mit einem verlängerten Schnürring. Im mittleren Bild ist eine Na-Kanal-positive (rot) Verdopplung der nodalen Region dargestellt. Das dritte Bild zeigt das Fusionsbild.

2.5.3.4 Auswertung der Länge der Ranvier-Schnürringe

Zur Analyse der Länge der Ranvier'schen Schnürringe wurden zunächst Schnürringe von 100 Kontrollpersonen ausgemessen und der Mittelwert (4,42 µm) mit der Standardabweichung (SD 1,8) bestimmt. Zur Berechnung des Grenzwertes der Schnürringe wurde der Mittelwert plus die zweifache Standardabweichung verwendet. Als oberer Normwert für die Länge der Ranvier-Schnürring ergab sich somit ein Wert von 8,02 µm.

2.6 Fallzahlplanung und statistische Auswertung

Die Fallzahlplanung basierte auf der primären Hypothese, dass sich an den Schnürringen von myelinisierten Nervenfasern der Haut bei Patienten mit diabetischer Neuropathie Veränderungen in der Verteilung der Schnürringproteine im Vergleich zu Normalkontrollen feststellen lassen. Für diese Auswertung sollte der Chi-Quadrat-Test verwendet werden. Anhand der Daten von Vorläuferstudien (Doppler et al., 2012) ergab sich eine angenommene aufzudeckende Differenz von 0,3 in den Anteilswerten (0,05 bei Kontrollen, 0,35 bei Patienten). Bei einer Power von 80% und einem Signifikanzniveau von 5% ergab sich eine benötigte Fallzahl von 25 Kontrollen und 25 Patienten mit diabetischer Neuropathie, aufgrund einer angenommenen Drop-out-Rate von 10% wurde die Fallzahl auf mindestens 28 Probanden pro Gruppe angesetzt. Leichte Abweichungen in der tatsächlichen Fallzahl sind bedingt durch Abweichungen in der tatsächlichen Drop-out-Rate und in der nachträglichen Diagnose einer diabetischen Neuropathie im Rahmen der Studienergebnisse.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm IBM SPSS Statistics 21 verwendet (IBM GmbH, Ehningen, Deutschland). Die Überprüfung der Studienergebnisse auf signifikante Unterschiede erfolgte mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests, des Mann-Whitney-U-Tests und des Wilcoxon-Rangsummentests. Für die Auswertung der Korrelationen wurde der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient und für die Auswertung der kategorialen Daten der Chi-Quadrat-Test herangezogen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Demographische Daten

3.1.1 STUDIENTEILNEHMER

Von den 52 Studienteilnehmern waren insgesamt 41 Patienten Typ II Diabetiker und 11 Patienten Typ I Diabetiker. Unter den Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ I befanden sich wiederum 4 Patienten mit der Sonderform *LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)*.

Die Gruppe *Diabetes mellitus* umfasste insgesamt 17 Personen. Es waren 11 Personen mit einem Diabetes Typ II und 6 Personen mit einem Diabetes Typ I vertreten, davon 3 Personen mit einem *LADA*. Die Gruppe beinhaltete 5 weibliche und 12 männliche Patienten. Der Altersmedian lag bei 56,0 Jahren mit einer Spanne von 22 bis 80 Jahren (siehe Tabelle 3.2).

Der Median des *HbA1c-Werts* lag bei 6,9 % mit einer Spannweite von 5,3 % bis 9,0 %. Bei zwei Patienten konnte kein *HbA1c-Wert* erfasst werden. Der Median der Erkrankungsdauer in dieser Gruppe betrug 6,0 Jahre. Dabei reichte die Dauer von der Diagnosestellung bis zur Erhebung der Daten von 0 Monaten bis 30 Jahren (siehe Tabelle 3.1). Zwei Patienten konnten keine Auskunft über den Zeitpunkt der Diagnose geben, auch die Krankenakteneinsicht lieferte hierzu keine Erkenntnisse. Die Erhebung der Krankheitsdauer gestaltete sich zum Teil schwierig, da sich einige Patienten nicht an den genauen Zeitpunkt der Diagnose erinnern konnten. Ein weiteres Problem lag daran, dass die Diagnose möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt erhoben wurde und einige Patienten bereits im Vorfeld unbemerkt an Diabetes mellitus erkrankt waren. Insgesamt wurden 16 Patienten dieser Gruppe medikamentös behandelt. Bei 9 Patienten genügte eine Medikation mit oralen Antidiabetika zur Einstellung des Glukosehaushalts, 5 Patienten wurden mit Insulin behandelt und 2 Patienten mit einer Kombinationstherapie aus oralen Antidiabetika und Insulin. Ein Patient konnte zum Zeitpunkt der Datenerhebung eine ausreichende Blutzuckerkontrolle durch diätetische Maßnahmen ohne Medikation erreichen.

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* waren insgesamt 35 Studienteilnehmer vertreten, 30 Personen mit einem Typ II Diabetes und 5 Personen mit einem Typ I Diabetes, davon eine Person mit der Sonderform *LADA*. In der Gruppe waren 13 weibliche und 22 männliche Patienten vertreten. Der Altersmedian lag bei 69,0 Jahren mit einer Spanne von 40 bis 84 Jahren (siehe Tabelle 3.2). Der Median des *HbA1c-Werts* betrug in dieser Gruppe 6,8 %, wobei die Werte zwischen 4,9 % und 11,1 % variierten. Bei einem Patienten konnte kein *HbA1c-Wert* erhoben werden. Der Median der Erkrankungsdauer ergab einen Wert von 10,0 Jahren mit einer maximalen Erkrankungsdauer von 37 Jahren. Bei drei Patienten wurde die Diagnose zum Zeitpunkt der Studiendurchführung gestellt (siehe Tabelle 3.1). Alle Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* wurden medikamentös behandelt. Insgesamt erhielten 20 Patienten eine Medikation mit oralen Antidiabetika zur Einstellung des Blutglukosewertes. 6 Patienten wurden mit Insulin behandelt, wovon 2 Patienten mit einer Insulinpumpe versorgt waren. 9 Patienten wurden mit einer Kombinationsmedikation aus oralen Antidiabetika und Insulin behandelt. Bei 24 Patienten wurde bereits im Vorfeld eine diabetische Neuropathie diagnostiziert bzw. der Verdacht auf eine Neuropathie geäußert. Diese Patienten zeigten typische Symptome, wie Hypästhesie, Dysästhesie, Schmerzen, muskuläre Schwäche und Gangunsicherheit.

Die Krankheitsdauer und der *HbA1c-Wert* der beiden Gruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede. Das Alter der Studienteilnehmer ergab jedoch einen signifikanten Unterschied mit einem höheren Alter bei den Patienten mit diabetischer Neuropathie im Vergleich zu den Patienten mit Diabetes mellitus ohne Neuropathie ($p=0,015$).

	Diabetische Neuropathie	Diabetes mellitus
Typ II	30	11
Typ I	5	6
Median HbA1c-Wert (%)	6,8	6,9
Spanne HbA1c-Wert (%)	4,9 – 11,1	5,3 – 9,0
Median Erkrankungsdauer (in Jahren)	10,0	6,0
Spanne der Erkrankungsdauer	0 Mo. - 37 J.	0 Mo. - 30 J.

Tabelle 3.1: Diabetes Typ I/II, HbA1c-Wert, Erkrankungsdauer der Studienteilnehmer

3.1.2 KONTROLLEN

Insgesamt konnten 31 Kontrollpersonen rekrutiert werden, davon 16 männliche und 15 weibliche Probanden. Der Altersmedian des Kontrollkollektivs lag bei 57,5 Jahren mit einer Spannweite von 23 bis 77 Jahren und zeigte zwischen der Kontroll- und Diabetes-Gruppe keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 3.2). Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch zwischen der Kontroll- und Neuropathie-Gruppe ($p=0,001$).

	Diabetische Neuropathie	Diabetes mellitus	Kontrollen
Anzahl der Studienteilnehmer	35	17	31
Median Alter (Jahre)	69,0	56,0	57,5
Altersspanne (Jahre)	40 - 84	22 - 80	23 - 77
Männliche Personen	22	12	16
Median Alter (Jahre)	69,0	55,0	57,0
Altersspanne (Jahre)	45 - 80	22 - 72	32 – 77
Weibliche Personen	13	5	15
Median Alter (Jahre)	64,0	62,0	58,0
Altersspanne(Jahre)	40 - 84	50 - 80	23 – 73

Tabelle 3.2: Demographische Daten der Studienteilnehmer

3.2 Elektroneurographie des *Nervus suralis*

Von allen Teilnehmern der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten elektrophysiologische Messungen des N. suralis mit Bestimmung des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) und der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) durchgeführt werden. Bei 8 Patienten konnten in den Messungen des SNAP und der NLG keine Reizantworten abgeleitet werden. 19 Patienten hatten ein pathologisch vermindertes sensibles SNAP, wovon 6 Patienten zusätzlich eine reduzierte NLG zeigten. Bei keinem der Patienten zeigte sich eine isolierte Verlangsamung der NLG bei unauffälligem SNAP. Weitere 8 Patienten zeigten unauffällige Ergebnisse in der Elektroneurographie. Diese wurden jedoch aufgrund von Symptomen oder klinischen Zeichen einer Neuropathie nach der Klassifikation von Tesfaye et al. in die Gruppe *Diabetische Neuropathie* eingeteilt (Teskaye et al., 2010).

Bei zwei Teilnehmern der Gruppe *Diabetes mellitus* konnten keine elektrophysiologischen Messungen durchgeführt werden. Alle anderen Teilnehmer zeigten regelrechte Ergebnisse bei der Auswertung und dem Vergleich mit den Referenzwerten der Neurologischen Klinik (Normwerte: NLG > 40 m/s; SNAP > 10 μ V für Patienten < 65 Jahre und > 5 μ V für Patienten > 65 Jahre).

In der Auswertung der Ergebnisse des SNAP zeigte sich eine signifikant verminderte Amplitude ($p < 0,0005$) in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* im Vergleich zur Gruppe *Diabetes mellitus* (siehe Diagramm 3.1). Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,013$) konnte auch in der Auswertung der NLG gefunden werden, welche in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* im Vergleich zur Gruppe *Diabetes mellitus* signifikant vermindert war (siehe Diagramm 3.2).

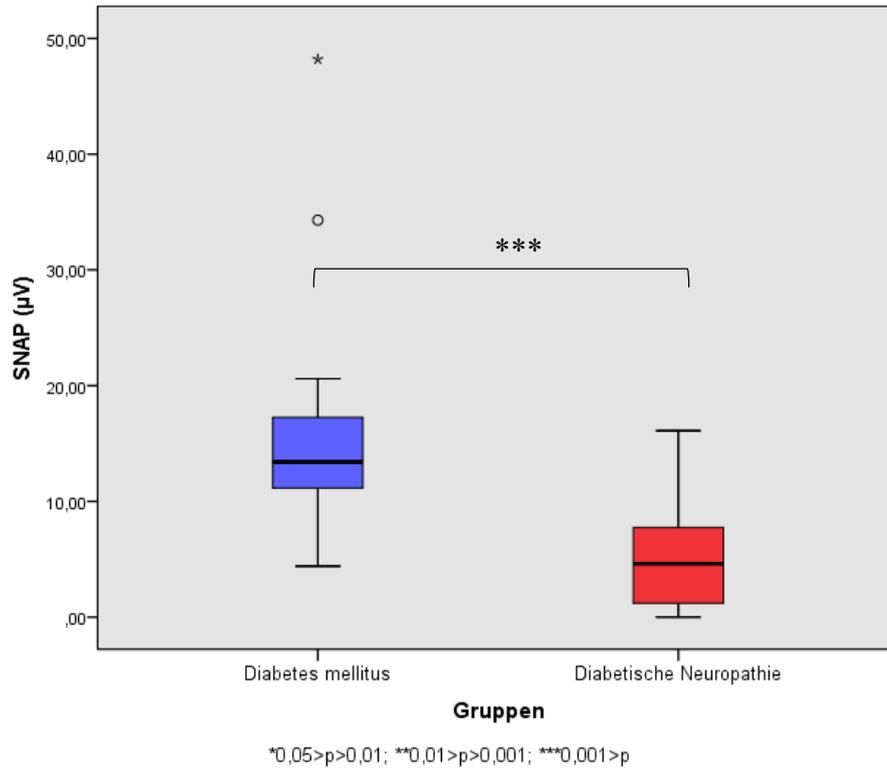


Diagramm 3.1: Vergleich des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP in μV). Gruppe Diabetes mellitus: Median=13,4; Range=4,4-48,2. Gruppe Diabetische Neuropathie: Median=4,6; Range=0-16,1. Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe Diabetes mellitus und der Gruppe Diabetische Neuropathie ($p < 0,0005$).

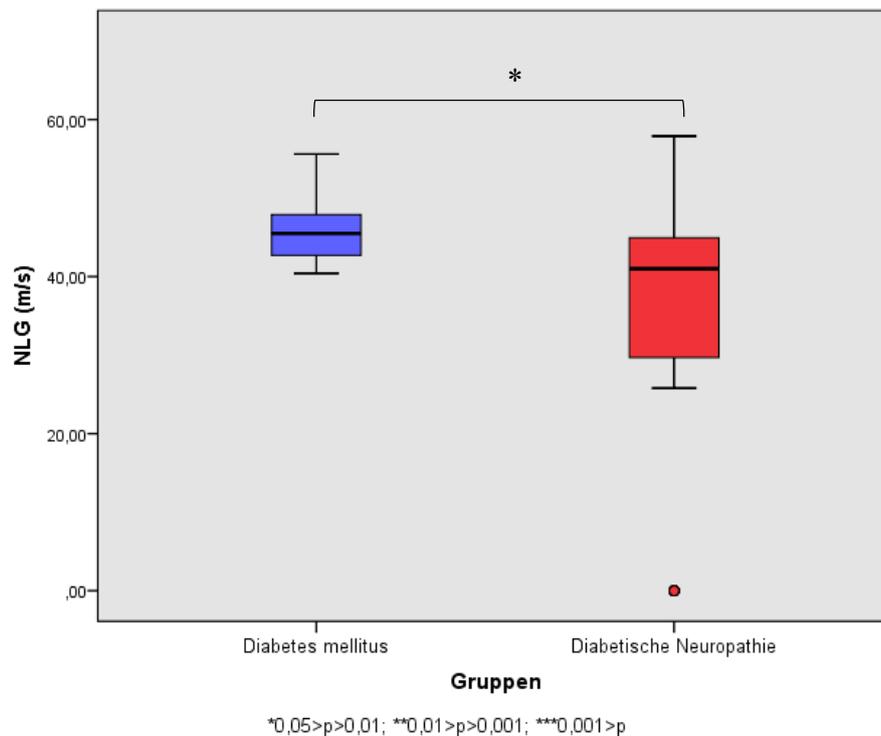


Diagramm 3.2: Vergleich der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG in m/s). Diabetes mellitus: Median=45,5; Range=40,4-55,6. Diabetische Neuropathie: Median=41,0; Range=0-57,9. Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe Diabetes mellitus und der Gruppe Diabetische Neuropathie ($p = 0,013$).

Eine Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP und dem Alter, dem HbA1c-Wert und der Krankheitsdauer für die Gesamtgruppe aus den Gruppen *Diabetes mellitus* und *Diabetische Neuropathie*, sowie für die beiden einzelnen Gruppen wurde überprüft.

Eine signifikante Korrelation war zwischen der Amplitude des SNAP und der Krankheitsdauer für die Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und die Gesamtgruppe nicht zu erkennen.

Für die Gesamtgruppe zeigte sich eine signifikante negative Korrelation in der Amplitude des SNAP und dem Alter der Patienten (Korrelationskoeffizient=-0,519; $p < 0,0005$) (siehe Diagramm 3.3). In der Auswertung der einzelnen Gruppen konnte für die Gruppe *Diabetische Neuropathie* ebenfalls eine signifikante negative Korrelation zwischen der Amplitude und dem Alter nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient=-0,409; $p = 0,015$) (siehe Diagramm 3.4), jedoch keine signifikante Korrelation für die Gruppe *Diabetes mellitus*.

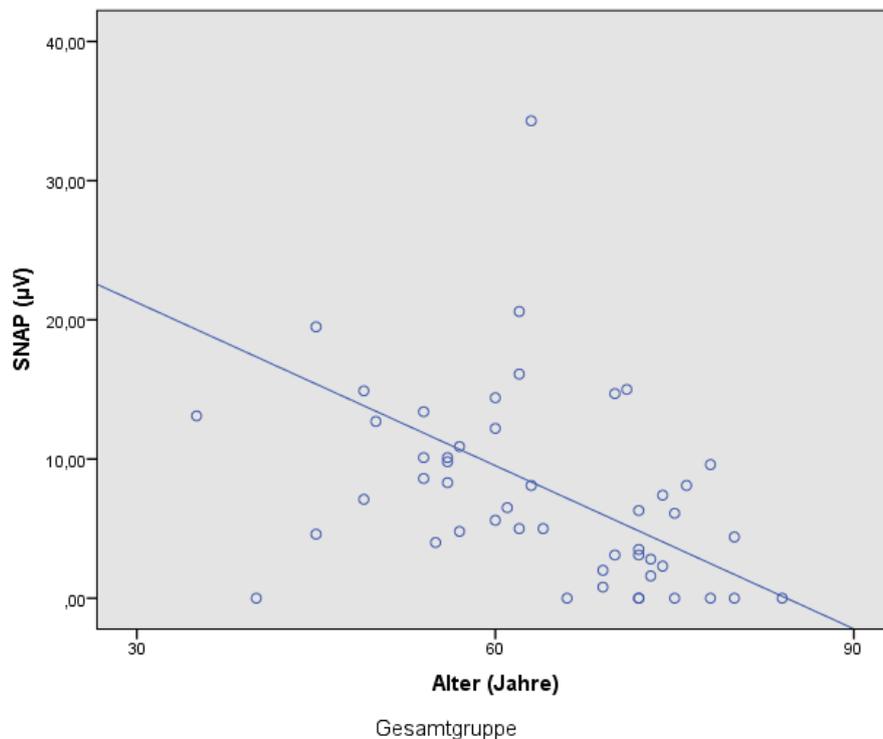
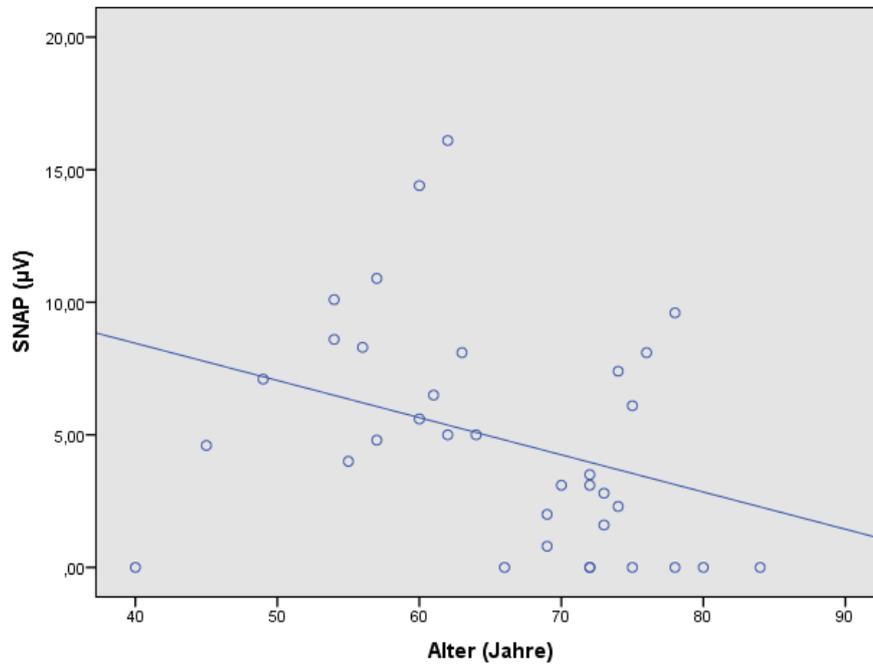


Diagramm 3.3: Signifikante negative Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP und dem Alter der Patienten in der Gesamtgruppe (Korrelationskoeffizient=-0,519; $p < 0,0005$)



Gruppe Diabetische Neuropathie

Diagramm 3.4: Signifikante negative Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP und dem Alter der Patienten in der Gruppe Diabetische Neuropathie (Korrelationskoeffizient=-0,409; p=0,015).

Zwischen der Amplitude des SNAP und dem HbA1c-Wert konnte keine lineare Korrelation für die Gesamtgruppe und für die Gruppe *Diabetische Neuropathie* nachgewiesen werden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Amplitude und dem HbA1c-Wert (Korrelationskoeffizient=-0,630; p=0,021) (siehe Diagramm 3.5).

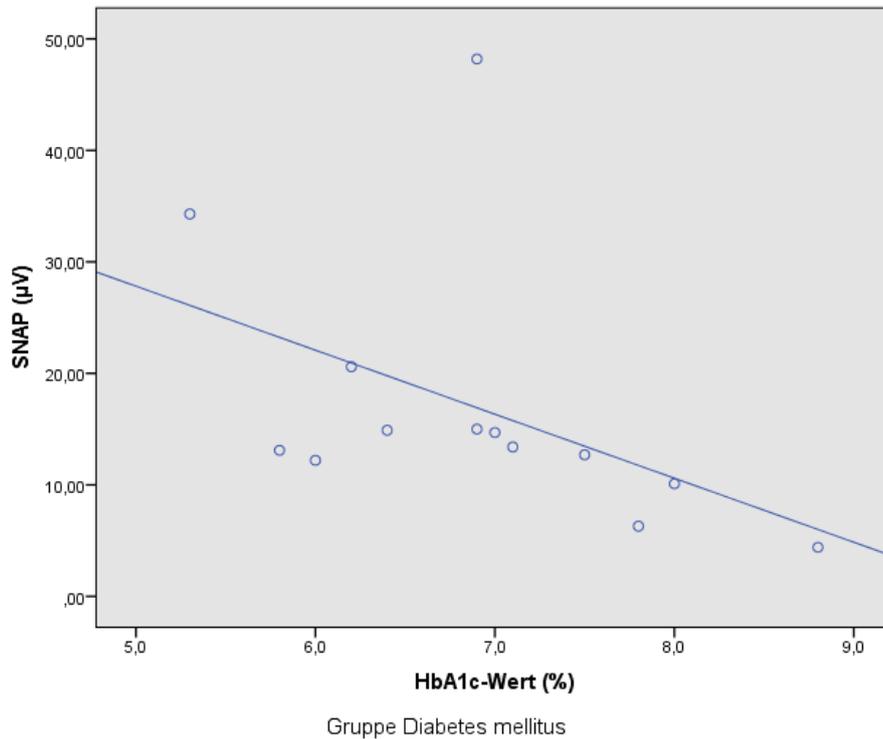


Diagramm 3.5: Signifikante negative Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP und dem HbA1c-Wert in der Gruppe *Diabetes mellitus* (Korrelationskoeffizient=-0,630; p=0,021).

Eine Auswertung der Korrelation für die NLG und das Alter bzw. den HbA1c-Wert und die Krankheitsdauer wurde ebenso für die Gruppen Diabetes mellitus, Diabetische Neuropathie und die Gesamtgruppe durchgeführt. Eine signifikante Korrelation zwischen der NLG und dem HbA1c-Wert bzw. der Krankheitsdauer konnte für keine der Gruppen nachgewiesen werden.

Eine signifikante negative Korrelation wurde zwischen der NLG und dem Alter der Patienten für die Gesamtgruppe nachgewiesen (Korrelationskoeffizient=-0,383; p=0,006) (siehe Diagramm 3.6). Eine Korrelation für die Gruppen Diabetes mellitus und Diabetische Neuropathie konnte nicht gezeigt werden.

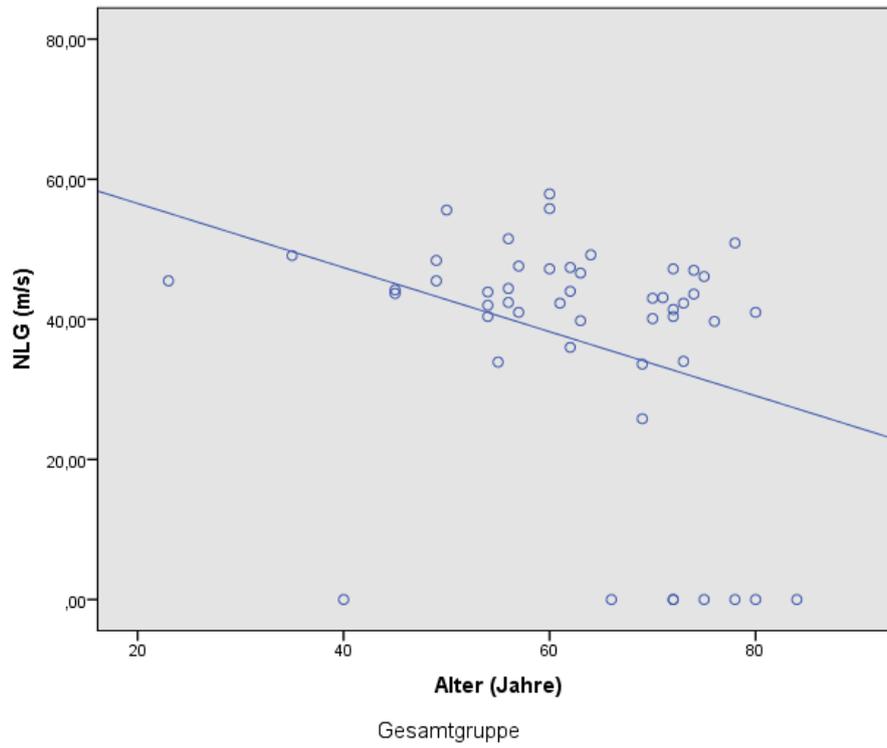


Diagramm 3.6: Signifikante negative Korrelation zwischen der NLG und dem Alter in der Gesamtgruppe (Korrelationskoeffizient=-0,383; p=0,006).

3.3 Quantitative sensorische Testung

Die Auswertung der quantitativen sensorischen Testung (QST) erfolgte anhand standardisierter alters- und geschlechtsspezifischer Normwerte für das jeweils untersuchte Körperareal (Magerl et al., 2010). Außerdem erfolgte ein direkter Vergleich der Werte der Patientengruppe mit einer alters- und geschlechtsadaptierten Kontrollgruppe nach dem Protokoll von Magerl et al.

Von den insgesamt 17 Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* konnte bei 16 Teilnehmern eine QST durchgeführt werden. Bei einem Teilnehmer konnte keine Messung erhoben werden. Ein Patient hatte hierbei in allen Messungen der Testreihe unauffällige Werte. 15 Patienten zeigten in mindestens einer Kategorie der Testung von der Norm abweichende Werte. Die auffälligen Messungen verteilten sich auf die Kategorien Kaltschwelle, Warmschwelle, Unterschiedsschwelle, paradoxe Hitzeempfindung, Kälteschmerzschwelle, Hitzeschmerzschwelle, taktile Detektionsschwelle, mechanische Schmerzschwelle, mechanische Schmerzsensitivität, Wind-up-Ratio und Druckschmerzschwelle (siehe Tabelle 3.3).

Von den 35 Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten bei 2 Teilnehmern keine Messungen durchgeführt werden. Alle 33 Patienten, von welchen eine Testung erhoben wurde, zeigten in mindestens einer Kategorie ein auffälliges Ergebnis. Die von der Norm abweichenden Ergebnisse waren auf die Kategorien Kaltschwelle, Warmschwelle, Unterschiedsschwelle, paradoxe Hitzeempfindung, Kälteschmerzschwelle, Hitzeschmerzschwelle, taktile Detektionsschwelle, mechanische Schmerzschwelle, mechanische Schmerzsensitivität, Wind-up-Ratio, Vibrationsschwelle und Druckschmerzschwelle verteilt (siehe Tabelle 3.3).

In der Kontrollgruppe konnten von den insgesamt 31 Teilnehmern bei 27 Kontrollen eine Testung durchgeführt werden. Von 4 Teilnehmern konnten keine Messungen erhoben werden. 2 Kontrollen zeigten in allen Kategorien unauffällige Werte. 25 Teilnehmer hatten mindestens ein auffälliges Ergebnis in der Testreihe. Die von der Norm abweichenden Werte waren in den Kategorien Kaltschwelle, Warmschwelle, Unterschiedsschwelle, paradoxe Hitzeempfindung, Hitzeschmerzschwelle, taktile

Detektionsschwelle, mechanische Schmerzschwelle, mechanische Schmerzsensitivität, Wind-up-Ratio, Vibrationsschwelle und Druckschmerzschwelle zu finden (siehe Tabelle 3.3).

	Kontrollen	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie
CDT			
Testareal	-	1	11
Kontrollareal	3	3	2
WDT			
Testareal	-	1	1
Kontrollareal	5	2	5
TSL			
Testareal	1	4	4
Kontrollareal	1	-	3
PHS			
Testareal	6	3	9
Kontrollareal	-	-	-
CPT			
Testareal	-	1	1
Kontrollareal	-	-	-
HPT			
Testareal	3	3	5
Kontrollareal	-	1	1
MDT			
Testareal	4	3	8
Kontrollareal	1	-	3
MPT			
Testareal	17	14	25
Kontrollareal	14	9	16
MPS			
Testareal	9	5	21
Kontrollareal	7	5	15
DMA			
Testareal	-	-	-
Kontrollareal	-	-	-
WUR			
Testareal	5	4	16
Kontrollareal	7	4	9
VDT			
Testareal	1	-	8
Kontrollareal	-	-	3
PPT			
Testareal	3	3	4
Kontrollareal	-	-	3

Tabelle 3.3: Übersicht Anzahl an Patienten mit auffälligen Ergebnissen (Normwerte nach Magerl) in den Kategorien der QST (Magerl et al., 2010). CDT=Kaltschwelle, WDT=Warmschwelle, TSL=Unterschiedsschwelle, PHS=Paradoxe Hitzeempfindungen, CPT=Kälteschmerzschwelle, HPT=Hitzeschmerzschwelle, MDT=Taktile Detektionsschwelle, MPT=Mechanische Schmerzschwelle, MPS=Mechanische Schmerzsensitivität, DMA=Dynamische mechanische Allodynie, WUR=Wind-up-Ratio, VDT=Vibrationsschwelle, PPT=Druckschmerzschwelle.

In der statistischen Auswertung der Ergebnisse der QST konnte zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen ein signifikanter Unterschied in der Kategorie mechanische Schmerzschwelle (MPT) für das Kontrollareal ($p=0,01$) und in der Kategorie Druckschmerzschwelle (PPT) für das Testareal ($p=0,03$) gefunden werden (siehe Diagramm 3.7).

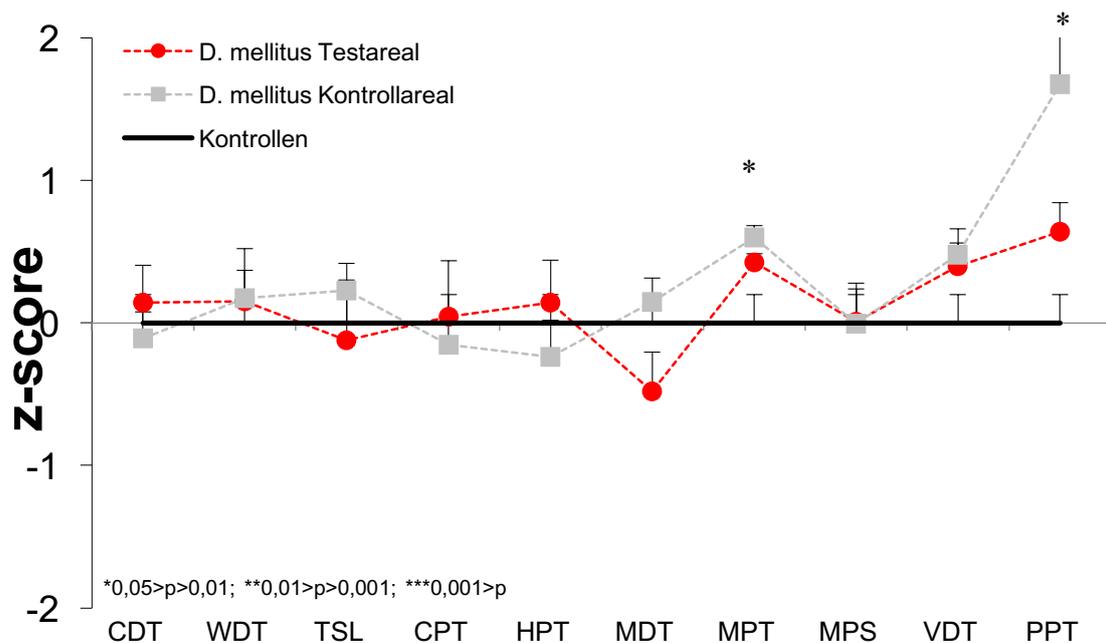


Diagramm 3.7: Vergleich quantitative sensorische Testung (QST) zwischen Gruppe *Diabetes mellitus* und Gruppe *Kontrollen*. Signifikanter Unterschied in den Kategorien MPT Kontroll ($p=0,01$) und PPT Test ($p=0,03$). D. mellitus Testareal=Gruppe Diabetes mellitus Fußrücken, D. mellitus Kontrollareal=Gruppe Diabetes mellitus Wange, CDT=Kaltschwelle, WDT=Warmschwelle, TSL=Unterschiedsschwelle, CPT=Kälteschmerzschwelle, HPT=Hitzeschmerzschwelle, MDT=Taktile Detektionsschwelle, MPT=Mechanische Schmerzschwelle, MPS=Mechanische Schmerzsensitivität, VDT=Vibrationsschwelle, PPT=Druckschmerzschwelle.

Ein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen des Testareals konnte auch zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen in den Kategorien taktile Detektionsschwelle (MDT; $p<0,0005$), mechanische Schmerzschwelle (MPT; $p=0,03$), mechanische Schmerzsensitivität (MPS; $p=0,02$) und Vibrationsschwelle (VDT; $p=0,04$) nachgewiesen werden (siehe Diagramm 3.8).

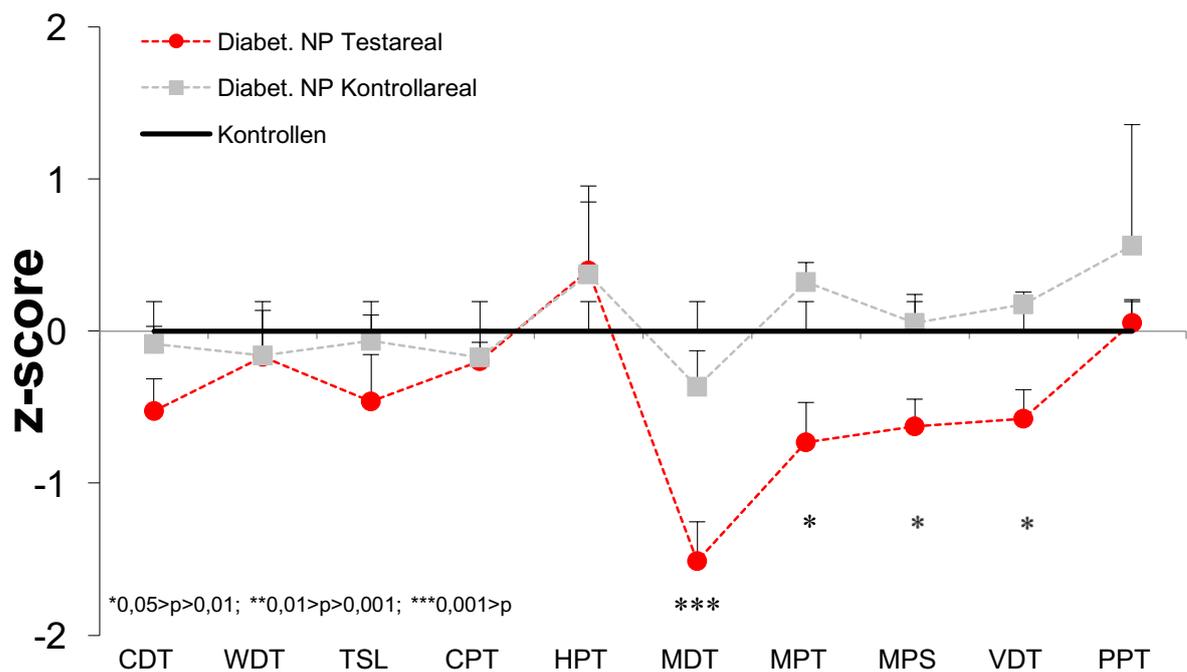


Diagramm 3.8: Vergleich quantitative sensorische Testung (QST) zwischen Gruppe *Diabetische Neuropathie* und Gruppe *Kontrollen*. Signifikanter Unterschied in den Kategorien MDT Test ($p < 0,0005$), MPT Test ($p = 0,03$), MPS Test ($p = 0,02$) und VDT Test ($p = 0,04$). Diabet. NP Testareal=Gruppe Diabetische Neuropathie Fußrücken, Diabet. NP Kontrollareal=Gruppe Diabetische Neuropathie Wange, CDT=Kaltschwelle, WDT=Warmschwelle, TSL=Unterschiedsschwelle, CPT=Kälteschmerzschwelle, HPT=Hitzeschmerzschwelle, MDT=Taktile Detektionsschwelle, MPT=Mechanische Schmerzschwelle, MPS=Mechanische Schmerzsensitivität, VDT=Vibrationsschwelle, PPT=Druckschmerzschwelle.

In der statistischen Auswertung der QST-Ergebnisse zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* konnte ein signifikanter Unterschied im Testareal in den Kategorien taktile Detektionsschwelle (MDT; $p < 0,0005$), mechanische Schmerzschwelle (MPT; $p = 0,02$), mechanische Schmerzsensitivität (MPS; $p = 0,02$) und Vibrationsschwelle (VDT; $p = 0,001$) gefunden werden (siehe Diagramm 3.9).

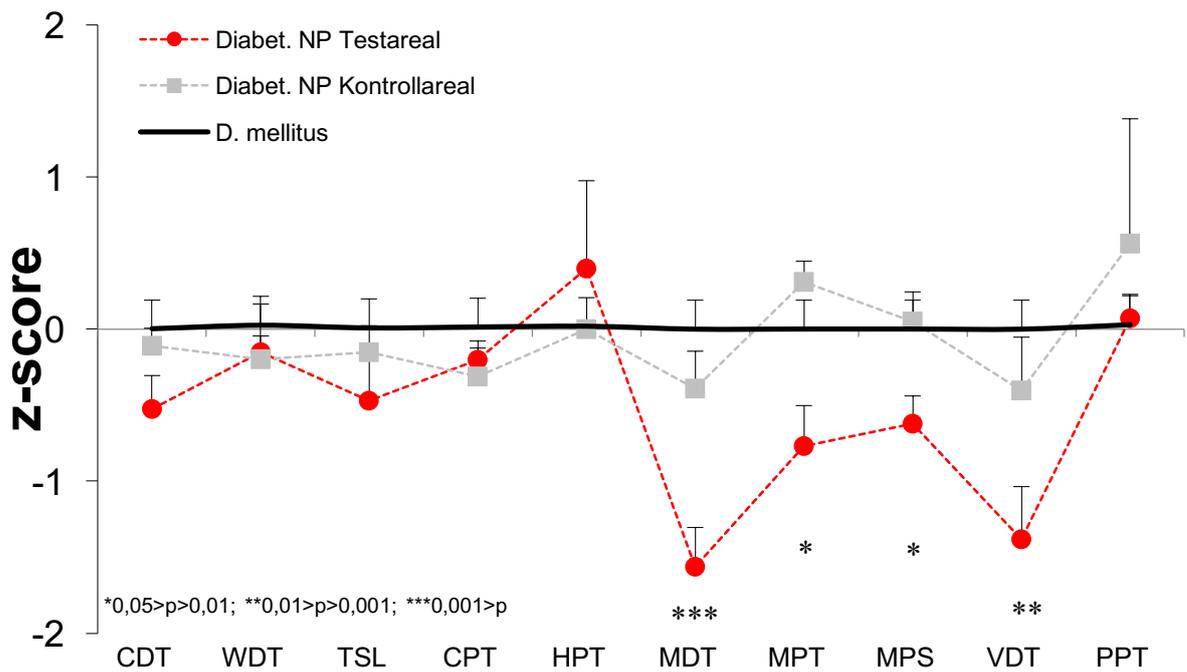


Diagramm 3.9: Vergleich quantitative sensorische Testung (QST) zwischen Gruppe *Diabetische Neuropathie* und Gruppe *Diabetes mellitus*. Signifikanter Unterschied in den Kategorien MDT Test ($p < 0,0005$), MPT Test ($p = 0,02$), MPS Test ($p = 0,02$), VDT Test ($p = 0,001$). Diabet. NP Testareal = Gruppe Diabetische Neuropathie Fußrücken, Diabet. NP Kontrollareal = Gruppe Diabetische Neuropathie Wange, CDT = Kaltschwelle, WDT = Warmschwelle, TSL = Unterschiedsschwelle, CPT = Kälteschmerzschwelle, HPT = Hitzeschmerzschwelle, MDT = Taktile Detektionsschwelle, MPT = Mechanische Schmerzschwelle, MPS = Mechanische Schmerzsensitivität, VDT = Vibrationsschwelle, PPT = Druckschmerzschwelle.

3.4 Intraepidermale Nervenfaserdichte

3.4.1 INTRAEPIDERMALER NERVENFASERDICHTEN DES UNTERSCHENKELS

Für die Auswertung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) des Unterschenkels konnte von 30 Kontrollpersonen eine Hautbiopsie entnommen werden. Von den insgesamt 35 Teilnehmern der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnte von 30 Personen eine Hautbiopsie des Unterschenkels entnommen werden. Die übrigen 5 Patienten wurden von der Gewebeentnahme aufgrund eines erhöhten Risikos für eine Wundheilungsstörung am Unterschenkel ausgeschlossen. Von allen 17 Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* konnte eine Hautbiopsie entnommen werden. Bei einem Patienten war allerdings in der mikroskopischen Auswertung keine Epidermis in der Gewebeprobe erhalten, weshalb diese Biopsie für die Ermittlung der IENFD kein Ergebnis lieferte. Bei 10 Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie*, sowie bei einer Kontrollperson, waren die Nervenfasern in der Epidermis auf den Wert 0 reduziert. Ein kompletter Verlust an intraepidermalen Nervenfasern konnte in der Gruppe *Diabetes mellitus* nicht gefunden werden.

In der statistischen Auswertung der IENFD des Unterschenkels wurden jeweils die Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und die Kontrollgruppe miteinander verglichen. Die Kontrollgruppe hatte hierbei im Vergleich die größte Dichte an Nervenfasern im Unterschenkel (Median=5,63). Die Gruppe *Diabetische Neuropathie* zeigte die geringste Dichte an Nervenfasern (Median=0,99) und die Gruppe *Diabetes mellitus* war zwischen den beiden Gruppen einzuordnen (Median=4,52). Es konnte ein signifikanter Unterschied der IENFD im Unterschenkel zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Kontrollgruppe gefunden werden ($p < 0,0005$). Ein signifikanter Unterschied wurde auch zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Gruppe *Diabetes mellitus* nachgewiesen ($p = 0,022$). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und der Kontrollgruppe konnte nicht gefunden werden (siehe Diagramm 3.10).

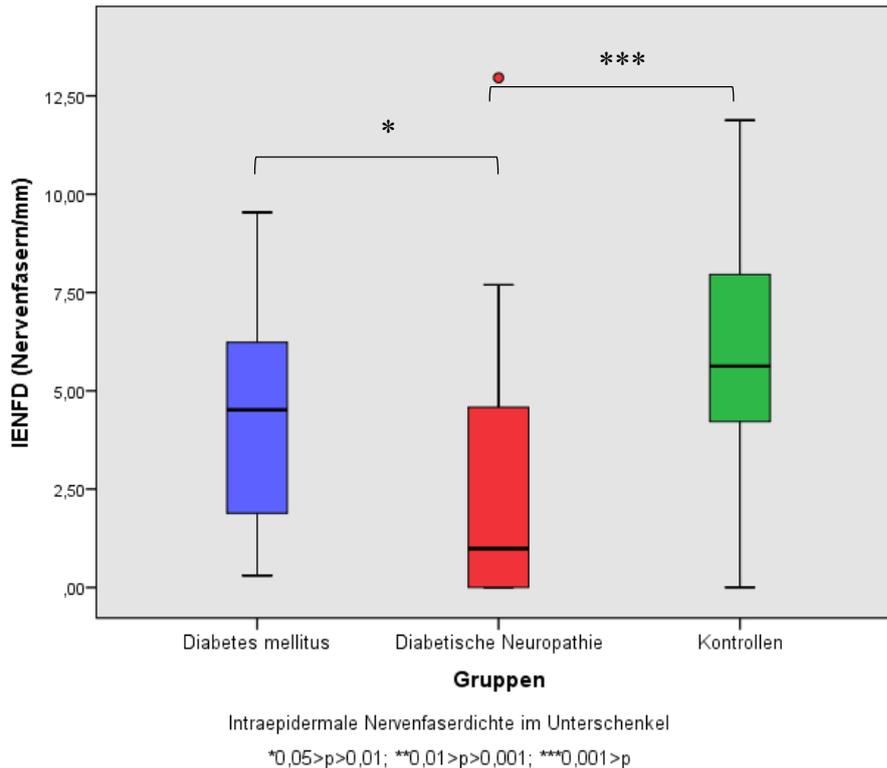


Diagramm 3.10: Intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) im Unterschenkel. Diabetes mellitus Median=4,52; Diabetische Neuropathie Median=0,99; Kontrollen Median=5,63. Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* ($p=0,022$) und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen ($p<0,0005$).

3.4.2 INTRAEPIDERMALERE NERVENFASERDICHTEN DES OBERSCHENKELS

Für die Auswertung der intraepidermalen Nervenfaserdichte des Oberschenkels konnten von allen Patienten und Kontrollen Hautbiopsien gewonnen werden und anschließend mikroskopisch ausgewertet werden. Ein kompletter Verlust an Nervenfasern in der Epidermis wurde bei 2 Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* beobachtet, jedoch nicht in der Gruppe *Diabetes mellitus* und in der Kontrollgruppe.

Die Kontrollgruppe hatte auch hierbei den höchsten Wert in der IENFD des Oberschenkels (Median=12,89). Die Gruppe *Diabetische Neuropathie* zeigte die geringste Dichte an Nervenfasern (Median=7,43) und die Gruppe *Diabetes mellitus* war auch hier zwischen den beiden Gruppen einzuordnen (Median=10,55). In der Auswertung konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische*

Neuropathie und der Kontrollgruppe gefunden werden ($p < 0,0005$). Ein signifikanter Unterschied konnte auch für die Gruppe *Diabetes mellitus* und die Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p = 0,037$). Zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* war kein signifikanter Unterschied vorhanden (siehe Diagramm 3.11).

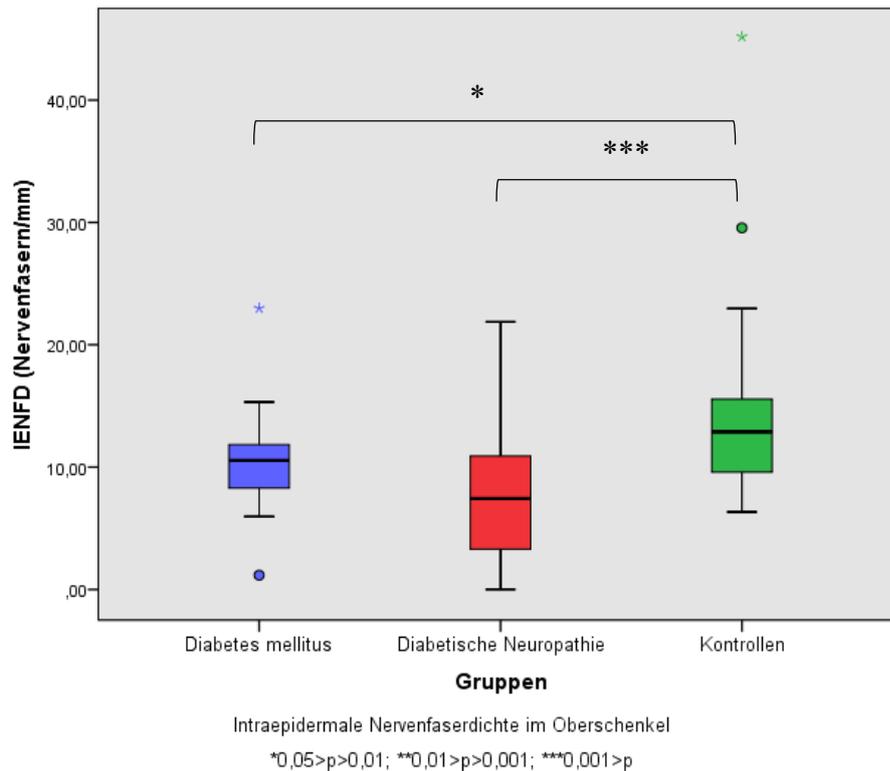


Diagramm 3.11: Intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) im Oberschenkel. Diabetes mellitus Median=10,55; Diabetische Neuropathie Median=7,43; Kontrollen Median=12,89. Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Kontrollgruppe ($p < 0,0005$) und zwischen der Gruppe Diabetes mellitus und der Kontrollgruppe ($p = 0,037$).

3.4.3 INTRAEPIDERMALERE NERVENFASERDICHTEN DES FINGERS

Bei allen Patienten der Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* konnten Hautbiopsien zur Auswertung der intraepidermalen Nervenfaserdichte des Fingers gewonnen werden. Für den Vergleich mit der Kontrollgruppe konnten bei 25 Kontrollen Gewebeproben entnommen werden. 5 Kontrollen waren mit der Hautbiopsie am Finger aufgrund einer befürchteten Einschränkung im Alltag nicht einverstanden. Einen vollständigen Verlust an Nervenfasern in der Epidermis zeigte ein

Patient aus der Gruppe *Diabetische Neuropathie*. In der Gruppe *Diabetes mellitus* und in der Kontrollgruppe war ein solcher Verlust nicht zu beobachten.

In der Auswertung zeigte sich auch an diesem Körperareal die höchste Dichte an Nervenfasern in der Kontrollgruppe (Median=6,27). Die Gruppe *Diabetische Neuropathie* hatte die niedrigste Dichte an Nervenfasern (Median=2,95) und die Gruppe *Diabetes mellitus* lag auch hier zwischen den beiden Gruppen (Median=5,34). Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Kontrollgruppe ($p=0,002$) und zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* ($p=0,01$) nachgewiesen werden (siehe Diagramm 3.12). Zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

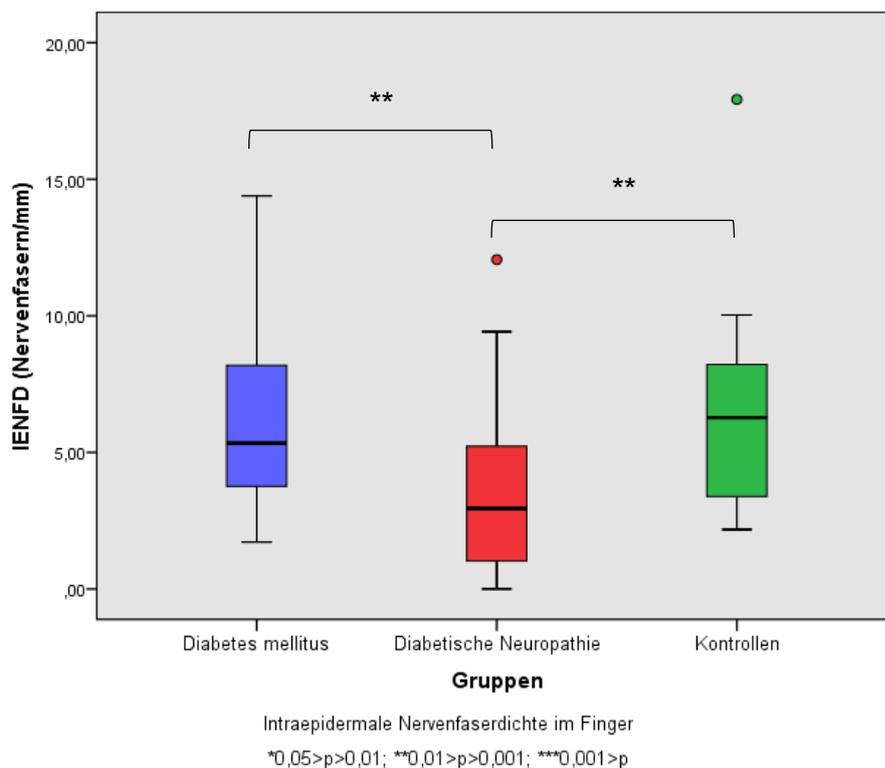


Diagramm 3.12: Intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) im Finger. Diabetes mellitus Median=5,34; Diabetische Neuropathie Median=2,95; Kontrollen Median=6,27. Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Kontrollgruppe ($p=0,002$) und zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* ($p=0,01$).

3.4.4 ÜBERSICHT DER INTRAEPIDERMALEN NERVENFASERDICHTE

Der Oberschenkel hatte in allen Gruppen die höchste Dichte an intraepidermalen Nervenfasern, gefolgt vom Finger. Die geringste Dichte an Nervenfasern war gruppenunabhängig im Unterschenkel vorhanden (siehe Tabelle 3.4 und Diagramm 3.13). Eine längenabhängige Abnahme der Nervenfaserdichte des Unterschenkels im Vergleich zum Oberschenkel konnte in der Gruppe *Diabetes mellitus* ($p < 0,0005$), *Diabetische Neuropathie* ($p < 0,0005$) und der Kontrollgruppe ($p < 0,0005$) gefunden werden (siehe Diagramm 3.14).

	Median	Minimum	Maximum
IENFD Unterschenkel			
Diabetes mellitus	4,52	0,3	9,54
Diabetische Neuropathie	0,99	0	12,96
Kontrollen	5,63	0	11,88
IENFD Oberschenkel			
Diabetes mellitus	10,55	1,17	22,99
Diabetische Neuropathie	7,43	0	21,88
Kontrollen	12,89	6,34	45,19
IENFD Finger			
Diabetes mellitus	5,34	1,72	14,39
Diabetische Neuropathie	2,95	0	12,06
Kontrollen	6,27	2,18	17,92

Tabelle 3.4: Übersicht der intraepidermalen Nervenfaserdichte in den Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen. Median, Minimum und Maximum der IENFD im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger.

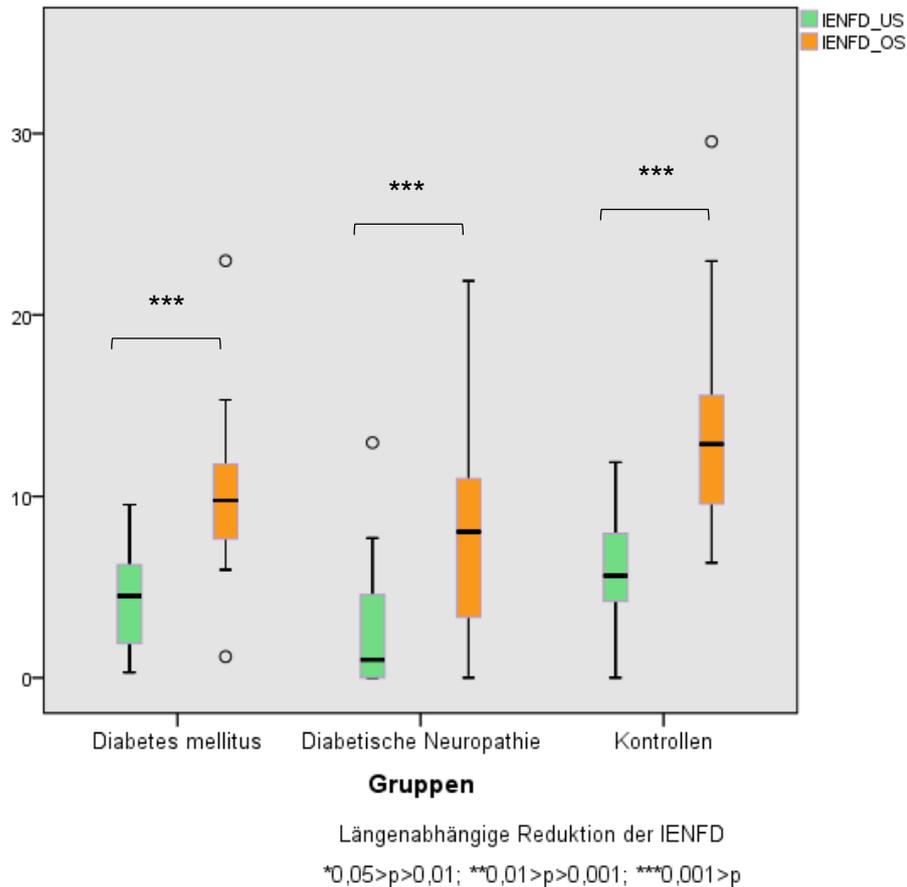


Diagramm 3.14: Längenabhängige Reduktion der IENFD im Unterschenkel im Vergleich zum Oberschenkel in den Gruppen *Diabetes mellitus* ($p < 0,0005$), *Diabetische Neuropathie* ($p < 0,0005$) und *Kontrollen* ($p < 0,0005$).

3.4.5 KORRELATIONEN DER INTRAEPIDERMALEN NERVENFASERDICHTEN

In der statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse der IENFD des Unterschenkels, Oberschenkels und Fingers auf eine mögliche Korrelation zwischen dem HbA1c-Wert, der Krankheitsdauer und der Amplitude des SNAP in den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* untersucht. Eine signifikante Korrelation konnte zwischen der Amplitude des SNAP und der IENFD des Unterschenkels in der Gruppe *Diabetes mellitus* gefunden werden (Korrelationskoeffizient=0,574; $p=0,032$) (siehe Diagramm 3.15). In dieser Gruppe konnte auch eine positive Korrelation des SNAP und der IENFD im Oberschenkel beobachtet werden, welche jedoch nur einen Trend zeigte und nicht statistisch signifikant war (Korrelationskoeffizient=0,507; $p=0,054$) (siehe

Diagramm 3.16). Weitere lineare Korrelationen konnten für die IENFD und die Kategorien HbA1c-Wert, Krankheitsdauer und Amplitude nicht gefunden werden.

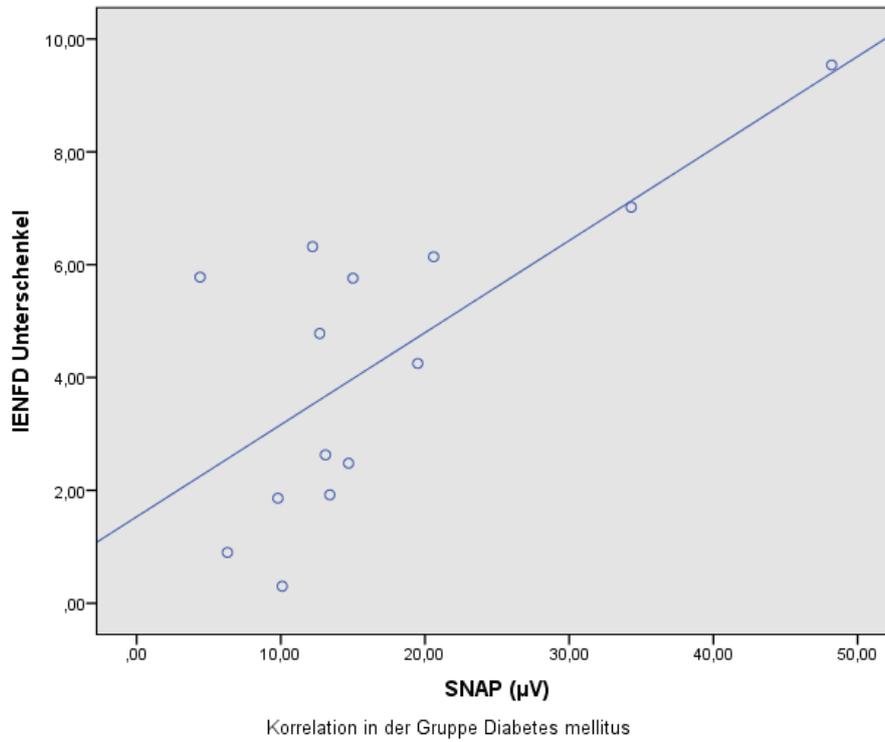


Diagramm 3.15: Signifikante positive Korrelation zwischen der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) des Unterschenkels und der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) in der Gruppe Diabetes mellitus (Korrelationskoeffizient=0,574; p=0,032).

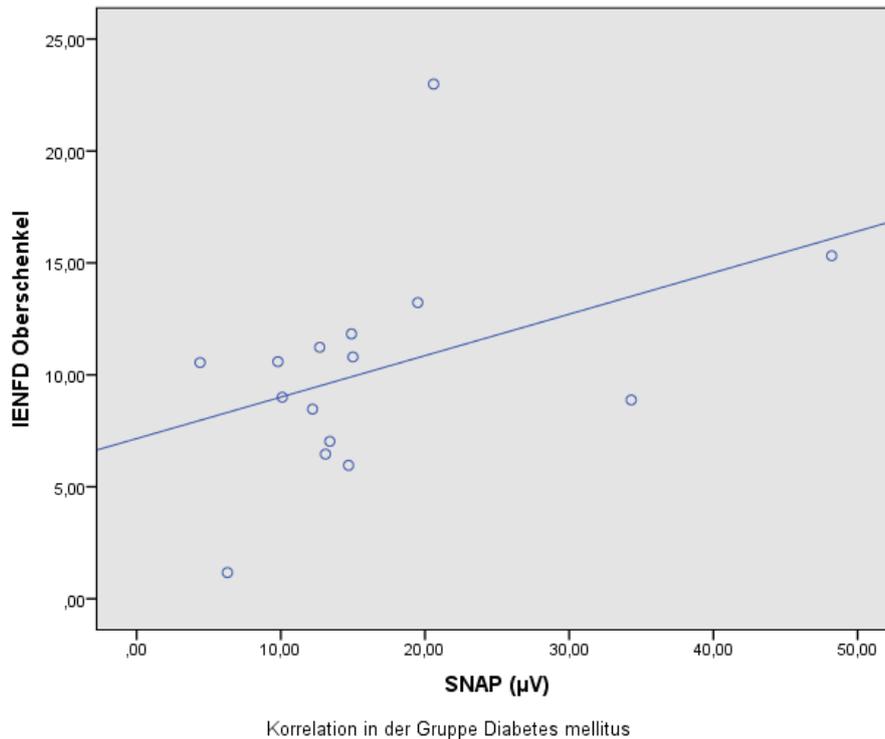


Diagramm 3.16: Positive Korrelation zwischen der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) des Oberschenkels und der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) in der Gruppe Diabetes mellitus (Korrelationskoeffizient=0,507; $p=0,054$).

3.5 Dermale Nervenfaserbündel

Für die Auswertung der *dermalen Nervenfaserbündel* des Unterschenkels konnten alle 17 Hautbiopsien der Gruppe *Diabetes mellitus* und alle 30 Biopsien der Kontrollgruppe mikroskopisch analysiert werden. Von den 30 Gewebeproben der Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnte eine Biopsie aufgrund einer mangelhaften Qualität und eines darauffolgenden Verbrauchs des Gewebes nicht untersucht werden. Für die Auswertung der *Bündel* im Oberschenkel und Finger konnten alle gewonnenen Hautbiopsien der Gruppen analysiert werden.

3.5.1 BÜNDEL OHNE MYELINISIERTE NERVENFASERN

3.5.1.1 Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern im Unterschenkel

Die Anzahl an beobachteten *Bündeln ohne myelinisierte Nervenfasern* war in allen Gruppen gering. Die Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=0,62) und *Diabetische Neuropathie* (Median=0,77) hatten ungefähr eine ähnlich hohe Anzahl an *Bündeln*

ohne myelinisierten Nervenfasern, gefolgt von der Kontrollgruppe (Median=0,65). In jeweils einer Biopsie der drei Gruppen konnten keine *Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern* gefunden werden. Die statistische Auswertung lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

3.5.1.2 Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern im Oberschenkel

Die Anzahl an *Bündeln ohne myelinisierte Nervenfasern* war auch hier in den Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=0,63), *Diabetische Neuropathie* (Median=0,74) und der Kontrollgruppe (Median=0,83) gering. In jeder Gruppe konnte jeweils eine Hautbiopsie ohne Nachweis von *Bündeln ohne myelinisierte Nervenfasern* gefunden werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht gefunden werden.

3.5.1.3 Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern im Finger

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und in der Kontrollgruppe konnten jeweils in einer Hautbiopsie keine *Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern* gefunden werden. Zwischen den Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=1,56), *Diabetische Neuropathie* (Median=1,55) und der Kontrollgruppe (Median=1,37) konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

3.5.1.4 Übersicht der Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern

Im Finger konnte die größte Anzahl an *Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern* gefunden werden, welche in der Gruppe *Diabetes mellitus* am höchsten war. Für die Anzahl der Bündel im Unterschenkel und Oberschenkel konnten innerhalb und zwischen den Gruppen keine großen Unterschiede beobachtet werden (siehe Tabelle 3.5 und Diagramm 3.17).

	Median	Minimum	Maximum
Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern			
Unterschenkel			
Diabetes mellitus	0,62	0	2,84
Diabetische Neuropathie	0,77	0	3,79
Kontrollen	0,65	0	2,58
Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern			
Oberschenkel			
Diabetes mellitus	0,63	0	4,27
Diabetische Neuropathie	0,74	0,07	5,83
Kontrollen	0,83	0	2,69
Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern			
Finger			
Diabetes mellitus	1,56	0,39	7,88
Diabetische Neuropathie	1,55	0	5,11
Kontrollen	1,37	0	8,13

Tabelle 3.5: Übersicht der *Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern* in den Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen. Median, Minimum und Maximum der Bündel im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger.

3.5.2 BÜNDEL MIT MYELINISIERTEN NERVENFASERN

3.5.2.1 Bündel mit myelinisierten Nervenfasern im Unterschenkel

Die Anzahl an Bündeln im Unterschenkel war in allen Gruppen gering, jedoch konnten in allen Hautbiopsien *Bündel mit myelinisierten Nervenfasern* beobachtet werden. Zwischen den Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=0,65), *Diabetische Neuropathie* (Median=0,58) und der Kontrollgruppe (Median=0,87) konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

3.5.2.2 Bündel mit myelinisierten Nervenfasern im Oberschenkel

In allen Hautbiopsien des Oberschenkels konnten *Bündel mit myelinisierten Nervenfasern* beobachtet werden. Die höchste Anzahl an Bündeln konnte in der Kontrollgruppe (Median=1,19) gefunden werden, gefolgt von den Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=0,88) und *Diabetische Neuropathie* (Median=0,79). Ein signifikanter

Unterschied konnte zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe *Diabetes mellitus* ($p=0,024$) und zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* ($p=0,005$) gefunden werden (siehe Diagramm 3.18).

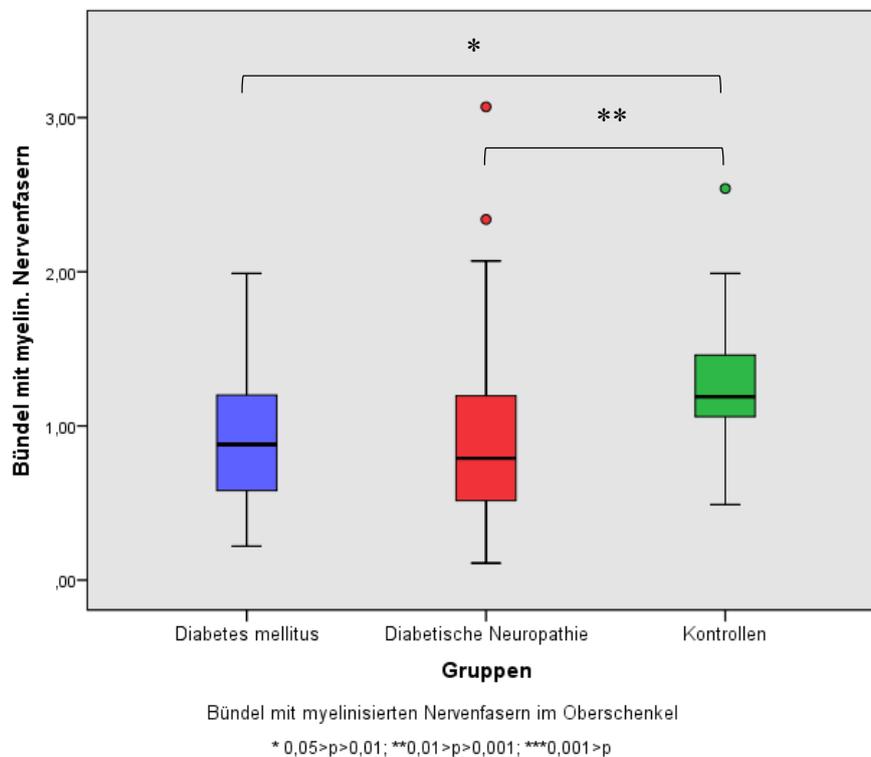


Diagramm 3.18: Bündel mit myelinisierten Nervenfasern im Oberschenkel. Diabetes mellitus Median=0,88; Diabetische Neuropathie Median=0,79; Kontrollen Median=1,19. Signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen ($p=0,024$) und zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen ($p=0,005$).

3.5.2.2.1 Korrelationen der Bündel mit myelinisierten Nervenfasern im Oberschenkel

Die signifikanten Ergebnisse der Auswertung der Bündel mit myelinisierten Nervenfasern im Oberschenkel wurden in den Gruppen *Diabetes mellitus* und *Diabetische Neuropathie* auf mögliche Korrelationen mit dem HbA1c-Wert, der Krankheitsdauer und der Amplitude des SNAP untersucht. Für beide Gruppen konnten keine signifikanten Korrelationen in den Kategorien gefunden werden.

3.5.2.3 Bündel mit myelinisierten Nervenfasern im Finger

In allen Gewebeproben des Fingers konnten Bündel mit myelinisierten Nervenfasern beobachtet werden. Die größte Anzahl an Bündel konnte in der Gruppe Diabetes

mellitus (Median=6,47) nachgewiesen werden, gefolgt von der Gruppe Diabetische Neuropathie (Median=5,71) und der Kontrollgruppe (Median=4,66). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht gefunden werden.

3.5.2.4 Übersicht der Bündel mit myelinisierten Nervenfasern

Die größte Anzahl an *Bündel mit myelinisierten Nervenfasern* konnte im Finger nachgewiesen werden, gefolgt vom Oberschenkel und dem Unterschenkel mit der geringsten Anzahl (siehe Tabelle 3.6 und Diagramm 3.19).

	Median	Minimum	Maximum
Bündel mit myelinisierten Nervenfasern Unterschenkel			
Diabetes mellitus	0,65	0,12	1,94
Diabetische Neuropathie	0,58	0,18	4,43
Kontrollen	0,87	0,13	1,91
Bündel mit myelinisierten Nervenfasern Oberschenkel			
Diabetes mellitus	0,88	0,22	1,99
Diabetische Neuropathie	0,79	0,11	3,07
Kontrollen	1,19	0,49	2,54
Bündel mit myelinisierten Nervenfasern Finger			
Diabetes mellitus	6,47	2,23	13,73
Diabetische Neuropathie	5,71	1,01	18,59
Kontrollen	4,66	1,45	13,55

Tabelle 3.6: Übersicht der *Bündel mit myelinisierten Nervenfasern* in den Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen. Median, Minimum und Maximum der Bündel im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger.

3.5.3 GESAMTANZAHL NERVENFASERBÜNDEL

In der statistischen Auswertung der Gesamtanzahl an Bündeln im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger konnten für die Gruppen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die geringste Anzahl an Bündel konnte im Unterschenkel der

Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=1,33), *Diabetische Neuropathie* (Median=1,61) und der Kontrollgruppe (Median=1,75) gefunden werden. Eine nur geringfügig höhere Anzahl konnte im Oberschenkel in den Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=1,58), *Diabetische Neuropathie* (Median=1,73) und der Kontrollgruppe (Median=2,08) beobachtet werden. Die größte Anzahl an Bündeln zeigten die Auswertungen der Proben des Fingers. Den höchsten Wert der Gesamtanzahl an Bündeln zeigte die Gruppe *Diabetes mellitus* (Median=8,59), gefolgt von der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Median=7,16) und der Kontrollgruppe (Median=6,87) (siehe Tabelle 3.7 und Diagramm 3.20).

	Median	Minimum	Maximum
Gesamtanzahl Bündel			
Unterschenkel			
Diabetes mellitus	1,33	0,36	3,34
Diabetische Neuropathie	1,61	0,59	4,55
Kontrollen	1,75	0,13	4,15
Gesamtanzahl Bündel			
Oberschenkel			
Diabetes mellitus	1,58	0,37	5,34
Diabetische Neuropathie	1,73	0,57	6,29
Kontrollen	2,08	0,72	4,66
Gesamtanzahl Bündel Finger			
Diabetes mellitus	8,59	3,72	17,65
Diabetische Neuropathie	7,16	1,51	20,1
Kontrollen	6,87	1,75	21,68

Tabelle 3.7: Übersicht der Gesamtanzahl an Bündel in den Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen. Median, Minimum und Maximum der Bündel im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger.

3.6 Schnürringarchitektur

3.6.1 IMMUNFLUORESCENZ DOPPELFÄRBUNG MBP UND CASPR

Die Schnürringarchitektur konnte mithilfe der Immunfluoreszenz Doppelfärbung mit Anti-MBP und Anti-Caspr analysiert werden. In allen Gruppen konnten Schnürringe mithilfe der Färbung identifiziert werden. Die Kontrollgruppe und die Gruppe *Diabetes mellitus* zeigten in den Hautbiopsien des Unterschenkels und Oberschenkels die meisten Schnürringe (siehe Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10). In der Analyse der Schnürringe in den Hautbiopsien des Fingers zeigte die Gruppe *Diabetische Neuropathie* die größte Anzahl an Schnürringen (siehe Tabelle 3.11). Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Schnürringen konnte zwischen den Gruppen nicht nachgewiesen werden.

3.6.1.1 Caspr-Färbung im Unterschenkel

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten in 18 von 29 Biopsien Caspr-positive Anfärbungen gefunden werden. In 2 Biopsien wurde eine pathologische Caspr-Anfärbung gefunden, wovon in einer Probe eine verbreiterte Caspr-Anfärbung zu finden war und in einer Probe eine verbreiterte Caspr-Anfärbung in Kombination mit einem verlängerten Schnürring. In der Gruppe *Diabetes mellitus* konnten in 12 von 17 Hautbiopsien Caspr-positive Anfärbungen der Schnürringe gefunden werden, davon 3 Biopsien mit Auffälligkeiten. In zwei der pathologischen Hautbiopsien waren verbreiterte Caspr-Anfärbungen mit verlängerten Schnürringen zu erkennen und in einer Biopsie nur eine Schnürringverlängerung. In der Kontrollgruppe wurden in 25 von 30 Biopsien Caspr-positive Anfärbungen beobachtet. In dieser Gruppe wurden auch 3 Biopsien mit Auffälligkeiten gefunden. In zwei Hautbiopsien wurden verlängerte Caspr-Anfärbungen gefunden und in einer Probe verlängerte Schnürringe aber keine Kombination der beiden Merkmale in einer Probe (siehe Tabelle 3.9).

In der statistischen Auswertung wurden in den einzelnen Gruppen die Verhältnisse der Biopsien mit Auffälligkeiten, verlängerten Caspr-Anfärbungen und verlängerten Schnürringen mit der Gesamtanzahl an beobachteten Caspr-Anfärbungen verglichen. Ein signifikanter Unterschied konnte hierbei nicht gefunden werden.

Caspr Unterschenkel	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	29	30
Anzahl an Biopsien mit Caspr- Anfärbungen	12	18	25
Median	3	2	5,5
Minimum	0	0	0
Maximum	115	53	40
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	3	2	3
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	7	1	2
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	3	1	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	6	1	2
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	2	2	2
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	7	1	2
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	2	1	0
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,27	0,5	1
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,23	0,5	1
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,27	0,5	1

Tabelle 3.9: Übersicht der Caspr-Färbung im Unterschenkel der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.1.2 Caspr-Färbung im Oberschenkel

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* wurden in 31 von 35 Hautbiopsien Caspr-positive Färbungen gefunden, davon 7 Proben mit Auffälligkeiten. In 2 Proben waren sowohl verlängerte Caspr-Anfärbungen und verlängerte Schnürringe, in 3 Biopsien nur verlängerte Caspr-Anfärbungen und in 2 Proben nur verlängerte Schnürringe zu erkennen. In 14 von 17 Proben des Oberschenkels der Gruppe *Diabetes mellitus* konnten Caspr-Färbungen gefunden werden. In 5 Proben wurden Auffälligkeiten gefunden, wobei in allen Proben eine verbreiterte Caspr-Anfärbung zu erkennen war und in 3 Biopsien zusätzlich eine Schnürringverlängerung. In der Kontrollgruppe konnten in 26 von 30 Proben des Oberschenkels Caspr-Färbungen beobachtet werden. Auch in dieser Gruppe wurden in 9 Proben Auffälligkeiten gefunden, wobei in 3 Proben eine Schnürringverlängerung, in einer Probe eine verbreiterte Caspr-Anfärbung und in 5 Biopsien eine Kombination aus beiden Merkmalen zu finden war (siehe Tabelle 3.10). Die statistische Auswertung der Verhältnisse in den einzelnen Gruppen lieferte auch hierbei keine signifikanten Unterschiede.

Caspr Oberschenkel	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	35	30
Anzahl an Biopsien mit Caspr- Anfärbungen	14	31	26
Median	12	12	17,5
Minimum	0	0	0
Maximum	107	77	67
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	5	7	9
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	4	3	4
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	3	5	8
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	2	3	4
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	5	4	6
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	4	1	4
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	3	2	5
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,67	0,33	0,22
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,08	0,33	0,22
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,67	0,33	0,2

Tabelle 3.10: Übersicht der Caspr-Färbung im Oberschenkel der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.1.3 Caspr-Färbung im Finger

In 31 von 35 Proben des Fingers der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten Caspr-positive Schnitte gefunden werden. In insgesamt 10 Proben waren Auffälligkeiten zu erkennen, davon 5 Proben mit verbreiterten Caspr-Anfärbungen, 5 Proben mit verlängerten Schnürringen und 2 Proben mit beiden Merkmalen. In der Gruppe *Diabetes mellitus* konnten in 16 von 17 Proben Caspr-positive Anfärbungen beobachtet werden, davon 2 Proben mit Auffälligkeiten. In beiden Proben wurden verlängerte Caspr-Anfärbungen beobachtet, in einer Probe zusätzlich eine Schnürringverlängerung. In 24 von 25 Proben der Kontrollgruppe wurden Caspr-positive Anfärbungen gefunden. In einer Probe wurden verbreiterte Caspr-Anfärbungen und verlängerte Schnürringe gefunden (siehe Tabelle 3.11).

In der statistischen Auswertung wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Kontrollgruppe im Vergleich der Verhältnisse pathologische Caspr-Färbungen zur Gesamtanzahl an Caspr-Färbungen ($p=0,008$) und Anzahl der verlängerten Schnürringen zu der Gesamtanzahl an Caspr-positiven Schnürringen ($p=0,046$) gefunden. Die Untersuchung auf eine mögliche Korrelation der signifikanten Ergebnisse mit der Amplitude des SNAP, dem HbA1c-Wert und der Krankheitsdauer war unauffällig. Eine signifikante positive Korrelation wurde lediglich für das Verhältnis pathologischer Caspr-Färbungen zur Gesamtanzahl mit der Amplitude des SNAP (Korrelationskoeffizient=0,439; $p=0,013$) gefunden (siehe Diagramm 3.21). Dieses Ergebnis entspricht jedoch nicht den Erwartungen und macht eine Verzerrung durch die geringe Anzahl an Schnürringen bei Patienten mit sehr geringen Amplituden des SNAP wahrscheinlich.

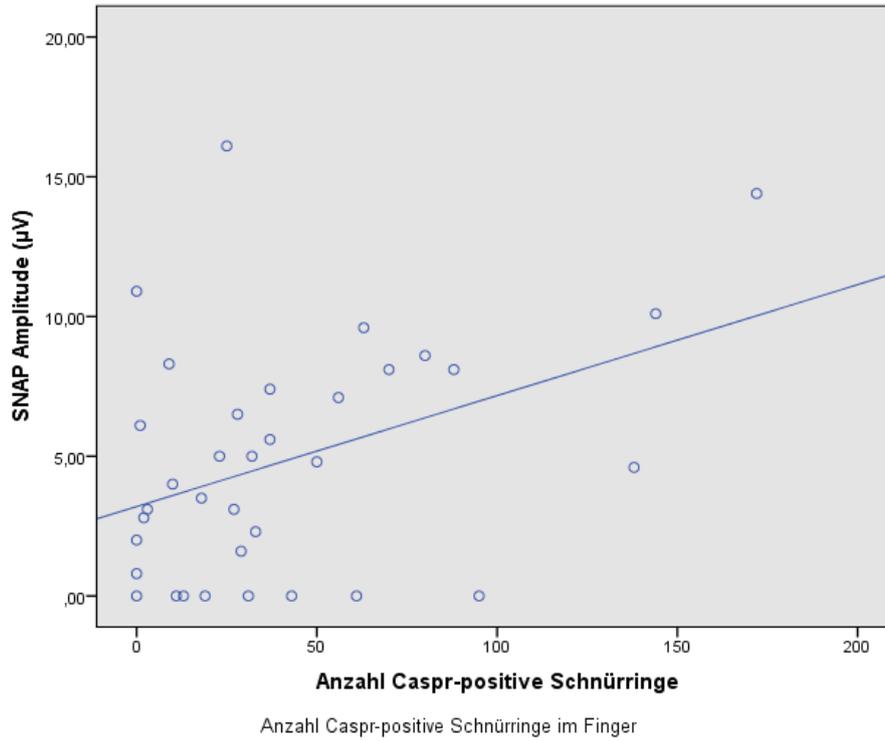


Diagramm 3.22: Positive Korrelation zwischen der Gesamtanzahl an Caspr-positiven Schnürringen und der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Korrelationskoeffizient=0,304; $p=0,076$).

Caspr Finger	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	35	25
Anzahl an Biopsien mit Caspr-Anfärbungen	16	31	24
Median	11	29	20
Minimum	0	0	0
Maximum	111	172	67
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	2	10	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	3	9	1
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	1	7	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	3	7	1
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	2	5	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	3	9	1
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	1	2	1
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,5	0,11	0,02
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,5	0,04	0,02
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,33	0,11	0,02

Tabelle 3.11: Übersicht der Caspr-Färbung im Finger der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.2 IMMUNFLUORESCENZ DOPPELFÄRBUNG MBP UND NEUROFASCIN

In der Analyse der Schnürringarchitektur konnten mithilfe der Immunfluoreszenz Doppelfärbung Anti-MBP und Anti-Neurofascin in allen Gruppen Schnürringe nachgewiesen werden (siehe Tabellen 3.12, 3.13 und 3.14). Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Schnürringe zwischen den Gruppen wurde nicht beobachtet.

3.6.2.1 Neurofascin-Färbung im Unterschenkel

In der Auswertung der Hautbiopsien des Unterschenkels konnten in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* in 16 von 29 Proben Neurofascin-positive Anfärbungen der Schnürringe gefunden werden, davon 5 Proben mit Auffälligkeiten in der Anfärbung. In 2 Proben konnte eine verbreiterte Neurofascin-Färbung in Kombination mit verlängerten Schnürringen, in 2 Proben nur eine veränderte Anfärbung und in einer Probe nur eine Schnürringverlängerung beobachtet werden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* konnten in 10 von 17 Proben Neurofascin-positive Anfärbungen gefunden werden, davon in 3 Proben Auffälligkeiten mit verbreiterten Anfärbungen in Kombination mit verlängerten Schnürringen. In der Kontrollgruppe wurden in 19 von 30 Proben Neurofascin-positive Anfärbungen gefunden. Veränderungen im Sinne von verlängerten Schnürringen und pathologischen Anfärbungen wurden nicht beobachtet (siehe Tabelle 3.12).

In der statistischen Auswertung der einzelnen Verhältnisse konnte ein signifikanter Unterschied des Verhältnisses der pathologischen Neurofascin-Färbungen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Anfärbungen zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen ($p=0,013$) und zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen ($p=0,01$) gefunden werden. Auch das Verhältnis der verlängerten Schnürringe zu der Gesamtanzahl an Neurofascin-positiven Anfärbungen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen *Diabetes mellitus* und *diabetische Neuropathie* ($p=0,013$) und zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen ($p=0,023$). In der Analyse des Verhältnisses der verbreiterten Neurofascin-Färbungen zur Gesamtanzahl an Anfärbungen konnte zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen ein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p=0,013$).

Eine positive Korrelation konnte in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zwischen dem Verhältnis der pathologischen Neurofascin-Färbungen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Färbungen und dem HbA1c-Wert gefunden werden (Korrelationskoeffizient=0,56; p=0,024) (siehe Diagramm 3.23). Weitere lineare Korrelationen der übrigen Ergebnisse konnten nicht nachgewiesen werden.

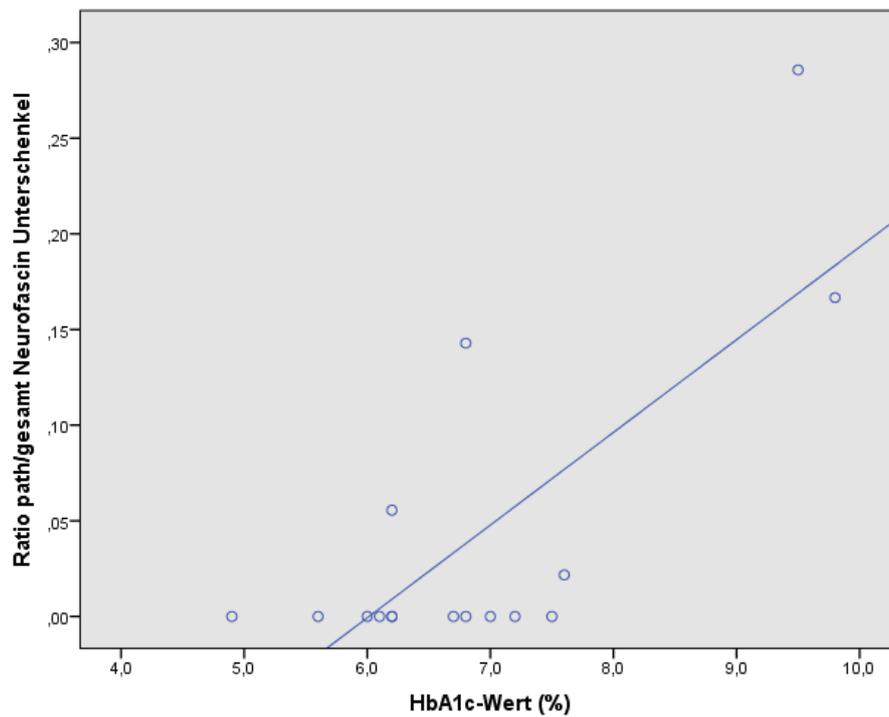


Diagramm 3.23: Signifikante positive Korrelation zwischen dem Verhältnis pathologische Neurofascin-Färbungen/Gesamtanzahl an Neurofascin-Färbungen im Unterschenkel und dem HbA1c-Wert in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Korrelationskoeffizient=0,56; p=0,024).

Neurofascin Unterschenkel	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	29	30
Anzahl an Biopsien mit Neurofascin- Anfärbungen	10	16	19
Median	1	2	6,5
Minimum	0	0	0
Maximum	43	136	116
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	3	5	0
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	3	2	0
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	3	4	0
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	2	2	0
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	3	3	0
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	2	1	0
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	3	2	0
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,23	0,29	0
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,15	0,29	0
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,15	0,17	0

Tabelle 3.12: Übersicht der Neurofascin-Färbung im Unterschenkel der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.2.2 Neurofascin-Färbung im Oberschenkel

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten in 23 von 35 Proben des Oberschenkels Neurofascin-positive Anfärbungen gefunden werden. In 4 Proben konnten Auffälligkeiten mit verbreiterten Färbungen in Kombination mit Schnürringverlängerungen beobachtet werden. In 13 von 17 Proben in der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden Neurofascin-Anfärbungen gefunden, davon eine Probe mit einer Schnürringverlängerung. In der Kontrollgruppe konnten in 23 von 30 Proben Neurofascin-Färbungen nachgewiesen werden. In einer der Proben wurden veränderte Anfärbungen in Kombination mit verlängerten Schnürringen gefunden (siehe Tabelle 3.13). Ein signifikanter Unterschied der Verhältnisse konnte in der Auswertung nicht nachgewiesen werden.

Eine signifikante positive Korrelation konnte zwischen der Amplitude des SNAP und der Anzahl Neurofascin-positiver Schnürringe im Oberschenkel der Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* gefunden werden (Korrelationskoeffizient=0,519; $p=0,001$) (siehe Diagramm 3.24).

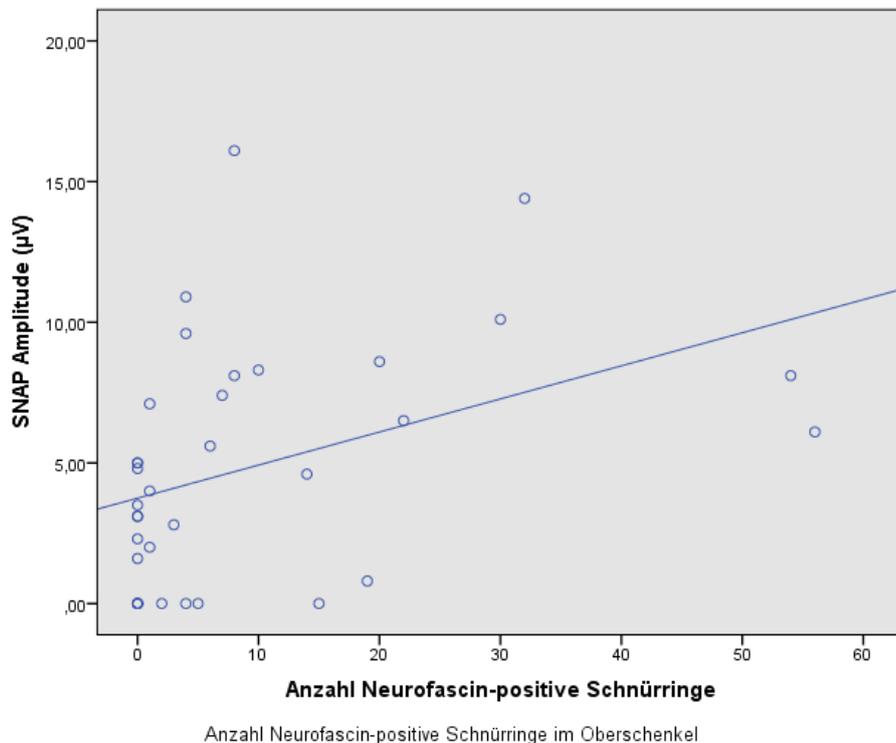


Diagramm 3.24: Signifikante positive Korrelation zwischen der Anzahl an Neurofascin-positiven Schnürringen und der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) im Oberschenkel der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Korrelationskoeffizient=0,519; $p=0,001$).

Neurofascin Oberschenkel	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	35	30
Anzahl an Biopsien mit Neurofascin- Anfärbungen	13	23	23
Median	10	4	9
Minimum	0	0	0
Maximum	111	56	60
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	1	4	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	1	3	3
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	1	4	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	1	3	3
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	0	4	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	3	3
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	0	4	1
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,1	0,5	0,06
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,1	0,5	0,06
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	0,5	0,06

Tabelle 3.13: Übersicht der Neurofascin-Färbung im Oberschenkel der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.2.3 Neurofascin-Färbung im Finger

In 25 von 35 Proben des Fingers wurden in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* Neurofascin-positive Anfärbungen gefunden, davon 5 Proben mit verbreiterten Färbungen in Kombination mit verlängerten Schnürringen, 3 Proben mit verlängerten Schnürringen und 1 Probe mit veränderten Anfärbungen. In 12 von 16 Proben der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden Neurofascin-Färbungen gefunden, davon eine Probe mit einer veränderten Anfärbung. In der Kontrollgruppe wurden in 17 von 25 Proben positive Neurofascin-Anfärbungen gefunden. Auch in dieser Gruppe wurde eine Probe mit einer verbreiterten Färbung in Kombination mit einer Schnürringverlängerung beobachtet (siehe Tabelle 3.14).

In der statistischen Auswertung der Verhältnisse wurde ein signifikanter Unterschied des Verhältnisses von pathologischen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Anfärbungen zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen ($p=0,027$) nachgewiesen. Ein Trend hierfür konnte auch zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* ($p=0,081$) beobachtet werden, jedoch kein signifikanter Unterschied. Für das Verhältnis an verlängerten Schnürringen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-positiven Anfärbungen wurde zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* ($p=0,031$) und zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen ($p=0,044$) ein signifikanter Unterschied beobachtet. Die Analyse der signifikanten Ergebnisse auf mögliche Korrelationen zeigte eine signifikante negative Korrelation in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zwischen der Krankheitsdauer und dem Verhältnis an pathologischen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Anfärbungen (Korrelationskoeffizient= $-0,462$; $p=0,023$) (siehe Diagramm 3.25). Kein signifikantes Ergebnis aber ein Trend hierfür wurde auch im Verhältnis der verlängerten Schnürringe zur Gesamtanzahl an Neurofascin-positiven Anfärbungen und der Krankheitsdauer beobachtet (Korrelationskoeffizient= $-0,364$; $p=0,081$) (siehe Diagramm 3.26). Für die Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der Gesamtanzahl an Neurofascin-positiven Schnürringen konnte eine negative Korrelation beobachtet werden, welche jedoch nicht signifikant war. Allerdings konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP und der

Neurofascin-positiven Schnürringe im Finger der Gruppe Diabetische Neuropathie nachgewiesen werden (Korrelationskoeffizient=0,359; p=0,034) (siehe Diagramm 3.27).

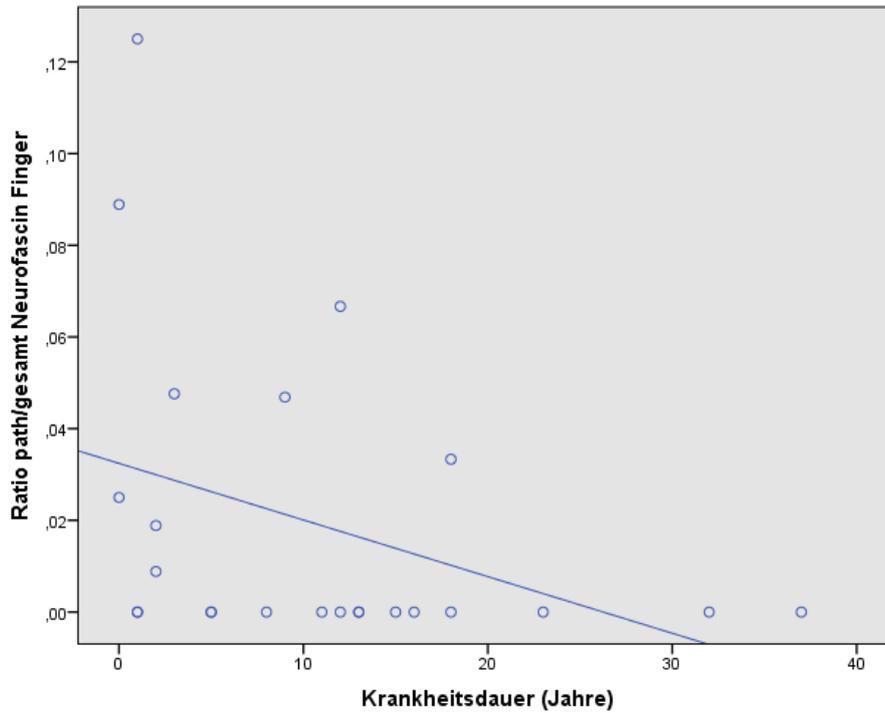


Diagramm 3.25: Statistisch signifikante negative Korrelation zwischen dem Verhältnis pathologischer Neurofascin-Färbungen/Gesamtanzahl an Neurofascin-Färbungen im Finger und der Krankheitsdauer in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Korrelationskoeffizient=-0,462; p=0,023).

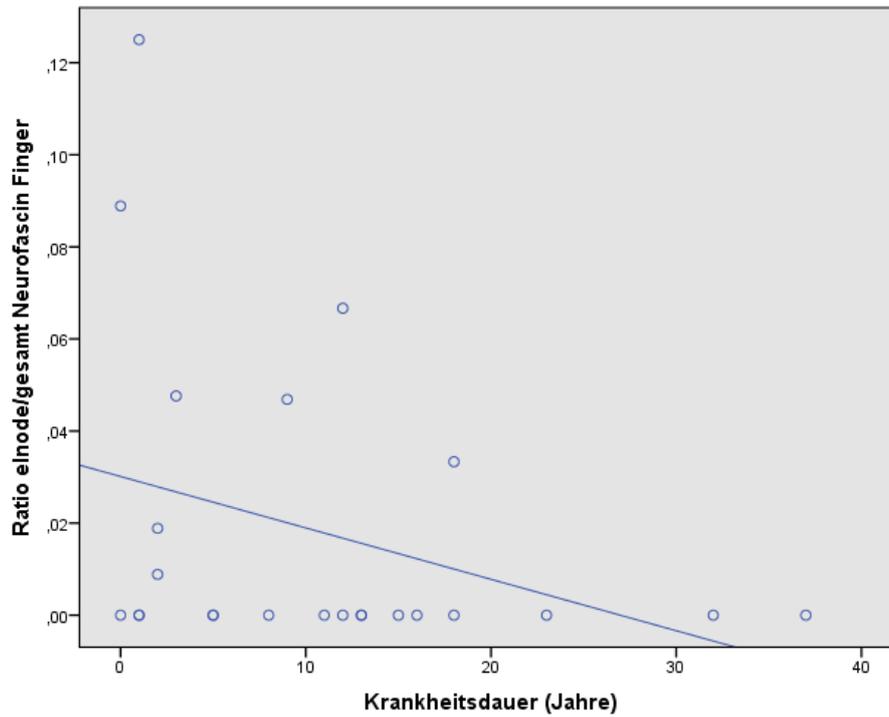


Diagramm 3.26: Negative Korrelation zwischen dem Verhältnis verlängerter Schnürringe/Gesamtanzahl an Neurofascin-Färbungen im Finger und der Krankheitsdauer in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Korrelationskoeffizient=-0,364; p=0,081).

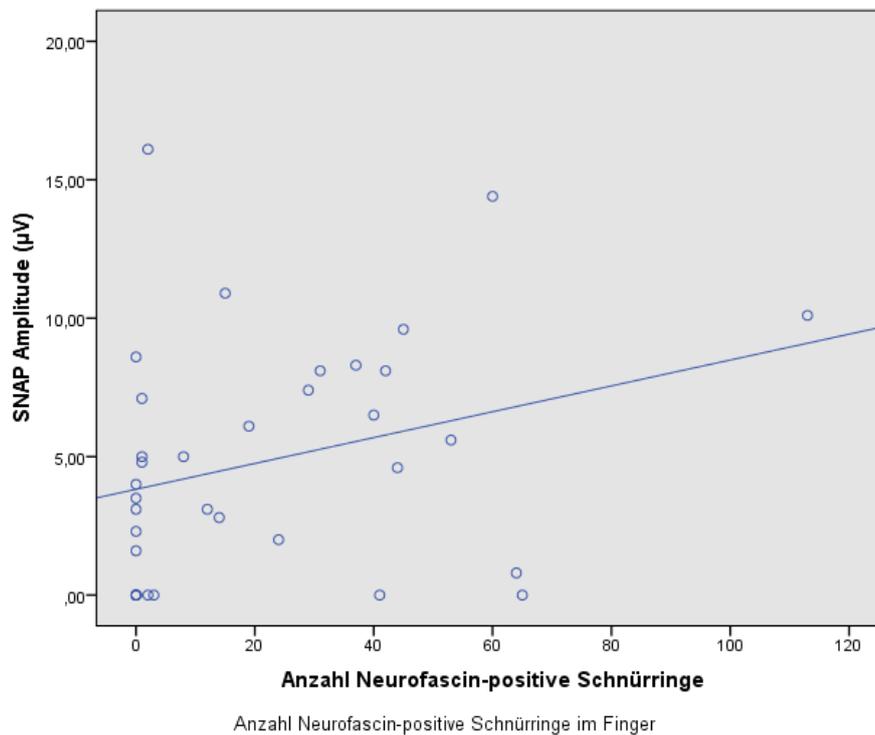


Diagramm 3.27: Signifikant positive Korrelation zwischen Anzahl an Neurofascin-positiven Schnürringen im Finger und der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Korrelationskoeffizient=0,359; p=0,034).

Neurofascin Finger	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	16	35	25
Anzahl an Biopsien mit Neurofascin- Anfärbungen	12	25	17
Median	17	12	16
Minimum	0	0	0
Maximum	49	113	69
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	1	9	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	1	4	1
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	0	8	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	4	1
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	1	6	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	1	3	1
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	0	5	1
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,04	0,13	0,04
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	0,13	0,04
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,04	0,13	0,04

Tabelle 3.14: Übersicht der Neurofascin-Färbung im Finger der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.3 IMMUNFLUORESCENZ DOPPELFÄRBUNG MBP UND NA-KANAL

In der Auswertung der Schnürringarchitektur konnten mithilfe der Immunfluoreszenz Doppelfärbung Anti-MBP und Anti-Na-Kanal in allen Gruppen Schnürringe untersucht werden (siehe Tabelle 3.15, 3.16 und 3.17). In den Hautbiopsien des Unterschenkels konnte zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe *Diabetes mellitus* ($p=0,026$) bzw. zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* ($p=0,012$) ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Schnürringe gefunden werden (siehe Diagramm 3.28). In den Hautbiopsien des Oberschenkels und des Fingers zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

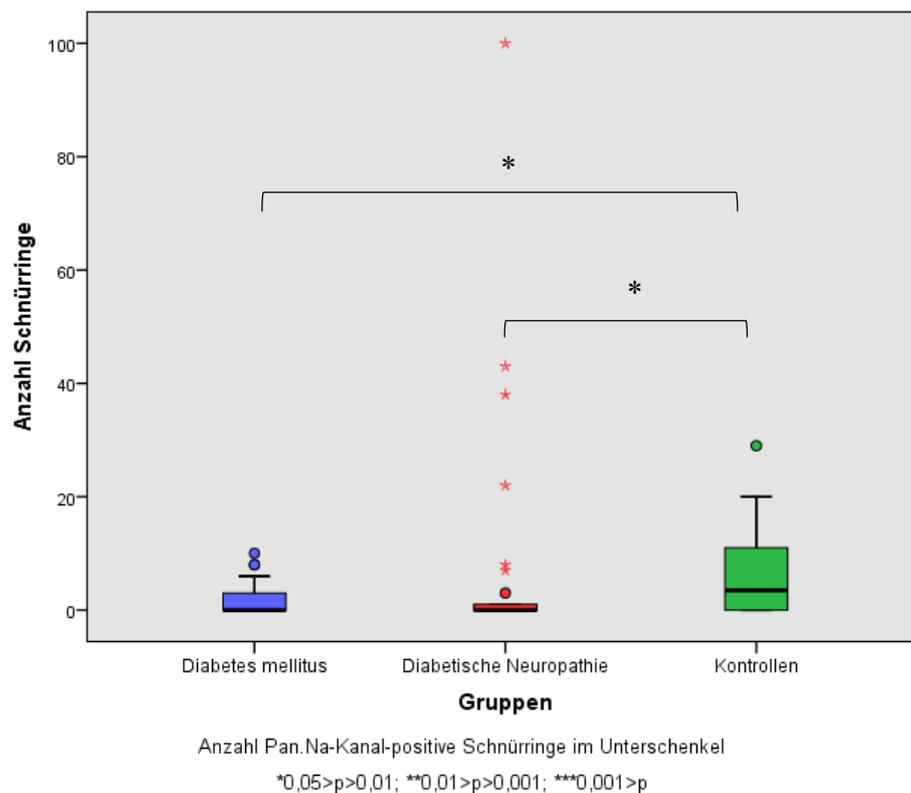


Diagramm 3.28: Anzahl an Na-Kanal-positiven Schnürringen in Hautbiopsien des Unterschenkels in den Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=0,0), *Diabetische Neuropathie* (Median=0,0) und der Kontrollgruppe (Median=3,5). Signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetes mellitus* ($p=0,026$) bzw. den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* ($p=0,012$).

3.6.3.1 Na-Kanal-Färbung im Unterschenkel

In der Na-Kanal Färbung des Unterschenkels wurden in 10 von 30 Proben der Gruppe *Diabetische Neuropathie* Anfärbungen gefunden. In 3 Proben wurden Verdopplungen der Färbung beobachtet und in 2 Proben davon zusätzlich Schnürringverlängerungen. In der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden in 7 von 17 Proben Na-Kanal-positive Anfärbungen gefunden. In keinen Proben wurden Veränderungen nachgewiesen. In der Kontrollgruppe wurden in 21 von 30 Proben Anfärbungen der Natriumkanäle gefunden, davon eine Probe mit einer veränderten Färbung in Kombination mit einer Schnürringverlängerung (siehe Tabelle 3.15). In der Auswertung der Verhältnisse konnten keine signifikanten Ergebnisse gefunden werden. Allerdings konnte zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen im Vergleich der Verhältnisse der Anzahl an pathologischen Färbungen zur Gesamtanzahl an Färbungen ($p > 0,05$) und der Anzahl an veränderten Na-Kanal-Färbungen zur Gesamtanzahl der Färbungen ($p > 0,05$) jeweils ein Trend gefunden werden, welcher knapp die Grenze der Signifikanz verfehlte.

Na-Kanal Unterschenkel	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	30	30
Anzahl an Biopsien mit Na-Kanal- Anfärbungen	7	10	21
Median	0	0	3,5
Minimum	0	0	0
Maximum	10	100	29
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	0	3	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	5	1
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	0	2	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	4	1
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	0	3	1
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	3	1
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	0	2	1
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	1	0,03
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	0,11	0,03
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	1	0,03

Tabelle 3.15: Übersicht der Na-Kanal-Färbung im Unterschenkel der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.3.2 Na-Kanal-Färbung im Oberschenkel

Im Oberschenkel konnten in 14 von 35 Proben der Gruppe *Diabetische Neuropathie* Na-Kanal-positive Färbungen beobachtet werden. In 4 Proben konnten veränderte Anfärbungen in Kombination mit verlängerten Schnürringen gefunden werden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden in 11 von 17 Proben Na-Kanal-Anfärbungen nachgewiesen. In keinen Proben wurden Auffälligkeiten gefunden. In der Kontrollgruppe wurden in 21 von 30 Proben Na-Kanal-positive Färbungen beobachtet, davon 2 Proben mit einer verdoppelten Na-Kanal-Anfärbung (siehe Tabelle 3.16). In der statistischen Auswertung der Verhältnisse wurde ein signifikanter Unterschied des Verhältnisses der verlängerten Schnürringe zur Gesamtanzahl der Na-Kanal-positiven Anfärbungen zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen ($p=0,01$) und ein Trend hierfür zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* ($p=0,059$) gefunden. Ein Trend konnte auch für die Verhältnisse von Pathologien zur Gesamtanzahl an Na-Kanal-Färbungen ($p=0,059$) und verdoppelten Na-Kanal Färbungen zur Gesamtanzahl ($p=0,059$) zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* gefunden werden. Die Analyse auf mögliche Korrelationen zwischen den Ergebnissen und der Amplitude des SNAP, der Krankheitsdauer und dem HbA1c-Wert erbrachte keine signifikanten Ergebnisse.

Na-Kanal Oberschenkel	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	35	30
Anzahl an Biopsien mit Na-Kanal- Anfärbungen	11	14	21
Median	3	0	7
Minimum	0	0	0
Maximum	72	77	65
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	0	4	2
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	3	2
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	0	4	0
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	1	0
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	0	4	2
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	3	2
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	0	4	0
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0,01	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	0,06	0,03
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0,01	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	0,06	0
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0,01	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0	0,06	0,03

Tabelle 3.16: Übersicht der Na-Kanal-Färbung im Oberschenkel der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.3.3 Na-Kanal-Färbung im Finger

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten in 15 von 35 Proben des Fingers Na-Kanal-Anfärbungen beobachtet werden. In 3 Proben wurden veränderte Färbungen gefunden, davon in 2 Proben zusätzlich verlängerte Schnürringe. In 12 von 17 Proben der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden Na-Kanal-positive Färbungen nachgewiesen, davon 2 Proben mit verdoppelten Anfärbungen in Kombination mit verlängerten Schnürringen. In der Kontrollgruppe wurden in 19 von 25 Proben Anfärbungen gefunden. In 5 Proben wurden veränderte Na-Kanal-Färbungen und davon in 4 Proben zusätzlich verlängerte Schnürringen nachgewiesen (siehe Tabelle 3.17). In der statistischen Auswertung der Verhältnisse zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Na-Kanal Finger	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Anzahl an Biopsien	17	35	25
Anzahl an Biopsien mit Na-Kanal-Anfärbungen	12	15	19
Median	5	0	17
Minimum	0	0	0
Maximum	205	187	116
Anzahl an Biopsien mit Auffälligkeiten	2	3	5
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	5	3	2
Anzahl an Biopsien mit verlängerten Schnürringen	2	2	4
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	4	3	2
Anzahl an Biopsien mit veränderten Färbungen	2	3	5
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	5	3	2
Anzahl an Biopsien mit 2 Merkmalen	2	2	4
Ratio Auffälligkeiten/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,06	0,03	0,08
Ratio verlängerte Schnürringe/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,05	0,03	0,08
Ratio veränderte Färbung/Gesamtanzahl			
Median	0	0	0
Minimum	0	0	0
Maximum	0,06	0,03	0,08

Tabelle 3.17: Übersicht der Na-Kanal-Färbung im Finger der Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und Kontrollen.

3.6.4 LÄNGE DER RANVIER-SCHNÜRRINGE

Zur Analyse der Länge der Ranvier'schen Schnürringe wurden zunächst Schnürringe von 100 Kontrollpersonen ausgemessen und der Mittelwert (4,42 μm) mit der Standardabweichung (SD 1,8) bestimmt. Zur Berechnung des Grenzwertes wurde der Mittelwert plus die zweifache Standardabweichung verwendet. Der Normwert für die Länge der Ranvier-Schnürring ergab somit einen Wert von 8,02 μm .

3.6.4.1 Länge der Ranvier-Schnürringe in der Caspr-Färbung

In der Caspr-Färbung konnten in den Hautbiopsien der Gruppe *Diabetische Neuropathie* insgesamt 25 verlängerte Schnürringe gefunden werden. Der Median der verlängerten Schnürringe in dieser Gruppe betrug 13,38 μm . In der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden 15 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 12,55 μm ermittelt. Auch in der Kontrollgruppe wurden 19 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 11,71 μm gefunden (siehe Tabelle 3.18). In der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden.

3.6.4.2 Länge der Ranvier-Schnürringe in der Neurofascin-Färbung

In der Neurofascin-Färbung wurden in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* 29 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 13,81 μm und in der Gruppe *Diabetes mellitus* 6 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 13,57 μm gefunden. In der Kontrollgruppe wurden auch in dieser Färbung verlängerte Schnürringe nachgewiesen. Insgesamt konnten in dieser Gruppe 4 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 14,35 μm gefunden werden (siehe Tabelle 3.18). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht gefunden werden.

3.6.4.3 Länge der Ranvier-Schnürringe in der Na-Kanal-Färbung

Bei der Auswertung der Schnürringe in der Na-Kanal-Färbung konnten in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* 13 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 10,7 μm und in der Gruppe *Diabetes mellitus* 5 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 17,14 μm gefunden werden. Auch in dieser Färbung konnten in der Kontrollgruppe insgesamt 6 verlängerte Schnürringe gefunden werden mit einem Median von 11,62

µm (siehe Tabelle 3.18). Ein signifikanter Unterschied konnte auch hierbei nicht nachgewiesen werden.

3.6.4.4 Übersicht der Gesamtanzahl an verlängerten Ranvier-Schnürringen

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten in allen Färbungen insgesamt 67 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 12,88 µm beobachtet werden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden insgesamt 26 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 13,23 µm gefunden. Auch in der Kontrollgruppe konnten insgesamt 29 verlängerte Schnürringe mit einem Median von 11,71 µm nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.18). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte in der Auswertung nicht beobachtet werden. Auch das Verhältnis der Gesamtanzahl an verlängerten Schnürringen zu der Gesamtanzahl an Schnürringen in den Gruppen *Diabetische Neuropathie* (Ratio=0,01), *Diabetes mellitus* (Ratio=0,01) und der Kontrollgruppe (Ratio=0,01) erbrachte keinen signifikanten Unterschied.

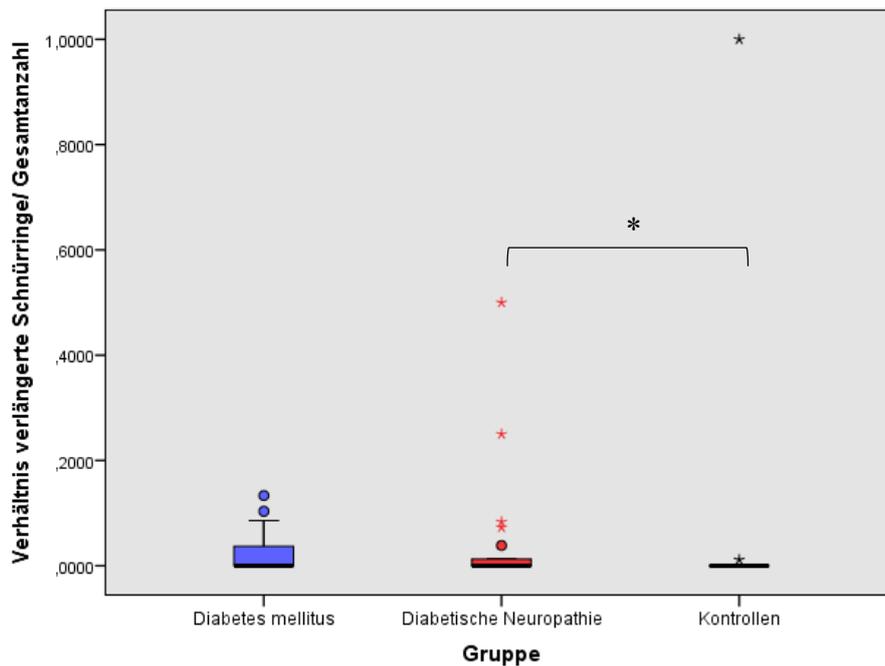
Im Vergleich des Verhältnisses an verlängerten Schnürringen zu der Gesamtanzahl an Schnürringen für die jeweiligen Biopsiestellen Unterschenkel, Oberschenkel und Finger konnte in der Summe der Färbungen ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zur Kontrollgruppe im Unterschenkel gefunden werden ($p=0,023$; siehe Diagramm 3.29). Im Vergleich der Gruppen *Diabetes mellitus* zu den Kontrollen zeigte sich hierbei zudem ein Trend ($p=0,083$). Für den Oberschenkel und den Finger konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (siehe Tabelle 3.19).

Schnürringe:	Gesamt	Anzahl verlängert	Median	Minimum	Maximum
Caspr-Färbung					
Diabetes mellitus	1088	15	12,55	9,22	45,32
Diabetische Neuropathie	2253	25	13,38	8,21	30,93
Kontrollen	1554	19	11,71	8,46	29,56
Neurofascin-Färbung					
Diabetes mellitus	682	6	13,57	8,31	22,87
Diabetische Neuropathie	1418	29	13,81	8,03	64,76
Kontrollen	1309	4	14,35	9,42	22,88
Na-Kanal-Färbung					
Diabetes mellitus	924	5	17,14	10,89	20,97
Diabetische Neuropathie	1524	13	10,7	8,81	32,31
Kontrollen	1165	6	11,62	9,23	14,57
Gesamt					
Diabetes mellitus	2694	26	13,23	8,31	45,32
Diabetische Neuropathie	5195	67	12,88	8,03	64,76
Kontrollen	4028	29	11,71	8,46	29,56

Tabelle 3.18: Übersicht der verlängerten Ranvier-Schnürringe der Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen in der Caspr-, Neurofascin-, Na-Kanal-Färbung und Gesamtfärbungen. Median (μm), Minimum (μm) und Maximum (μm) der verlängerten Schnürringe.

	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Schnürringe Unterschenkel:			
Gesamt:	328	753	797
Verlängert:	13	10	3
Prozentual (%):	3,96	1,33	0,38
Schnürringe Oberschenkel:			
Gesamt:	942	1361	1646
Verlängert:	5	18	19
Prozentual (%):	0,53	1,32	1,15
Schnürringe Finger:			
Gesamt:	1424	3081	1585
Verlängert:	8	38	6
Prozentual (%):	0,56	1,23	0,38

Tabelle 3.19: Übersicht der Gesamtanzahl an Schnürringen, den verlängerten Ranvier-Schnürringe und des prozentualen Anteils in den Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger.



Verhältnis verlängerter Schnürringe zur Gesamtanzahl an Schnürringen im Unterschenkel

*0,05>p>0,01; **0,01>p>0,001; ***0,001>p

Diagramm 3.29: Verhältnis verlängerter Schnürringe zur Gesamtanzahl an Schnürringen in den Gruppen *Diabetes mellitus* (3,96%), *Diabetische Neuropathie* (1,33%) und der Kontrollgruppe (0,38%) im Unterschenkel. Signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* ($p=0,023$).

3.6.5 ÜBERSICHT

3.6.5.1 Übersicht Gesamtanzahl an Schnürringen

In der Analyse der Schnürringarchitektur konnten mithilfe der Immunfluoreszenz Doppelfärbungen MBP und PGP 9.5, MBP und Neurofascin, MBP und Na-Kanal in allen Gruppen in den Hautbiopsien des Unterschenkels, Oberschenkels und des Fingers Schnürringe untersucht werden. Die größte Anzahl an Schnürringen konnte für alle drei Gruppen in den Hautbiopsien des Fingers gefunden werden. Im Vergleich der Gesamtanzahl an Schnürringen im Unterschenkel konnte in der Kontrollgruppe die größte Anzahl an Schnürringen gefunden werden (siehe Tabelle 3.20). Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* ($p=0,038$) nachgewiesen werden (siehe Diagramm 3.3). In den

Hautbiopsien des Oberschenkels und des Fingers konnten in der Gesamtanzahl der Schnürringe keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

	Median	Minimum	Maximum
Gesamtanzahl Schnürringe im Unterschenkel			
Diabetes mellitus	8	0	123
Diabetische Neuropathie	5,5	0	232
Kontrollen	20,5	0	154
Gesamtanzahl Schnürringe im Oberschenkel			
Diabetes mellitus	42	0	290
Diabetische Neuropathie	18	0	170
Kontrollen	39	0	149
Gesamtanzahl Schnürringe im Finger			
Diabetes mellitus	48	9	216
Diabetische Neuropathie	51	0	369
Kontrollen	52	0	180

Tabelle 3.20: Übersicht der Gesamtanzahl an Schnürringen in den Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und Kontrollen. Median, Minimum und Maximum der Schnürringe im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger.

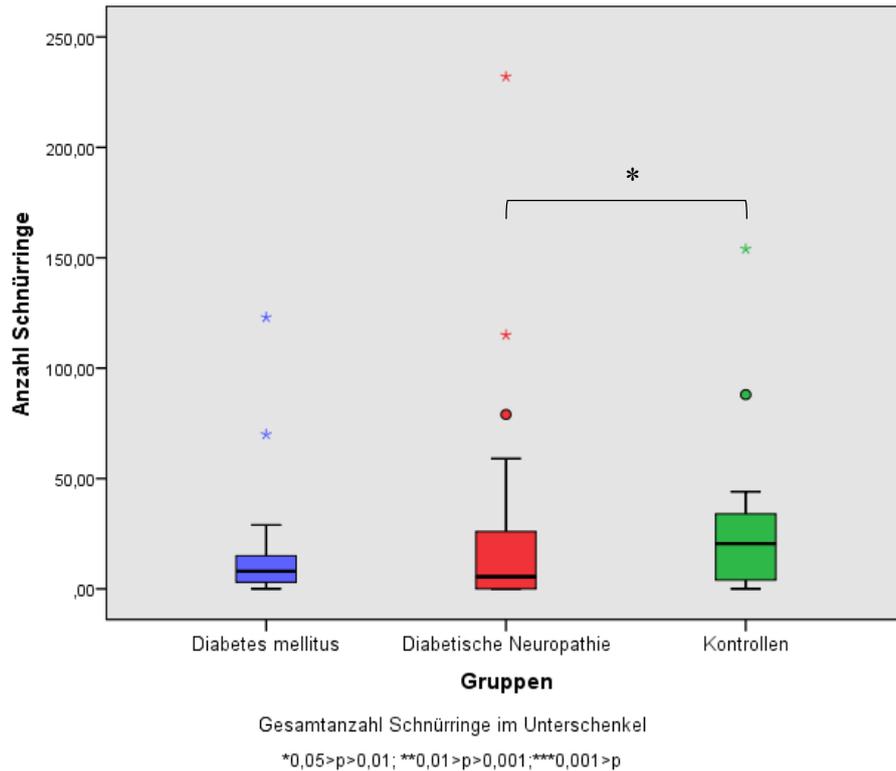
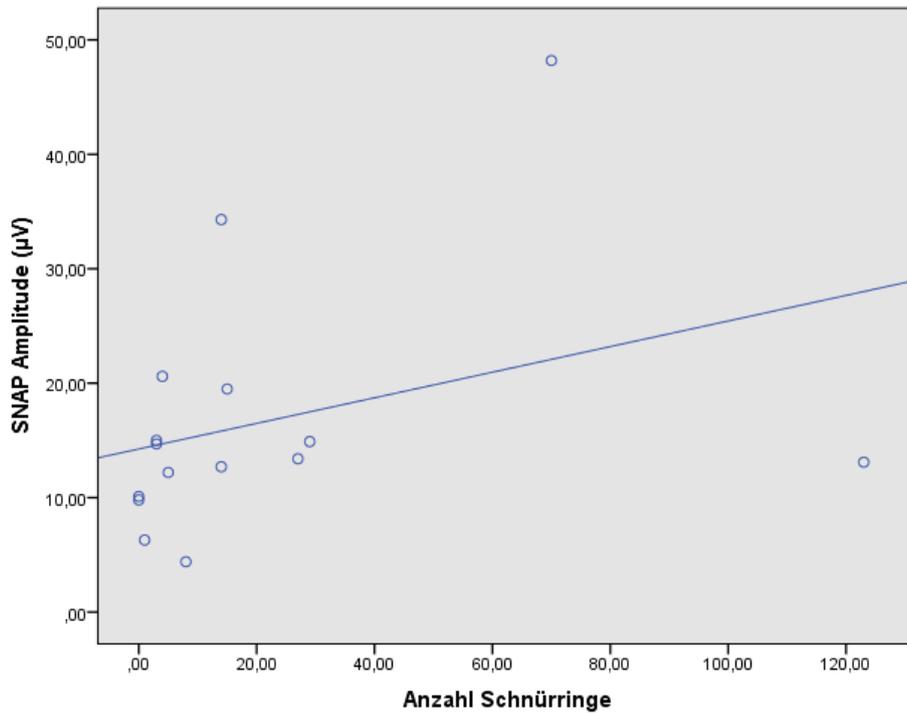


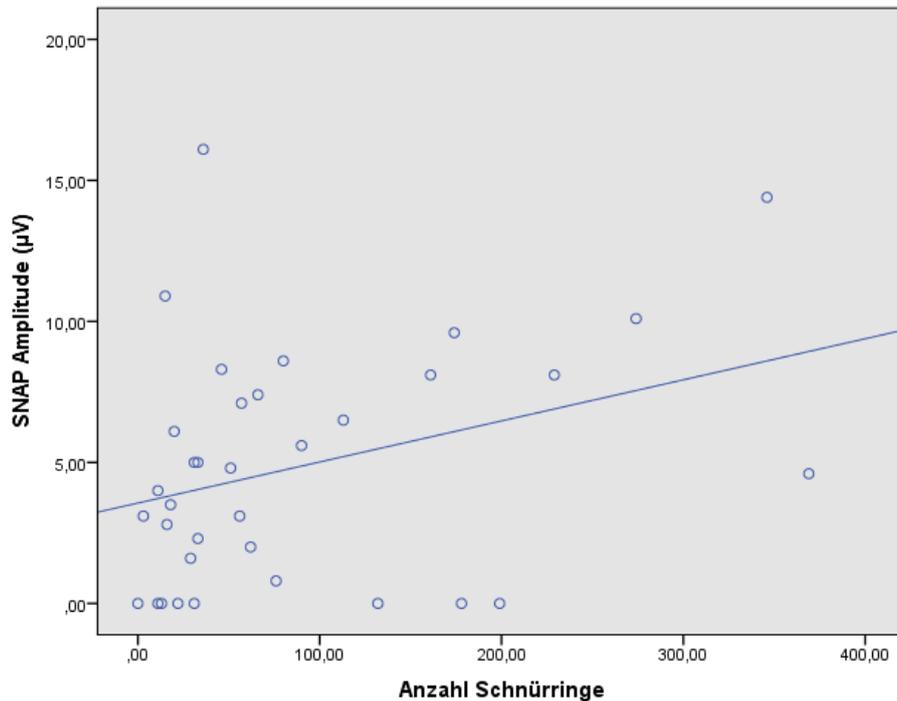
Diagramm 3.3: Gesamtanzahl an Schnürringen in Hautbiopsien des Unterschenkels in den Gruppen *Diabetes mellitus* (Median=8,0), *Diabetische Neuropathie* (Median=5,5) und der Kontrollgruppe (Median=20,5). Signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* ($p=0,038$).

Eine Korrelation zwischen der Gesamtanzahl an Schnürringen im Unterschenkel, Oberschenkel und Finger und dem HbA1c-Wert, der Krankheitsdauer und der Amplitude des SNAP wurde für die Gruppen *Diabetes mellitus* und *Diabetische Neuropathie* überprüft. Eine Korrelation für den HbA1c-Wert und die Krankheitsdauer konnte nicht gefunden werden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* zeigte sich ein Trend für eine positive Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP und der Gesamtanzahl an Schnürringen im Unterschenkel (Korrelationskoeffizient=0,467; $p=0,079$) (siehe Diagramm 3.31). In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnte ein Trend für eine positive Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP und der Gesamtanzahl an Schnürringen im Oberschenkel beobachtet werden (Korrelationskoeffizient=0,314; $p=0,066$) (siehe Diagramm 3.32). Eine signifikante positive Korrelation wurde in dieser Gruppe für die Amplitude des SNAP und für die Gesamtanzahl an Schnürringen im Finger nachgewiesen (Korrelationskoeffizient=0,343; $p=0,044$) (siehe Diagramm 3.33).



Korrelation zwischen Amplitude des SNAP und Gesamtanzahl Schnürriinge im Unterschenkel

Diagramm 3.31: Positive Korrelation zwischen der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) und der Gesamtanzahl an Schnürriingen im Unterschenkel in der Gruppe *Diabetes mellitus* (Korrelationskoeffizient=0,467; $p=0,079$).



Korrelation zwischen Amplitude des SNAP und Gesamtanzahl Schnürringe im Finger

Diagramm 3.33: Signifikant positive Korrelation zwischen der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) und der Gesamtanzahl an Schnürringen im Finger in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* (Korrelationskoeffizient=0,343; $p=0,044$).

3.6.5.2 Übersicht Auffälligkeiten

In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnten von insgesamt 298 Proben 37 Proben mit verlängerten Schnürringen, elf Proben mit einer veränderten Caspr-Anfärbung, 13 Proben mit einer veränderten Neurofascin-Färbung und zehn Proben mit einer veränderten Na-Kanal-Färbung gefunden werden. Davon wurden in 20 Proben zwei dieser Merkmale und in vier Proben drei Merkmale beobachtet. In den übrigen Proben konnte jeweils nur ein Merkmal nachgewiesen werden. Proben mit vier Auffälligkeiten wurden nicht beobachtet. Diese Gesamtanzahl an pathologischen Proben wurde in 19 von den insgesamt 35 Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* gefunden. In drei Patienten konnte hierbei nur ein Merkmal nachgewiesen werden, in zehn Patienten zwei Merkmale und in sechs Patienten drei Merkmale. In sechs Fällen war nur die Hautbiopsie eines Körperareals betroffen, in fünf Fällen waren zwei Körperareale auffällig und in acht Fällen alle drei Körperareale (siehe Tabelle 3.21).

In der Gruppe *Diabetes mellitus* wurden von insgesamt 152 Proben in 13 Proben verlängerte Schnürringe, in neun Proben eine veränderte Caspr-Färbung, in vier Proben eine veränderte Neurofascin-Anfärbung und in 2 Proben eine veränderte Na-Kanal-Anfärbung beobachtet. Davon wurden in 8 Proben zwei Merkmale und in zwei Proben drei Merkmale in einer Biopsie gefunden. In den übrigen 3 Proben wurde jeweils nur ein Merkmal nachgewiesen und in keiner Probe waren alle 4 Merkmale zu finden. Insgesamt waren in der Gruppe *Diabetes mellitus* 11 von 17 Patienten hiervon betroffen. Ein Patient zeigte hierbei nur ein auffälliges Merkmal, 6 Patienten 2 Merkmale und vier Patienten drei Merkmale. In acht Patienten wurden die veränderten Proben nur in einem Körperareal beobachtet und bei drei Patienten in zwei Körperarealen. In keinem Patienten dieser Gruppe wurden Auffälligkeiten in allen drei Biopsiearealen gefunden (siehe Tabelle 3.21).

Auch in den Proben der Kontrollgruppe konnten Auffälligkeiten gefunden werden. Insgesamt wurden 255 Proben analysiert, davon wurden 17 Biopsien mit verlängerten Schnürringen, neun mit einer veränderten Caspr-Anfärbung, zwei mit einer veränderten Neurofascin-Färbung und acht Proben mit einer veränderten Na-Kanal-Anfärbung gefunden. In 14 Proben wurde die Kombination von zwei Merkmalen gefunden, in den übrigen Proben jeweils nur ein Merkmal. Die Kombination von drei oder vier Merkmalen war in keinen Proben zu finden. Die auffälligen Proben wurden in 16 von 30 Kontrollen, bei welchen eine Hautbiopsie entnommen wurde, beobachtet. Sechs Kontrollen zeigten hierbei nur ein auffälliges Merkmal, sieben Kontrollen zwei Merkmale und drei Probanden drei Merkmale. In elf Kontrollen wurden Auffälligkeiten nur in der Hautbiopsie eines Körperareals gefunden, in vier Probanden in zwei Biopsiearealen und einem Fall in allen drei Hautbiopsien (siehe Tabelle 3.21).

	Diabetes mellitus	Diabetische Neuropathie	Kontrollen
Gesamtanzahl Proben	152	298	255
verlängerte Schnürringe	13	37	17
veränderte Caspr-Färbung	9	11	9
veränderte NF-Färbung	4	13	2
veränderte Na-Färbung	2	10	8
Kombination von 2 Merkmalen	8	20	14
Kombination von 3 Merkmalen	2	4	0
Kombination von 4 Merkmalen	0	0	0
Gesamtanzahl Patienten mit Auffälligkeiten	11	19	16
1 Merkmal	1	3	6
2 Merkmale	6	10	7
3 Merkmale	4	6	3
4 Merkmale	0	0	0
in 1 Hautbiopsie	8	6	11
in 2 Hautbiopsien	3	5	4
in 3 Hautbiopsien	0	8	1

Tabelle 3.21: Übersicht der Auffälligkeiten in der Caspr-, Neurofascin-, Na-Kanal-Färbung und der verlängerten Schnürringe in den Proben und Patienten der Gruppen *Diabetes mellitus*, *Diabetische Neuropathie* und der Kontrollgruppe.

Im Vergleich des Zusammenhangs der Anzahl bzw. des Prozentwertes der Patienten mit auffälligen Proben in den Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und den Kontrollen konnte ein signifikantes Ergebnis in der Kategorie der pathologischen Neurofascin-Färbung ($p=0,025$) gefunden werden. In den Kategorien pathologische Caspr- und pathologische Na-Kanal-Färbung konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden (siehe Tabelle 3.22).

	path. Caspr: nein	path. Caspr: ja	path. NF: nein	path. NF: ja	path. Na: nein	path. Na: ja
D. mellitus	9	8	12	5	15	2
in %	52,9	47,1	70,6	29,4	88,2	11,8
D. NP	20	15	23	12	27	8
in %	57,1	42,9	65,7	34,3	77,1	22,9
Kontrollen	19	11	28	2	23	7
in %	63,3	36,7	93,3	6,7	76,7	23,3

Tabelle 3.22: Übersicht der Anzahl und Prozentwerte der auffälligen Hautbiopsien der Patienten der Gruppen *Diabetische Neuropathie, Diabetes mellitus* und der Kontrollen in den Kategorien pathologische Caspr-, Neurofascin (NF)- und Na-Kanal (Na-)-Färbung.

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion „small-fiber“ Beteiligung

Mithilfe der quantitativen sensorischen Testung (QST) und der Ermittlung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) wurde in den drei Gruppen eine mögliche Beteiligung der kleinkalibrigen dünn-myelinisierten A δ -Fasern und unmyelinisierten C-Fasern überprüft.

4.1.1 QUANTITATIVE SENSORISCHE TESTUNG

In der Auswertung der QST konnten in den Gruppen *Diabetische Neuropathie*, *Diabetes mellitus* und in den Kontrollen anhand der standardisierten alters- und geschlechtsspezifischen Normwerte für das jeweils untersuchte Körperareal auffällige Kategorien gefunden werden (Magerl et al., 2010). In der statistischen Auswertung konnten signifikante Unterschiede im Vergleich zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Gruppe *Diabetes mellitus* bzw. zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen des Testareals gefunden werden. Die signifikanten Unterschiede waren in den Kategorien taktile Detektionsschwelle (MDT), mechanische Schmerzschwelle (MPT), mechanische Schmerzsensitivität (MPS) und Vibrationsschwelle (VDT) vertreten. Der Vergleich der Ergebnisse der QST zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen lieferte lediglich einen signifikanten Unterschied für die Kategorie mechanische Schmerzschwelle (MPT) des Kontrollareals und für die Kategorie Druckschmerzschwelle (PPT) des Testareals.

Die Ergebnisse dieser Messung zeigen eine Beeinträchtigung der kleinen Nervenfasern anhand der erhöhten Schwellenwerte in den Kategorien MPT und MPS in der Gruppe *Diabetische Neuropathie*, sowie eine Beteiligung der „large-fibers“ anhand der Kategorien MDT und VDT. Die Ergebnisse der Gruppe *Diabetes mellitus* weisen ebenfalls auf eine Beteiligung der kleinen Nervenfasern anhand der Kategorien MPT und PPT hin. Die Kategorien für eine Beteiligung der großen Nervenfasern sind hierbei unauffällig, was anhand der normwertigen elektrophysiologischen Messwerte in dieser Gruppe zu erwarten ist. In einigen Studien wurden ebenfalls auffällige Ergebnisse in der QST von Patienten mit Diabetes mellitus gefunden: Chao et al. haben eine

signifikant höhere thermische Schwelle bei Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu einer Kontrollkohorte gefunden. Die erhöhte Warmschwelle zeigte sich hierbei im Vergleich zu auffälligen Ergebnissen der Elektroneurographie des N. suralis als häufigstes Merkmal in dieser Gruppe und deutete auf eine stärkere Beteiligung der „small-fibers“ im Vergleich zu einer vermehrten Beteiligung der „large-fibers“ hin. Außerdem wurde eine Korrelation zwischen der thermischen Schwelle und dem HbA1c-Wert bzw. dem Alter gefunden und somit eine Zunahme der „small-fiber“-Beteiligung bei Patienten mit einer schlechteren Stoffwechseleinstellung bzw. bei älteren Patienten (Chao et al., 2007). In einer Studie von Jia et al. wurden Veränderungen der thermischen Schwellen in Patienten mit einer diabetischen Neuropathie, sowohl in einem längeren (>5 Jahre Krankheitsdauer), als auch einem kürzeren Krankheitsverlauf (<5 Jahre Krankheitsdauer) untersucht. In beiden Gruppen wurden Veränderungen der Kalt- und Warmschwellen beobachtet, wobei die Patienten mit längerer Krankheitsdauer hiervon stärker betroffen waren. In den Patienten mit längerer Krankheitsdauer zeigte sich eine signifikant erhöhte Warmschwelle und eine signifikant erniedrigte Kaltschwelle im Vergleich zu Patienten mit kürzerer Krankheitsdauer. Aber auch bei den Patienten mit kürzerer Krankheitsdauer konnte eine signifikant niedrigere Kaltschwelle, als in den Kontrollen beobachtet werden. Die Auffälligkeiten in den Ergebnissen der QST waren insgesamt signifikant häufiger in allen Patienten im Vergleich zu den pathologischen elektrophysiologischen Messungen. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Auffälligkeiten der QST zwischen Patienten mit einer normalen und einer pathologischen elektrophysiologischen Messung konnte nicht gefunden werden. In beiden Patientengruppen wurden auffällige Ergebnisse in der thermischen Testung und somit der „small-fibers“ gefunden. Die QST zeigte hierbei auch Veränderungen in einem frühen Krankheitsverlauf auf (Jia et al., 2014). In der Studie von Loseth et al. zeigte die Gruppe der Patienten mit sensiblen Symptomen, als Hinweis auf eine diabetische Neuropathie, eine signifikante Erhöhung der thermischen Kälteschmerz- und Hitzeschmerzschwellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Gruppe der Patienten ohne sensible Symptome zeigte sich eine signifikant erhöhte

Kälteschmerzschwelle im Vergleich zu den Kontrollen. Zwischen den beiden Patientengruppen wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. In der Studie wurden somit Veränderungen in den thermischen Kategorien, als Hinweise auf eine Schädigung der kleinen Nervenfasern in Patienten mit und ohne Symptome für eine diabetische Neuropathie beobachtet, wobei die Patienten mit Symptomen stärker betroffen waren (Loseth et al., 2008). In dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede in den thermischen Schwellen entdeckt werden, allerdings zeigte sich in beiden Patientengruppen eine Beteiligung der „small-fibers“ anhand der oben beschriebenen Ergebnisse. Die Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* waren hierbei ebenfalls stärker betroffen. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Loseth et al. wurde in den Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zusätzlich eine Beteiligung der „large-fibers“ beobachtet, was sich in den Ergebnissen der elektrophysiologischen Untersuchungen widerspiegelt. In der Studie von Loseth et al. wurden im Gegensatz dazu nur Patienten mit einer unauffälligen elektrophysiologischen Messung eingeschlossen (Loseth et al., 2008). In einer Studie von Shun et al. wurde jedoch ebenfalls eine höhere Vibrationsschwelle in Patienten mit diabetischer Neuropathie, als in der Kontrollgruppe gefunden (Shun et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen somit, dass in beiden Patientengruppen anhand der Auswertung der QST eine Beteiligung der „small-fibers“ zu beobachten ist, wobei die Gruppe *Diabetische Neuropathie* hierbei stärker betroffen ist. Aber auch die Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus*, als Kohorte für ein frühes Krankheitsstadium, zeigen hierbei Veränderungen. Bei den schwerer betroffenen Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* kommt es im Krankheitsverlauf zudem zu einer zusätzlichen Beteiligung der „large-fibers“.

4.1.2 INTRAEPIDERMAL NERVENFASERDICHTEN

In der Auswertung der intraepidermalen Nervenfasern konnte in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* in den Hautbiopsien des Unterschenkels, Oberschenkels und Fingers die geringste Dichte an Nervenfasern gefunden werden. Die Kontrollgruppe zeigte die größte Dichte an Nervenfasern in allen drei Biopsiearealen. Die statistische Auswertung zeigte einen signifikanten Unterschied der IENFD im Unterschenkel und

Finger zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen bzw. zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus*. In den Hautbiopsien des Oberschenkels konnte für die IENFD ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen bzw. zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen gefunden werden. Die Gruppe *Diabetische Neuropathie* zeigte somit im Vergleich zu der Kontrollgruppe in allen drei Körperarealen eine signifikante Reduktion der kleinen Nervenfasern. Der Verlust der IENFD war hierbei am Unterschenkel und somit an der am weitesten distal gelegenen Körperregion am größten. Auch in den Proben des Fingers, als distale Körperregion zeigte sich ein deutlicher Verlust an Nervenfasern. Der Oberschenkel als weiter proximal gelegene Körperregion präsentierte hierbei die größte Anzahl an IENF. Die Gruppe *Diabetische Neuropathie* zeigte außerdem im Vergleich zur Gruppe *Diabetes mellitus* eine signifikante Reduktion der IENFD im Unterschenkel und im Finger. Es scheint hierbei im fortgeschrittenen Krankheitsstadium zu einem stärkeren Verlust der „small-fibers“ in den distalen Abschnitten zu kommen, was den Ergebnissen bisheriger Studien entspricht (Kennedy et al, 1996; Polydefkis et al, 2001; Loseth et al, 2008; Timar et al, 2016).

Eine signifikante Korrelation zwischen der IENFD und der Krankheitsdauer, dem HbA1c bzw. der Amplitude des SNAP wurde in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* nicht gefunden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* konnte allerdings eine signifikante Korrelation zwischen der IENFD des Unterschenkels und der Amplitude des SNAP beobachtet werden. Ein Trend hierfür wurde in dieser Gruppe auch zwischen der IENFD und dem SNAP im Oberschenkel gefunden. Diese Beobachtungen ähneln den Ergebnissen von Umapathi et al. und Loseth et al. In diesen Untersuchungen wurden ebenfalls keine Korrelationen zwischen der IENFD und der Krankheitsdauer bzw. dem HbA1c-Wert gefunden. Allerdings handelte es sich hierbei um Patienten mit Diabetes mellitus und einer milden Neuropathie bzw. elektrophysiologisch unauffälligen Patienten (Loseth et al., 2008; Umapathi et al., 2007). Im Gegensatz dazu waren in der aktuellen Studie anhand der elektrophysiologischen Messungen auch schwerer betroffene Patienten eingeschlossen. Dennoch wurden keine signifikanten

Korrelationen in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* gefunden. Auch in einer Studie von Shun et al. wurde keine Korrelation zwischen der IENFD und dem HbA1c-Wert gefunden, jedoch zwischen der IENFD und der Krankheitsdauer (Shun et al., 2004). In der aktuellen Studie ergaben sich jedoch auch keine signifikanten Unterschiede in der Krankheitsdauer und dem HbA1c-Wert zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und der Gruppe *Diabetes mellitus*, was möglicherweise eine fehlende Korrelation zwischen der IENFD und der Krankheitsdauer bzw. dem HbA1c-Wert erklären könnte. Ein Patientenkollektiv mit einer längeren Krankheitsdauer, insbesondere der Patienten mit einer diabetischen Neuropathie, und mit einem weniger gut eingestellten Blutzuckerhaushalt wäre für weitere Auswertungen sicherlich hilfreich. Vorteilhaft wäre es sicherlich zudem insgesamt größere Patientengruppen für eine bessere Vergleichbarkeit und statistische Auswertung zu untersuchen.

In einer Studie von Loseth et al. wurde eine signifikant reduzierte IENFD in Proben des Unterschenkels in Patienten mit Diabetes mellitus mit sensiblen Symptome und in Patienten mit Diabetes mellitus ohne sensible Symptome im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gefunden. Ein signifikanter Unterschied wurde ebenfalls zwischen beiden Patientengruppen beobachtet, wobei die Gruppe der Patienten mit sensiblen Symptomen stärker von einem Verlust der Nervenfasern betroffen war (Loseth et al., 2008). In beiden Patientengruppen konnte somit ein Verlust an kleinen Nervenfasern beobachtet werden. Das Alter der Patienten mit sensiblen Symptomen war hierbei signifikant höher. Unterschiede in der Krankheitsdauer konnten nicht beobachtet werden. Allerdings wurden in die Patientengruppen nur Patienten mit einer unauffälligen elektrophysiologischen Messung eingeschlossen und somit lediglich Patienten mit keiner oder einer leichten Neuropathie. In einer Studie von Umapathi et al. wurden Hautbiopsien von Patienten mit Diabetes mellitus im Unterschenkel und Oberschenkel untersucht und mit Kontrollen verglichen. Ziel der Studie war es, eine Reduktion der IENFD, als Zeichen für ein frühes Krankheitsstadium der diabetischen Neuropathie, zu analysieren. Eine signifikante Reduktion der IENFD in den Hautbiopsien des Unterschenkels konnte in den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden. In den Proben des Oberschenkels zeigte sich auch

eine reduzierte Dichte an Nervenfasern, welche allerdings nicht signifikant war (Umapathi et al., 2007). Die Untersuchungen von Loseth et al. und Umapathi et al. zeigten somit eine signifikante Reduktion der kleinen Nervenfasern in den distalen Körperabschnitten der Diabetiker im Vergleich zu den Kontrollen. In der aktuellen Studie konnte, wie in der Studie von Loseth et al., ein signifikanter Unterschied in der Reduktion der IENFD in den Proben des Unterschenkels in der Gruppe der Patienten mit diabetischer Neuropathie gefunden werden. Die Beobachtungen der beiden Studien bezüglich der signifikanten Reduktion der IENFD im Unterschenkel in den Patienten mit Diabetes mellitus konnten in der aktuellen Studie nicht bestätigt werden. In der aktuellen Studie wurde zwar eine Reduktion der IENFD in den Proben des Unterschenkels für die Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* gefunden, ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe jedoch nicht. Allerdings wurde für die Gruppe *Diabetes mellitus* ein signifikanter Unterschied der IENFD des Oberschenkels zur Kontrollgruppe gefunden. In der Studie von Umapathi et al. lag das Durchschnittsalter der Patienten bei 48,4 Jahren und das der Kontrollen bei 39,4 Jahren. In der aktuellen Studie hatten die Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* ein Durchschnittsalter von 55 Jahren und die Kontrollen von 54,23 Jahren. Allerdings zeigt sich eine große Varianz der IENFD und deutliche Überschneidungen mit den Werten der Kontrollgruppe, so dass der Unterschied der IENFD zwischen Diabetikern und Kontrollen nicht signifikant war. Außerdem führt ein höheres Lebensalter im Verlauf zu einem stärkeren Verlust der IENFD (Goransson et al., 2004; McArthur et al., 1998). Dies könnte den stärkeren Verlust der IENFD im Unterschenkel der Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* in der Studie von Umapathi et al. erklären. In der aktuellen Untersuchung unserer Studie hatten beide Kohorten einen beinahe identischen Altersdurchschnitt und zeigten keinen signifikanten Unterschied der IENFD im Unterschenkel. Jedoch wurde in den Proben des Oberschenkels ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen gefunden. Somit scheint in der aktuellen Studie der Vergleich der IENFD in den Proben des Unterschenkels der Gruppe *Diabetes mellitus* weniger sensitiv in der Beurteilung aufgrund des Verlustes an IENFD in Abhängigkeit des Alters, als in der weiter proximal

gelegenen Hautregion, welche insgesamt eine höhere IENFD aufweist und somit eventuell für einen Vergleich der Gruppen verlässlicher ist.

In einer Studie von Timar et al. wurden signifikante Unterschiede der IENFD in Hautbiopsien des Unterschenkels und Oberschenkels zwischen Patienten mit Diabetes mellitus und diabetischer Neuropathie beobachtet. Die Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zeigten einen stärkeren Verlust der kleinen Nervenfasern in beiden Hautarealen. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen den beiden Gruppen auch im Alter und der Krankheitsdauer der Patienten gefunden werden (Timar et al., 2016). In weiteren Studien wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion der IENFD für Patienten mit einem Diabetes mellitus bzw. mit einer diabetischen Neuropathie im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen (Kennedy et al., 1996; Polydefkis et al., 2001; Loseth et al., 2008; Shun et al., 2004). Die Untersuchungen und Resultate dieser Studie ähneln somit den bisherigen Ergebnissen und lassen eine „small-fiber“-Beteiligung in den Patientengruppen erkennen, welche bereits auch Patienten in einem frühen Krankheitsstadium betrifft.

4.2 Diskussion „large-fiber“ Beteiligung

4.2.1 ELEKTRONEUROGRAPHIE DES *NERVUS SURALIS*

In der Auswertung der Elektroneurographie des N. suralis in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnte bei 19 Patienten eine reduzierte Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP) gefunden werden. Anhand der Ergebnisse lässt sich eine axonale Degeneration der großen Nervenfasern erkennen. Bei 6 Patienten zeigte sich zusätzlich eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit. Eine isolierte reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit wurde bei keinem Patienten gefunden. Bei einem Teil der Patienten zeigten sich somit Hinweise auf eine zusätzliche Demyelinisierung der Nervenfasern. Jedoch kann auch ein Ausfall an myelinisierten schnell leitenden Nervenfasern zu einer deutlichen Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit und somit zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit der Ergebnisse führen. In dieser Auswertung wurde bei acht Patienten ein kompletter Verlust der Amplitude und der

Nervenleitgeschwindigkeit beobachtet. Bei einem schweren Krankheitsverlauf und einem kompletten Verlust der Reizantwort ist hierbei die Beurteilbarkeit einer axonalen oder demyelinisierenden Schädigung nicht möglich. In der Auswertung konnte für die Gesamtgruppe eine signifikante negative Korrelation zwischen der Amplitude des SNAP bzw. der NLG und dem Alter gefunden werden. Für die Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnte ebenfalls eine signifikante negative Korrelation zwischen dem SNAP und dem Alter gefunden werden. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einem Verlust der Höhe der Amplitude und der Nervenleitgeschwindigkeit, was sich in den altersabhängigen Normwerten widerspiegelt. Allerdings wurde lediglich eine sensible Neurographie und keine elektrophysiologische Messung eines motorischen Nerven durchgeführt, da es zu Beginn der diabetischen Neuropathie vor allem zu einer Schädigung sensibler Nervenfasern kommt. Im Verlauf können jedoch auch motorische Nervenfasern beteiligt sein bzw. kann es vereinzelt auch bei asymptomatischen Patienten oder Patienten mit einer milden Neuropathie zu einer Verlangsamung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit kommen (Donofrio et al., 1990; England et al., 2005). Eine motorische Schädigung ist daher in den aktuellen Ergebnissen nicht beurteilbar und folglich wird der Anteil an Patienten mit auffälligen Messungen nicht erfasst. Im Vergleich der Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen der Neurographien des N. suralis. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine pathologische Suralisneurographie ein Kriterium für das Vorliegen einer diabetischen Neuropathie darstellte und somit direkt Einfluss auf die Gruppeneinteilung hatte. Die Ergebnisse der reduzierten Amplitude des SNAP und der zum Teil reduzierten Nervenleitgeschwindigkeit in der Mehrzahl der Patienten mit diabetischer Neuropathie sprechen für eine axonale Schädigung der großen Nervenfasern mit einer zusätzlichen demyelinisierenden Schädigung, wie für diese Patientengruppe erwartet (Donofrio et al., 1990).

4.2.2 DERMAL NERVENFASERBÜNDEL

In der Auswertung der dermalen Nervenfaserbündel ohne myelinisierte Nervenfasern und in der Auswertung der Gesamtanzahl an dermalen Nervenfasern konnten

zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. In der Analyse der Bündel mit myelinisierten Nervenfasern konnten in den Hautbiopsien des Unterschenkels und des Fingers keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied konnte im Oberschenkel zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetes mellitus* beobachtet werden. Auch in einer Studie von Doppler et al. konnte ein solcher Unterschied an myelinisierten dermalen Nervenfasern im Oberschenkel zwischen Patienten mit einer Neuropathie und einer Kontrollgruppe gezeigt werden (Doppler et al., 2012). Insgesamt konnte in der Studie von Doppler et al. jedoch ein stärkerer Verlust an myelinisierten Nervenfasern im Vergleich zu den aktuellen Ergebnissen gefunden werden, was eventuell daraufhin deutet, dass hauptsächlich Patienten in der aktuellen Untersuchung eingeschlossen waren, welche weniger stark von der Krankheit betroffen waren. In einer Studie von Peltier et al. wurde eine signifikante Reduktion an myelinisierten Nervenfasern im Finger in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt, welchen wir nicht nachweisen konnten (Peltier et al., 2013). Möglicherweise liegt eine Ursache in den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und den weniger stark betroffenen Patienten in der aktuellen Studie. In der Auswertung von Peltier et al. zeigte sich zudem kein signifikanter Unterschied für Patienten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus, lediglich für Patienten mit einem Typ 1 Diabetes mellitus (Peltier et al., 2013). Diese Unterteilung wurde in der aktuellen Studie aufgrund der zu geringen Anzahl an Patienten mit einem Typ 1 Diabetes mellitus nicht vorgenommen. Im Gegensatz zu einer Studie von Doppler et al. konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der dermalen Nervenfaserbündel ohne myelinisierte Nervenfasern zwischen den Gruppen beobachtet werden. In der Studie wurde eine signifikant höhere Anzahl an Bündel ohne myelinisierte Nervenfasern in den Hautbiopsien des Oberschenkels der Gruppe Neuropathie im Vergleich zu den Kontrollen gefunden (Doppler et al., 2012). Ein signifikanter Unterschied in der Gesamtanzahl an Bündeln wurde in der Studie von Doppler et al. zwischen Patienten mit einer Neuropathie und den Kontrollen nicht gefunden (Doppler et al., 2012). Die Beobachtungen der Gesamtanzahl an Bündeln in

der aktuellen Studie ähneln den Ergebnissen von Doppler et al. Eine Beteiligung der großen Nervenfasern scheint somit keine Auswirkungen auf die Gesamtanzahl an Bündeln zu haben. Ein Vergleich der Ergebnisse des Unterschenkels ist leider nicht möglich, da sowohl in der Studie von Doppler et al., als auch in der Studie von Peltier et al. keine Hautbiopsie an dieser Stelle entnommen wurde. In der aktuellen Studie war die Beurteilung aufgrund einer niedrigen Anzahl an dermalen Bündeln in diesem Körperareal bei allen drei Gruppen eingeschränkt. Lediglich in der Auswertung der Bündel mit myelinisierten Nervenfasern konnte ein Unterschied zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen aber auch zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen in den Proben des Oberschenkels gefunden werden. In allen Gruppen war jedoch die Anzahl an Bündeln im Unterschenkel zu gering, um einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen zu können. Die Anzahl an myelinisierten Nervenfasern im Finger war dagegen in allen Gruppen ausreichend hoch und zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Insgesamt zeigte der Oberschenkel somit eine bessere Möglichkeit, um einen quantitativen Unterschied der Bündel mit myelinisierten Nervenfasern untersuchen zu können. Folglich deuten die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass der Oberschenkel eine gute Entnahmestelle zur Beurteilung der Menge an myelinisierten Nervenfasern ist, da im Unterschenkel im Vergleich insgesamt zu wenige beurteilbare Fasern vorhanden sind und die obere Extremität bzw. die Finger erst relativ spät im Krankheitsverlauf betroffen sind. Anhand des Verlustes an Bündeln mit myelinisierten Nervenfasern konnte eine Beteiligung der „large-fibers“ sowohl in den Gruppen *Diabetische Neuropathie*, als auch in der Gruppe *Diabetes mellitus* beobachtet werden. Eine Dysfunktion myelinisierter Nervenfasern in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* wurde ebenfalls anhand der elektrophysiologischen Messung nachgewiesen. Die Patienten mit diabetischer Neuropathie zeigten hierbei signifikante Unterschiede in den Ergebnissen der elektrophysiologischen Messungen des N. suralis im Vergleich zu den Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus*. Die Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* zeigten normwertige Messergebnisse und folglich keine Beteiligung der großen myelinisierten Nervenfasern in der elektrophysiologischen Untersuchung. Allerdings wurde in den

Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* ebenfalls eine signifikante Reduktion der IENFD im Oberschenkel im Vergleich zu den Kontrollen gefunden und somit eine Beteiligung der „small-fibers“. Die Reduktion der myelinisierten Nervenfasern könnte hierbei auf eine frühe Beteiligung der „large-fibers“ in dieser Gruppe hindeuten. Eine isolierte Beurteilung anhand der Auswertung der dermalen Bündel ist aber aufgrund der zum Teil sehr ähnlichen und niedrigen Werte in den drei Gruppen wenig hilfreich. Die elektrophysiologische Messung zur Beurteilung eines Verlustes an myelinisierten Nervenfasern anhand der standardisierten Normwerte ist hierbei eindeutiger und zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* auf.

4.2.3 ANZAHL SCHNÜRRINGE

In allen drei Gruppen konnten in den Immunfluoreszenz Doppelfärbungen ausreichend Schnürringe untersucht werden. In der Auswertung der Anzahl an Schnürringen in den Immunfluoreszenz Doppelfärbungen MBP und Caspr bzw. MBP und Neurofascin wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen. In der Doppelfärbung MBP und Na-Kanal konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Schnürringen im Unterschenkel zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetes mellitus* bzw. zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied konnte auch für die Gesamtanzahl an Schnürringen im Unterschenkel zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* gefunden werden. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die Patienten mit einer diabetischen Neuropathie eine reduzierte Anzahl an Schnürringen der myelinisierten Nervenfasern. Die Ergebnisse der Anzahl an Schnürringen in den Hautproben des Unterschenkels scheinen im Gegensatz zu den Auswertungen der dermalen Nervenfaserbündel für den Unterschenkel sensitiver zu sein. Wie bereits oben beschrieben, konnten keine Unterschiede der Bündel in den Proben des Unterschenkels zwischen den drei Gruppen aufgrund der geringen Anzahl an dermalen Nervenfasern gefunden werden. Auch in den Studien von Doppler et al. und Peltier et al. wurden keine Proben des Unterschenkels zur Analyse der myelinisierten

Nervenfasern aufgrund der geringen Anzahl an Fasern herangezogen (Doppler et al., 2012; Peltier et al. 2013).

Jedoch konnten auch in der aktuellen Studie Ranvier-Schnürringe mithilfe der Methode der Hautbiopsie, wie bereits von Doppler et al. und Peltier et al. beschrieben, nachgewiesen und untersucht werden (Doppler et al., 2012; Doppler et al., 2013; Peltier et al., 2013). Insgesamt zeigten die Proben der unbehaarten Haut des Fingers in allen drei Gruppen die größte Anzahl an Schnürringen. Bereits in einer Studie von Provitera wurde diese Beobachtung für myelinisierte Nervenfasern in Kontrollen gemacht (Provitera et al., 2007). Eine höhere Anzahl an Schnürringen in den Proben des Fingers im Vergleich zu den Proben der behaarten Haut des Oberschenkels wurde auch in der Studie von Doppler et al. beobachtet (Doppler et al., 2013).

Somit lassen sich die Beobachtungen der aktuellen Studie in die bisherigen Untersuchungen einordnen. Ein Vergleich der Beobachtungen zwischen den Patientengruppen und innerhalb der einzelnen Färbungen ist jedoch aufgrund eines Mangels an ähnlichen Ergebnissen nicht möglich.

4.3 Diskussion Schnürringarchitektur

4.3.1 LÄNGE DER RANVIER-SCHNÜRRINGE

In der Auswertung der Länge der Ranvier-Schnürringe konnten in den Proben der Patienten der Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* verlängerte Schnürringe gefunden werden, jedoch auch in den Proben der Kontrollen. Ein signifikanter Unterschied im Verhältnis der Gesamtanzahl an verlängerten Schnürringen zur Gesamtanzahl an detektierten Schnürringen zwischen den Gruppen konnte nicht gefunden werden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich hierfür jedoch in den Proben des Unterschenkels zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen. Ein Trend wurde zudem zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen nachgewiesen.

In einer Studie von Saporta et al. wurden verkürzte Internodien in Patienten mit einer Charcot-Marie-Tooth Neuropathie (Typ 1A) im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden, welche keine verkürzten Internodien und somit verlängerte Schnürringe zeigten. Segmentale Demyelinisierungen wurden jedoch nur in Patienten mit einer CIDP gefunden, in Kontrollen oder Patientin mit CMT nicht (Saporta et al., 2009). In Studien von Doppler et al. wurden ebenfalls verlängerte Schnürringe entdeckt, welche häufiger in Patienten mit einer demyelinisierenden Neuropathie, als in Patienten mit einer axonalen Neuropathie zu finden waren. Allerdings wurden hierbei keine verlängerten Schnürringe in den Proben der Kontrollgruppe nachgewiesen. Insgesamt konnten in den Kontrollen Schnürringe mit einer durchschnittlichen Länge von $4,3 \mu\text{m}$ ($\pm 0,9 \mu\text{m}$) gefunden werden. Als Grenzwert zur Bestimmung von verlängerten Schnürringen wurde ein Wert von $6,1 \mu\text{m}$ verwendet (Doppler et al., 2012; Doppler et al., 2013). In einer Studie von Peltier et al. wurden ebenfalls verlängerte Schnürringe in den Proben der Patienten mit diabetischer Neuropathie beobachtet (Peltier et al., 2013). Allerdings wurden hierbei keine Angaben zu Beobachtungen in Kontrollen und zur Länge der Schnürringe gemacht, so dass ein Vergleich mit den Ergebnissen in der aktuellen Studie nicht möglich ist. In einer Analyse von Provitera et al. wurden in Proben von Kontrollen für die Schnürringe der unbehaarten Haut eine Länge von $3,3 \mu\text{m}$ ($\pm 0,6 \mu\text{m}$) und für die Schnürringe der behaarten Haut eine Länge von $4,6 \mu\text{m}$ ($\pm 1,1 \mu\text{m}$) gefunden (Provitera et al., 2007). In einer Studie von Nolano et al. wurden ebenfalls Schnürringe in Proben der unbehaarten Haut von Kontrollen untersucht. Es konnte eine durchschnittliche nodale Länge von $3,5 \mu\text{m}$ ($\pm 0,8 \mu\text{m}$) ermittelt werden (Nolano et al., 2003). Im Gegensatz zur Auswertung von Provitera et al. wurde in der aktuellen Studie die durchschnittliche Länge von allen Schnürringen, sowohl der behaarten, als auch der unbehaarten Haut ermittelt. Die durchschnittliche Länge der Schnürringe lag bei $4,42 \mu\text{m}$ ($\pm 1,8 \mu\text{m}$) und der Grenzwert bei $8,02 \mu\text{m}$ (Mittelwert plus $2 \times \text{SD}$). Im Vergleich der ermittelten Werte zeigt sich folglich, dass sich die durchschnittlichen Längen der Schnürringe in den Kontrollen ähneln. Jedoch konnten in der aktuellen Studie trotz des höheren Grenzwertes verlängerter Schnürringe auch in den Kontrollen gefunden werden. Eine mögliche Ursache könnte in den

verwendeten Antikörpern zur Darstellung der Myelinhüllen liegen. Bereits Nolano et al. äußerten eine Vermutung darüber, dass es durch eine schwächere Anfärbung der paranodalen Bereiche der Myelinhüllen durch den Anti-MBP-Antikörper zu höheren Werten an verlängerten Schnürringen kommen könnte (Nolano et al., 2003). Ein weiterer methodischer Unterschied findet sich in der Färbeprozedur. In den zitierten Studien wurde, im Gegensatz zur aktuellen Studie, die Free-floating Methode zur Darstellung der Schnürringe verwendet. Hierbei wird eine kräftigere Anfärbung erzielt und somit möglicherweise ein Einfluss auf die Schnürringlänge ausgeübt. Dies könnte eine Erklärung für den Nachweis an verlängerten Schnürringen sein, welche auch in den Kontrollen zu finden waren. Allerdings lässt sich nicht eindeutig ausschließen, dass verlängerte Schnürringe nicht auch in Kontrollen zu finden sind. Der signifikante Unterschied in den Proben des Unterschenkels zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen bzw. der Trend diesbezüglich zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen zeigt möglicherweise, dass es im Krankheitsverlauf an den am weitesten distal gelegenen Nervenabschnitten insbesondere zu Veränderungen kommt. Veränderungen im Sinne von verlängerten Schnürringen könnten im Rahmen von physiologischen Prozessen auch bei gesunden Menschen auftreten und erst im Rahmen eines Krankheitsverlaufs quantitativ und qualitativ zunehmen, welche sich dann auch in pathologischen elektrophysiologischen Messungen bemerkbar macht. Weitere Untersuchungen im Hinblick auf ausführliche elektrophysiologische Untersuchungen und standardisierte Laborprotokolle zur Anfärbung der Schnürringe wären für einen Vergleich der Ergebnisse hilfreich. Insbesondere wäre hierbei auch eine standardisierte Erhebung eines größeren Probandenkollektives für weitere Vergleiche interessant.

4.3.2 VERÄNDERTE SCHNÜRRINGARCHITEKTUR

In der Auswertung der Schnürringarchitektur konnten verlängerte Schnürringe und veränderte Anfärbungen mithilfe der Caspr-, Neurofascin- und Na-Kanal-Färbungen in den Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich Veränderungen auch in den Kontrollen. In der Caspr-Färbung konnte ein signifikanter Unterschied im Verhältnis der veränderten Caspr-Färbungen

zur Gesamtanzahl an Caspr-positiven Schnürringen in den Proben des Fingers zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen gefunden werden. Eine signifikante positive Korrelation wurde für dieses Verhältnis und für die Amplitude des SNAP in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* nachgewiesen. Hierfür würde man jedoch eher eine negative Korrelation erwarten, das heißt eine Zunahme an veränderten Schnürringen bei Abnahme der Amplitude des SNAP. In der Untersuchung der Korrelation der Gesamtanzahl an Caspr-positiven Schnürringen im Finger und der Amplitude des SNAP wurde ein positiver Trend gefunden und somit eine insgesamt größere Anzahl an Schnürringen bei einer höheren Amplitude. Es wurde zwar keine Signifikanz für diese Korrelation gefunden, allerdings würde dieser Trend die positive Korrelation zwischen dem SNAP und den veränderten Schnürringen erklären, da bei den leichter betroffenen Patienten generell mehr Schnürringe zur Auswertung vorliegen.

In der Auswertung der Na-Kanal-Färbung zeigte sich in den Proben des Oberschenkels ein signifikanter Unterschied für das Verhältnis an verlängerten Na-Kanal-positiven Schnürringen zur Gesamtanzahl an Na-Anfärbungen zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen und somit eine höhere Anzahl an verlängerten Na-positiven Schnürringen im Verhältnis zur Gesamtanzahl an Schnürringen bei den schwerer betroffenen Patienten.

In der Auswertung der Neurofascin-Färbung konnte ein signifikanter Unterschied im Verhältnis der Auffälligkeiten der Neurofascin-Färbungen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Färbungen in den Proben des Unterschenkels zwischen der Gruppen *Diabetes mellitus* und den Kontrollen beobachtet werden. Dieser signifikante Unterschied zeigte sich auch in den Proben des Unterschenkels und des Fingers zwischen der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und den Kontrollen. In den Proben des Unterschenkels der Gruppe *Diabetische Neuropathie* konnte hierfür auch eine positive Korrelation zum HbA1c-Wert gefunden werden und somit eine Zunahme der Veränderungen mit steigendem HbA1c-Wert. Ein signifikanter Unterschied wurde auch für das Verhältnis an verlängerten Schnürringen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Färbungen im Unterschenkel und Finger zwischen den Gruppen *Diabetische*

Neuropathie und *Diabetes mellitus* und zwischen den Kontrollen und der Gruppe *Diabetische Neuropathie* gefunden. Im Vergleich zu den Kontrollen und den Patienten mit *Diabetes mellitus* zeigten die Patienten mit diabetischer Neuropathie eine vermehrte Anzahl an verlängerten Schnürringen im Verhältnis zur Gesamtanzahl an Neurofascin-positiven Schnürringen. Allerdings wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und dem Verhältnis an Auffälligkeiten der Neurofascin-Färbung zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Färbungen in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* gefunden. Ein Trend hierfür wurde auch für die Korrelation zwischen dem Verhältnis an verlängerten Neurofascin-positiven Schnürringe zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Anfärbungen und der Krankheitsdauer beobachtet. Diese Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass es mit zunehmender Krankheitsdauer zu einer Zunahme der Veränderungen kommt. Eine signifikante positive Korrelation konnte jedoch zwischen der Amplitude des SNAP und den Neurofascin-positiven Schnürringen im Finger der Gruppe *Diabetische Neuropathie* gefunden werden. Dies zeigt, dass es bei schwerer betroffenen Patienten zu einer Reduktion der Anzahl an Schnürringen kommt und somit die Beurteilbarkeit in fortgeschrittenen Stadien eingeschränkt wird. Ein weiterer signifikanter Unterschied in den Proben des Unterschenkels wurde für das Verhältnis an verbreiterten Neurofascin-Färbungen zur Gesamtanzahl an Neurofascin-Anfärbungen im Unterschenkel zwischen der Gruppe *Diabetes mellitus* und den Kontrollen beobachtet. Insgesamt konnten in den Neurofascin-Färbungen die meisten Auffälligkeiten und signifikanten Ergebnisse zwischen den Gruppen gefunden werden. Möglicherweise ist dies damit zu erklären, dass Neurofascin in den Schwanzellen exprimiert wird und ein essenzieller Bestandteil für die Integrität der paranodalen Region der Schnürringe ist (Schafer et al., 2004; Sherman et al., 2005). Bei einer paranodalen Demyelinisierung scheint Neurofascin somit vor den anderen Proteinen bzw. insbesondere von den pathologischen Prozessen betroffen zu sein. Die Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* zeigten insgesamt die meisten signifikanten Unterschiede in der Auswertung und somit mehr Veränderungen in der Schnürringarchitektur als die beiden anderen Kohorten. Signifikante Unterschiede in einzelnen Kategorien konnten

aber auch in den Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus*, als frühes Krankheitsstadium, beobachtet werden.

Zur Analyse von Veränderungen der Schnürringarchitektur in diabetischer Neuropathie gibt es zum Teil sehr unterschiedliche Arbeiten und Ergebnisse. Sima et al. untersuchte die Expression von Molekülen der nodalen und paranodalen Region in Proben des N. suralis von Ratten mit einem Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus. In den Ratten mit einem Typ 1 Diabetes mellitus und einer Krankheitsdauer von 8 Monaten konnte eine veränderte Expression und Delokalisierung der Na-Kanal-Untereinheiten und von Caspr beobachtet werden, jedoch nicht in den Ratten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus (Sima et al., 2004). Hinweise auf eine axogliale Dysjunktion wurden ebenfalls in einer tierexperimentellen Studie von Cherian et al. gefunden. In Ratten mit einem Diabetes mellitus wurde eine Umverteilung der nodalen Na-Kanäle entlang der paranodalen Region und der Internodien gefunden, welche eine Zunahme mit andauernder Krankheit zeigten und mit einer Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit assoziiert waren (Cherian et al., 1996). In einer Studie von Brown et al. wurde der Aufbau der Ranvier-Schnürringe ebenfalls in Ratten mit Diabetes mellitus untersucht. Die Auswertung der Schnürringarchitektur wurde unter anderem mithilfe von Na-Kanälen, Caspr und Neurofascin-155 vorgenommen. Hierbei wurden jedoch keine Veränderungen der molekularen Strukturen mithilfe der Anfärbung der nodalen und paranodalen Strukturen gefunden. Jedoch wurden hierfür Ratten mit einem milderen Diabetes mellitus und einer kürzeren Krankheitsdauer von 15-44 Tagen verwendet (Brown et al., 2001). In einer experimentellen Studie am Tiermodell von Hong et al. wurde eine veränderte Na-Kanal-Expression in großen myelinisierten Nervenfasern in Ratten mit induziertem Diabetes mellitus untersucht. Im Vergleich zu Kontrollratten wurde jedoch eine reduzierte Anzahl an Ranvier-Schnürringen, welche Na1.8-Kanal exprimierten, gefunden und eine verminderte Intensität in der Anfärbung an Na1.6- und Na1.8-Kanal an den Schnürringen (Hong et al., 2006). In der aktuellen Studie wurden keine tierexperimentellen Untersuchungen durchgeführt, weshalb die Ergebnisse nur bedingt Rückschlüsse ermöglichen. Durch die heterogenen Kohorten der Patienten und Kontrollen in den verschiedenen Studien, die unterschiedliche

Krankheitsdauer, sowie die Pathogenese der Diabetes mellitus Erkrankung lassen sich die tierexperimentellen Beobachtungen nur teilweise auf die aktuelle Studie übertragen und ein Vergleich wird hierbei folglich eingeschränkt. Eine Verlaufsbeobachtung bzw. ein Vergleich der Ergebnisse zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetikern ist in der aktuellen Untersuchung ebenfalls aufgrund einer zu geringen Anzahl an Patienten mit einem Typ 1 Diabetes nicht möglich. Jedoch geben die Beobachtungen Hinweise auf Veränderungen, welche zum Teil auch in dieser Studie gefunden wurden. Allerdings ist zu erkennen, dass es bislang keine einheitlichen Ergebnisse in der Auswertung der Schnürringarchitektur gibt. Veränderungen in den nodalen und paranodalen Regionen wurden ebenfalls in den Patienten der Studie gefunden, wobei diese Beobachtungen in den schwerer betroffenen Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie*, als auch in einem Frühstadium der Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* gefunden wurden. Hinweise auf Veränderungen in den Kontrolltieren in den tierexperimentellen Studien wurden leider nicht gemacht. Dies wäre für die Ergebnisse der aktuellen Studie interessant, da auch in den Proben der Probanden Veränderungen beobachtet wurden. In einer Studie von Doppler et al. wurden mithilfe von Hautbiopsien dermale Nervenfasern in Proben des Oberschenkels und des Fingers in Patienten mit Neuropathie und in einer Kontrollkohorte untersucht. Veränderte Caspr- und Neurofascin-Anfärbungen und verlängerte Schnürringe konnten in Patienten mit einer demyelinisierender Neuropathie und zum Teil in Patienten mit einer axonaler Neuropathie gefunden werden (Doppler et al., 2013). Demyelinisierende Prozesse scheinen somit kein spezifisches Merkmal für eine primär demyelinisierende Neuropathie zu sein. Verlängerte Schnürringe konnten zudem auch in einer anderen Studie in Patienten mit einer Small-fiber Neuropathie gefunden werden (Doppler et al., 2012). Wie in den Untersuchungen von Doppler et al., wurden in der aktuellen Studie Veränderungen der Caspr- und Neurofascin-Färbungen in den Patienten der Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* gefunden. Anhand der elektrophysiologischen Untersuchungen konnte in den Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* eine axonale Degeneration der Nervenfasern mit einer zum Teil demyelinisierenden Komponente gezeigt werden. Anhand der

Veränderungen der Ranvier-Schnürringe in der Auswertung des Schnürringaufbaus konnten in den Patienten mit diabetischer Neuropathie ebenfalls demyelinisierende Prozesse der großen Nervenfasern beobachtet werden. Allerdings wurden auch Veränderungen in den Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* gefunden, welche in der elektrophysiologischen Untersuchung des sensiblen N. suralis normwertige Ergebnisse zeigten. Veränderungen der Schnürringarchitektur scheinen somit kein spezifisches Merkmal für eine Demyelinisierung zu sein. Mithilfe der Hautbiopsie lassen sich somit Veränderungen der distalen Nervenfasern auch in den Patienten in einem frühen Krankheitsstadium beobachten.

Die Ergebnisse der Auswertung der Na-Kanal-Färbung stehen allerdings im Kontrast zu den Beobachtungen von Doppler et al., welche keine Veränderungen der Na-Kanal Färbung beobachten konnten (Doppler et al., 2013). In einer Studie von Peltier et al. wurden ebenfalls in Patienten mit einer diabetischen Neuropathie myelinisierte Nervenfasern und Schnürringe in Hautbiopsien des Fingers untersucht. Verlängerte Schnürringe und eine Verteilung der Na-Kanal-Färbung entlang dieser Veränderungen konnte in den Patienten beobachtet werden (Peltier et al., 2013). Allerdings wurde nicht beschrieben, wie viele der Patienten hiervon betroffen waren und ob solche Beobachtungen auch in den Kontrollen gefunden wurden. In der Studie von Doppler et al. wurde in einer Kontrollgruppe die normale Schnürringarchitektur analysiert und beschrieben. Die Kontrollen zeigten hierbei allerdings keine Veränderungen der Caspr- und Na-Kanal-Färbung. In der Probe einer Kontrolle wurde jedoch ebenfalls eine veränderte Neurofascin-Anfärbung gefunden (Doppler et al., 2013). In der aktuellen Studie wurden Veränderungen allerdings auch in einem großen Teil der Kontrollen beobachtet. Im Vergleich der Verhältnisse der Veränderungen in den Anfärbungen zur Gesamtanzahl an Schnürringen zeigten die Patienten der Gruppen *Diabetische Neuropathie* und *Diabetes mellitus* jedoch signifikante Unterschiede. In den Patienten konnten somit mehr Veränderungen beobachtet werden, wobei die Gruppe *Diabetische Neuropathie* stärker hiervon betroffen war. Die Hypothese, dass Kontrollen keine Veränderungen der Ranvier-Schnürringe aufweisen, kann anhand der aktuellen Studie nicht bestätigt werden. Insgesamt konnten in allen drei Gruppen

Veränderungen der Schnürringarchitektur gefunden werden. In der Gruppe *Diabetische Neuropathie* waren hiervon 19 von 38 Patienten betroffen, in der Gruppe *Diabetes mellitus* 11 von 17 Patienten und auch in der Kontrollgruppe 16 von 30 Patienten. Ein signifikanter Zusammenhang der Anzahl bzw. der Prozentwerte an Patienten mit auffälligen Proben konnte lediglich in der Kategorie Auffälligkeiten in der Neurofascin-Färbung mit 29,4% der Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus*, 34,4% der Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie* und nur 6,7% der Kontrollen gefunden werden. Die Auswertung der Neurofascin-Färbung scheint hierbei am aussagekräftigsten in der Unterscheidung der Gruppen zu sein, wobei die Gruppe *Diabetische Neuropathie* einen höheren Prozentsatz an Auffälligkeiten aufweist, als die Gruppe *Diabetes mellitus*. Dies würde vermuten lassen, dass es zu einer höheren Anzahl an Veränderungen bei schwerer betroffenen Patienten kommt. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen jedoch auch, dass Kontrollen Veränderungen der Nervenfasern aufweisen können. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Kontrollen mit einer asymptomatischen PNP in der Kohorte waren, da nicht von allen Kontrollen eine elektrophysiologische Messung erhoben werden konnte.

Veränderungen der Schnürringarchitektur, wie veränderte Caspr-, Neurofascin- und Na-Kanal-Färbungen oder verlängerte Schnürringe, wurden somit in allen drei Patientengruppen gefunden. In der Überprüfung einer Überschneidung dieser Merkmale konnten in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* 10 von 19 Fälle mit zwei Merkmalen und nur 3 von 19 Fällen mit einem Merkmal gefunden werden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* waren es 6 von 11 Patienten und in den Kontrollen 7 von 16 Fällen mit zwei Merkmalen. Nur ein Merkmal wurde in 1 von 11 Fällen der Gruppe *Diabetes mellitus* und in 6 von 16 Fällen der Kontrollen beobachtet. Eine Überschneidung von drei Merkmalen wurde in 6 von 19 Patienten der Gruppe *Diabetische Neuropathie*, in 4 von 11 Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* und in 3 von 16 Kontrollen gefunden. Eine Kombination von vier Merkmalen wurde in keiner Gruppe nachgewiesen. Die Kombination von zwei oder drei Merkmalen bzw. eine Anhäufung von Veränderungen der Schnürringarchitektur scheint daher häufiger in Patienten mit *Diabetischer Neuropathie* vorzukommen. Möglicherweise spielen

verschiedene strukturelle Veränderungen bzw. deren Anhäufung in der Krankheitsentstehung eine Rolle, sodass einzelne Veränderungen auch bei gesunden Probanden vorkommen können, ohne dass diese eine direkte Auswirkung auf die Nervenfunktion haben oder diese einen pathologischen Krankheitswert besitzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurden periphere Nervenfasern, schwerpunktmäßig myelinisierte Fasern, in Hautbiopsien von Patienten mit einer diabetischen Neuropathie und Diabetes mellitus ohne Neuropathie untersucht. Ziel war es, Hinweise auf paranodale Demyelinisierung, wie eine Dispersion der paranodalen Proteine Caspr und Neurofascin oder eine Verlängerung der Ranvier-Schnürringe, zu detektieren und zwischen Patienten und Kontrollen zu vergleichen. Es sollte die Hypothese überprüft werden, dass paranodale Demyelinisierung bei der diabetischen Polyneuropathie eine Rolle spielt und in Hautbiopsien wenig invasiv nachweisbar ist.

Es konnten in dieser Studie Veränderungen der paranodalen Schnürringarchitektur an myelinisierten Nervenfasern mithilfe der Hautbiopsien nachgewiesen werden. Verlängerte Schnürringe als Zeichen einer segmentalen Demyelinisierung konnten in den Proben der Patienten mit einer diabetischen Neuropathie, aber auch in der Gruppe der Patienten mit Diabetes mellitus ohne Neuropathie nachgewiesen werden. Veränderungen der paranodalen Proteine, wie eine Dispersion von Caspr und Neurofascin in den Proben des Fingers der Patienten mit diabetischer Neuropathie, sowie eine Dispersion von Neurofascin im Unterschenkel in beiden Patientengruppen, waren detektierbar. Diese Ergebnisse der veränderten Schnürringarchitektur weisen auf demyelinisierende Prozesse in den Patienten hin, wobei vermehrt Veränderungen in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* nachweisbar waren. Aber auch Patienten der Gruppe *Diabetes mellitus* zeigen Veränderungen in einem frühen Krankheitsstadium, welche mithilfe der Hautbiopsien in myelinisierten Nervenfasern nachweisbar waren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Veränderungen der paranodalen Proteine der Ranvier `Schnürringe Teil der Pathogenese der diabetischen Neuropathie sind. Interessanterweise wurden Veränderungen der Schnürringarchitektur, im Sinne von veränderten Anfärbungen und verlängerten Schnürringen der myelinisierten Nervenfasern, auch in der Kontrollgruppe beobachtet, wenn auch in geringerer Häufigkeit. Auffälligkeiten der Schnürringarchitektur können somit auch bei gesunden Probanden aufgrund bisher unklarer Ursachen auftreten.

5.1 Ausblick

Mithilfe der Methode der Hautbiopsie konnten Veränderungen der intraepidermalen Nervenfasern, der dermalen Nervenfaserbündel und der Schnürringarchitektur analysiert und quantifiziert werden. Eine Beteiligung der Strukturen konnte in der Gruppe *Diabetische Neuropathie* beobachtet werden. In der Gruppe *Diabetes mellitus* konnten ebenfalls Veränderungen in einem frühen Krankheitsstadium untersucht werden. Hautbiopsien bieten somit die Möglichkeit Veränderungen von Nervenfasern im klinischen Alltag untersuchen zu können. Allerdings wurden Veränderungen der Schnürringarchitektur auch in der Kontrollgruppe nachgewiesen. Für eine Überprüfung dieser Ergebnisse wären Untersuchungen an einer größeren Probandengruppe hilfreich. Außerdem ist in diesem Zusammenhang eine ausführliche Anamnese, körperliche, elektrophysiologische und laborchemische Untersuchung wünschenswert, um verschiedenen Krankheitsprozesse, welche zu einer Schädigung der Schnürringarchitektur führen könnten, zu identifizieren und physiologische Veränderungen erfassen zu können. Im Hinblick auf die Patientengruppe wäre eine größere Anzahl an Patienten, insbesondere der Gruppe *Diabetes mellitus* für eine bessere Aussagekraft der Studienergebnisse hilfreich, um Veränderungen in Patienten mit einem Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus besser vergleichen zu können. Eine Verlaufsbeobachtung und eine wiederholte Hautbiopsie nach einem definierten Zeitpunkt wären interessant, um die Veränderungen im Krankheitsverlauf erfassen zu können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

American Diabetes Association

Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy.

Muscle & Nerve, 1988

Attal N., Cruccu G., Baron R., Haanpää M., Hansson P., Jensen T.S., Nurmikko T.

EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision.

Eur J Neurol 17:1113-e88, 2010

Baron R., Binder A., Wasner G.

Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanism, and treatment.

Lancet Neurol 9:807-19, 2010

Baron R., Binder A., Birklen F., Maier Ch., Quasthoff S., Sommer C., Tölle T. R., Wasner G., Ziegler D.

S1-Leitlinie: Pharmakologisch nicht interventionelle Therapie chronisch neuropathischer

Schmerzen. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2012.

AWMF-Registernummer: 030/114

Baumgärtner U., Magerl W., Klein T., Hopf H.C., Treede R-D

Neurogenic hyperalgesia versus painful hypoalgesia: two distinct mechanisms of neuropathic pain.

Pain 96:141-51, 2002

Berlit, Peter

Klinische Neurologie, 3.Auflage

Springer Medizin Verlag, 2011

Boucek P., Havrdova T., Voska L., Lodererova A., Saudek F., Lipar K., Janousek L., Adamec M.,

Sommer C.

Severe depletion of intraepidermal nerve fibers in skin biopsies of pancreas transplant recipients.

Transplant Proc. 37(8):3574-5, 2005

Boucek P., Havrdova T., Voska L., Lodererova A., He L., Saudek F., Lipar K., Adamec M., Sommer C.

Epidermal innervation in type 1 diabetic patients: a 2.5-year prospective study after simultaneous pancreas/kidney transplantation.

Diabetes Care 31(8):1611-2, 2008

Bouhassira D., Attal N., Fermanian J., Alchaar H., Gautron M., Masquelier E., Rostaing S., Lanteri-Minet M., Collin E., Grisart J., Boureau F.

Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory
Pain 108:248-257, 2004

Boulton A.J.M., Malik R.A., Arezzo J.C., Sosenko J.M.

Diabetic Somatic Neuropathies.
Diabetes Care, Volume 27:1458-1486, 2004

Boulton A.J.M., Vinik A.I., Arezzo J.C., Bril V., Feldman E.L., Freeman R., Malik R.A., Maser R.E., Sosenko J.M., Ziegler D.

Diabetic Neuropathies. A statement by the American Diabetes Association.
Diabetes Care, Volume 28:956-962, 2005

Bril, Vera

NIS-LL: The Primary Measurement Scale for Clinical Trial Endpoints in Diabetic Peripheral Neuropathy
Eur Neurol 41 (suppl. 1):8-13, 1999

Brown A.A., Xu T., Arroyo E.J., Levinson S.R., Brophy P.J., Peles E., Scherer S.S.

Molecular Organization of the Nodal Region is not altered in spontaneously Diabetic BB-Wistar Rats
Journal of Neuroscience Research 65:139-149, 2001

Callaghan B.C., Cheng H.T., Stables C.L., Smith A.L., Feldman E.L.

Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments.
Lancet Neurol 11:521-34, 2012

Caputo G.M., Cavanagh P.R., Ulbrecht J.S., Gibbons G.W., Karchmer A.W.

Assessment and management of foot disease in patients with diabetes.
N Engl J Med:854-860, 1994

Chan A.W., MacFarlane I.A., Bowsher D., Campbell J.A

Weighted needle pinprick sensory thresholds: a simple test of sensory function in diabetic peripheral neuropathy.
J Neurol Neurosurg Psychiat 55:56-9, 1992

Chao C.C., Hsieh S.C., Yang W.S., Lin Y.H., Lin W.M., Tai T.Y., Hsieh S.T.

Glycemic control is related to the severity of impaired thermal sensations in type 2 diabetes.
Diabetes Met Res Rev 23:612-620, 2007

Cherian P.V., Kamijo M., Angelides K.J., Sima A.A.

Nodal Na (+) -channel displacement is associated with nerve-conduction slowing in the chronically diabetic BB/W Rat: prevention by aldose reductase inhibition.

J Diabetes complications 10:192-200, 1996

Crawford B., Bouhassira D., Wong A., Dukes E.

Conceptual adequacy of the neuropathic pain symptom inventory in six countries

Health Qual Life Outcomes 6:62, 2008

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group

The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.

N Engl J Med, 1993

Divisova S., Vlckova E., Srotova I., Kincova S., Skorna M., Dusek L., Dubovy P., Bednarik J.

Short report: Complications. Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus.

Diabet. Med. 33:650-654, 2016

Donofrio P.D., Albers J.W.

AAEM Minimonograph #34: Polyneuropathy: Classification by nerve conduction studies and electromyography.

Muscle&Nerve 13:889-903, 1990

Doppler K., Werner C., Henneges C., Sommer C.

Analysis of myelinated fibers in human skin biopsies of patients with neuropathies

J Neurol 259:1879-1887, 2012

Doppler K., Werner C., Sommer C.

Disruption of nodal architecture in skin biopsies of patients with demyelinating neuropathies

Journal of the Peripheral Nervous System 18:168-176, 2013

Dyck P.J.

Severity and staging of diabetic polyneuropathy.

Thieme p. 170-175, 2003

England J.D., Gronseth G.S., Franklin G., Miller R.G., Asbury A.K., Carter G.T., Cohen J.A., Fisher M.A., Howard J.F., Kinsella L.J., Latov N., Lewis R.A., Low P.A., Sumner A.J.

Distal symmetric polyneuropathy: A definition for clinical research. Report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of physical Medicine and Rehabilitation
Neurology 64:199-207, 2005

England J.D., Gronseth G.S., Franklin G., Carter G.T., Kinsella L.J., Cohen J.A., Asbury A.K., Szigeti K., Lupski J.R., Latov N., Lewis R.A., Low P.A., Fisher M.A., Herrmann D.N., Howard J.F., Lauria G., Miller R.G., Polydefkis M., Sumner A.J.

Practice Parameter: Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: Role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review)
Neurology 72:177-184, 2009

Fagius J., Wahren L.K.
Variability of sensory threshold determination in clinical use.
J Neurol Sci. 51:11-27, 1981

Fruhstorfer H., Lindblom U., Schmidt W.G.
Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients.
J Neurol. Neurosurg. Psychiat. 39:1071-75, 1976)

Fruhstorfer H., Gross W., Selbmann O.
Technical note: von Frey hairs: new materials for a new design.
Eur J Pain 5:341-2, 2001

Garbay B., Heape A.M., Sargueil F., Cassagne C.
Myelin synthesis in the peripheral nervous system
Progress in Neurobiology 61:267-304, 2000

Gimbel J.S., Richards P., Portenoy R.K.
Controlled-release oxycodone for pain in diabetic neuropathy: a randomized controlled trial.
Neurology 60:927-934, 2003

Goldberg J.M., Lindblom U.
Standardised method of determining vibratory perception thresholds for diagnosis and screening in neurological investigation.
J Neurol. Neurosurg. Psychiat. 42:793-803, 1979

Goransson L., Mellgren S.I., Lindal S., Omdal R.

The effect of age and gender on epidermal nerve fibre density.

Neurology 62:774-777, 2004

Greenspan J., McGillis S.L.B.

Thresholds for the perception of pressure, sharpness, and mechanically-evoked cutaneous pain: effects of laterality and repeated testing.

Somatosens Motor Res. 11:311-7, 1994

Gupta A., Gupta Y.

Diabetic Neuropathy: Part 1

J Pak Med Assoc 6:714-718, 2014

Hacke W.

Neurologie, 13. Auflage

Springer Medizin Verlag, 2010

Hampf G., Bowsher D., Wells C., Miles J.

Sensory and autonomic measurements in idiopathic trigeminal neuralgia before and after radiofrequency thermocoagulation: differentiation from some other causes of facial pain.

Pain 40:241-8, 1990

Havrdova T., Boucek P., Saudek F., Voska L., Lodererova A., Üceyler N., Vondrova H., Skibova J., Lipar K., Sommer C.

Severe Epidermal Nerve Fiber Loss in Diabetic Neuropathy Is Not Reversed by Long-Term Normoglycemia After Simultaneous Pancreas and Kidney Transplantation.

Am J Transplant 16(7):2196-201, 2016

Herold G.

Innere Medizin, 2016

Heuß D., Haupt W. F., Kuntzer T., Löscher W., Neundörfer B., Rautenstrauß B., Renaud S., Sommer C. S1-Leitlinie: Diagnostik bei Polyneuropathien.

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2012.

AWMF-Registernummer: 030/067.

Hirai A., Yasuda H., Joko M., Maeda T., Kikkawa R.

Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves.

Journal of the Neurological Sciences 172:55-62, 2000

Hong S., Wiley J.W.

Altered expression and function of sodium channels in large DRG neurons and myelinated A-fibers in early diabetic neuropathy in the rat.

Biochemical and Biophysical Research Communications 339:652-660, 2006

International Diabetes Federation

<http://www.idf.org/>

Jia Z.-R., Wang T.-T., Wang H.-X.

Significance of Quantitative Sensory Testing in the Diagnosis of Diabetic Peripheral Neuropathy.

J Clin Neurophysiol 31:437-440, 2014

Juster-Switlyk K., Smith A.G.

Updates in diabetic peripheral neuropathy.

F1000 Faculty Rev:738, 2016

Kasznicki J., Kosmowski M., Sliwinska A., Mrowicka M., Stanczyk M., Majsterek I., Drzewoski J.

Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy.

Mol Biol Rep 39:8669-8678, 2012

Kaur H., Hota D., Bhansali A., Dutta P., Bansal D., Chakrabarti A.

A comparative evaluation of amitriptyline and duloxetine in painful diabetic neuropathy: a randomized, double-blind, cross-over clinical trial.

Diabetes Care 34:818-822, 2011

Kennedy W.R., Navarro X., Goetz F.C., Sutherland D.E.R., Najarian J.S.

Effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy.

N Engl J Med 322:1078-1079, 1990

Kennedy W.R., Wendelschafer-Crabb G., Johnson T.

Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy.

Neurology 47:1042-8, 1996

Kennedy W.R., Wendelschafer-Crabb G., Polydefkis M., McArthur J.C.

Pathology and quantitation of cutaneous innervation.

In: Peripheral Neuropathy. Thomas P.K., Dyck P.J. (Eds) Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 869-895

Klinke R., Pape H.-C., Kurtz A., Silbernagel S.

Physiologie, 6. Auflage

Georg Thieme Verlag KG, 2010

LaMotte R.H., Shain C.N., Simone D.A., Tsai E.-F. P.
Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms.
J Neurophysiol. 66.1:190-211, 1991

Lauria G., Cornblath D.R., Johansson O., McArthur J.C., Mellgren S.I., Nolano M., Rosenberg N., Sommer C.
EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy.
European Journal of Neurology 12:747-758, 2005

Lauria G., Lombardi R., Camozzi F., Devigili G.
Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy.
Histopathology 54:273-285, 2009

Lauria G., Hsieh S.T., Johansson O., Kennedy W.R., Leger J.M., Mellgren S.I., Nolano M., Merkies I.S.J., Polydefkis M., Smith A.G., Sommer C., Valls-Solé J.
European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. European Journal of Neurology 17:903-912, 2010

Lennertz R.C., Medler K.A., Bain J.L., Wright D.E., Stucky C.L.
Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetes neuropathy.
J Neurophysiol 106:905-914, 2011

Li J., Bai Y., Ghandour K., Qin P., Grandis M., Tronstinskaia A., Ianakova E., Wu X., Schenone A., Vallat J.-M., Kupsky W.J., Hatfield J., Shy M.E.
Skin biopsies in myelin-related neuropathies: bringing molecular pathology to the bedside.
Brain 128:1168-1177, 2005

Llewelyn J.G.
The diabetic Neuropathies: Types, diagnosis and management.
J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:15-19, 2003

Loseth S., Stalberg E., Jorde R., Mellgren S.I.
Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies
J Neurol 255:1197-1202, 2008

Loseth S., Stalberg E.V., Lindal S., Olsen E., Jorde R., Mellgren S.I.
Small and large fiber neuropathy in those with type 1 and type 2 diabetes: a 5-year follow-up study.
Journal of the Peripheral Nervous System 21:15-21, 2016

Magerl W., Wilk S.H., Treede R.-D.
Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans.
Pain 74:257-68, 1998

Magerl W., Krumova E.K., Baron R., Tölle T., Treede R.-D., Maier C.
Reference data for quantitative sensory testing (QST): Refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data.
Pain 151:598-605, 2010

Malik R.A., Veves A., Masson E.A., Sharma A.K., Ah-See A.K., Schady W., Lye R.H., Boulton A.J.M.
Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy.
Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 55:557-561, 1992

Malik R.A., Tesfaye S., Thompson S.D., Veves A., Hunter A., Sharma A.K., Ward J.D., Boulton A.J.M.
Transperineurial capillary abnormalities in the sural nerve of patients with diabetic neuropathy.
Microvascular Research 48:236-245, 1994

Malik R.A., Veves A., Tesfaye S., Smith G., Cameron N., Zochodne D., Lauria G.
Small fibre neuropathy: role in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy.
Diabetes Metab Res Rev 27:678-684, 2011

Meier T., Wasner G., Faust M., Kuntzer T., Ochsner F., Hueppe M., Bogousslavsky J., Baron R.
Efficacy of lidocaine patch 5% in the treatment of focal peripheral neuropathic pain syndromes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.
Pain 106:151-158, 2003

McArthur J.C., Stocks E.A., Hauer P., Cornblath D.R., Griffin J.W.
Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency.
Arch Neurol 55:1513-1520, 1998

Mumenthaler M., Mattle H.
Neurologie, 12. Auflage
Georg Thieme Verlag KG, 2008

Myers M.I., Peltier A.C., Li J.

Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy.

Muscle & Nerve 47:1-11, 2013

Navarro X., Sutherland D.E.R., Kennedy W.R.

Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy.

Ann Neurol 42:727-736, 1997

Newrick P.G., Wilson A.J., Jakubowski J., Boulton A.J.M, Ward J.D.

Sural nerve oxygen tension in diabetes.

British Medical Journal, Vol. 293, 1986

Nolano M., Provitera V., Crisci C., Stancanelli A., Wendelschafer-Crabb G., Kennedy W.R., Santoro L.

Quantification of Myelinated Endings and Mechanoreceptors in Human Digital Skin.

Ann Neurol 54:197-205, 2003

Peltier A., Myers M.I., Artibee K.J., Hamilton A.D., Yan Q., Guo J., Shi Y., Wang L., Li J.

Evaluation of dermal myelinated nerve fibers in diabetes mellitus.

Journal of the Peripheral Nervous System 18:162-167, 2013

Polydefkis M., Hauer P., Griffin J.W., McArthur J.C.

Skin Biopsy as a Tool to Assess Distal Small Fiber Innervation in Diabetic Neuropathy.

Diabetes Technology&Therapeutics, Vol. 3, No. 1, 2001

Polydefkis M., Yiannoutsos C.T., Cohen B.A., Hollander H., Schiffito G., Clifford D.B., Simpson D.M.,

Katzenstein D., Shriver S., Hauer P., Brown A., Haidich A.B., Moo L., McArthur J.C.

Reduced intraepidermal nerve fiber density in HIV-associated sensory neuropathy.

Neurology 58:115-9, 2002

Price D.D., Hu J.W., Dubner R., Gracely R.H.

Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses.

Pain 3:57-68, 1977

Provitera V., Nolano M., Pagano A., Caporaso G., Stancanelli A., Santoro L.

Myelinated nerve endings in human skin.

Muscle & Nerve 35:767-775, 2007

Rice F.L., Albrecht P.J.

Cutaneous Mechanisms of Tactile Perception: Morphological and Chemical Organization of the Innervation to the Skin.

The Senses: A Comprehensive Reference, vol. 6, pp. 1-31, 2008

Rolke R., Andrews K., Magerl W., Treede R.-D.

QST-Instruktionen nach den Regeln des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerz (DFNS)

Version 2.1, 2010

Rolke R., Magerl W., Andrews Campbell K., Schalber C., Birklein F., Treede RD.

Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials

European Journal of Pain 10: 77-88, 2006

Said G., Baudoin D., Toyooka K.

Sensory loss, pains, motor deficit and axonal regeneration in length-dependent diabetic polyneuropathy.

J Neurol 255:1693-1702, 2008

Samuelsson M., Leffler A.S., Hansson P.

Dynamic mechanical allodynia: On the relationship between temporo-spatial stimulus parameters and evoked pain in patients with peripheral neuropathy.

Pain 115:264-72, 2005

Saporta M.A., Katona I., Lewis R.A., Masse S., Shy M.E., Li J.

Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A.

Brain 132:3263-3273, 2009

Schafer D.P., Bansal R., Hedstrom K.L., Pfeiffer S.E., Rasband M.N.

Does paranode formation and maintenance require partitioning of neurofascin 155 into lipid rafts?

J Neurosci. 24(13):3176-85, 2004

Scherer S.S., Arroyo E.J.

Recent progress on the molecular organization of myelinated axons.

J Peripher Nerv Syst 7:1-12, 2002

Sherman D.L., Tait S., Melrose S., Johnson R., Zonta B., Court F.A., Macklin W.B., Meek S., Smith A.J., Cottrell D.F., Brophy PJ.

Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction.

Neuron 28;48(5):737-42, 2005

Shun C.T., Chang Y.-C., Wu H.-P., Hsieh S.-C., Lin W.-M., Lin Y.-H., Tai T.-Y., Hsieh S.-T.

Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments

Brain 127:1593-1605, 2004

Siao P., Cros D. P.

Quantitative sensory testing.

Phys Med Rehabil Clin N Am 14(2): 261-86, 2003

Simons M., Trotter J.

Wrapping it up: the cell biology of myelination

Current Opinion in Neurobiology 17:533-540, 2007

Sima A.A.F., Nathaniel V., Bril V., McEwen T.A.J., Greene D.A.

Histopathological Heterogeneity of Neuropathy in Insulin-dependent and Non-insulin-dependent Diabetes, and Demonstration of Axo-glial Dysjunction in Human Diabetic Neuropathy.

J Clin Invest 81:349-364, 1988

Sima A.A.F., Zhang W., Li Z.-G., Murakawa Y., Pierson C.R.

Molecular Alterations Underlie Nodal and Paranodal Degeneration in Type 1 Diabetic Neuropathy and Are Prevented by C-Peptide.

Diabetes 53:1556-1563, 2004

Smith A.G., Russell J., Feldman E.L., Goldstein J., Peltier A., Smith S., Hamwi J., Pollari D., Bixby B., Howard J., Singleton J.R.

Lifestyle Intervention for Pre-Diabetic Neuropathy.

Diabetes Care 29:1294-1299, 2006

Sommer C., Lauria G.

Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy.

Lancet Neurol 6:632-42, 2007

Sommer C.

Skin biopsy as a diagnostic tool.

Neurology 21:563-568, 2008

Sommer C., Brandner S., Dyck P.J., Harati Y., LaCroix C., Lammens M., Magy L., Mellgren S.I., Morbin M., Navarro C., Powell H.C., Schenone A.E., Tan E., Urtizberea A., Weis J.
Peripheral Nerve Society Guideline on processing and evaluation of nerve biopsies.
J Peripher Nerv Syst 15:164-175, 2010

Sommer C., Richter H., Rogausch J.P., Frettlöh J., Lungenhausen M., Maier C.
A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the neuropathic pain symptom inventory (NPSI)
BMC Neurology 11:104, 2011

Tankisi H., Pugdahl K., Johnsen B., Fuglsang-Frederiksen A.
Correlations of nerve conduction measures in axonal and demyelinating polyneuropathies.
Clin Neurophysiol 118:2383-2392, 2007

Tesfaye S., Chaturvedi N., Eaton S.E.M., Ward J.D., Manes Ch., Ionescu-Tirgoviste C., Witte D.R., Fuller J.H.
Vascular Risk Factors and Diabetic Neuropathy.
N Engl J Med 352:341-50, 2005

Tesfaye S., Boulton A.J.M., Dyck P.J., Freeman R., Horowitz M., Kempler P., Lauria G., Malik R.A., Spallone V., Vinik A., Bernardi L., Valensi P.
Diabetic Neuropathies: Updates on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments
Diabetes Care 33:2285-2293, 2010

Tesfaye S., Vileikyte L., Rayman G., Sindrup S.H., Perkins B.A., Baconja M., Vinik A.I., Boulton A.J.M.
Painful diabetic peripheral neuropathy: consensus recommendations on diagnosis, assessment and management.
Diabetes Metab Res Rev 27:629-638, 2011

Thomas P.K., Beamish N.G., Small J.R., King R.H.M., Tesfaye S., Ward J.D., Tsigos C., Young R.J., Boulton A.J.M.
Paranodal structure in diabetic sensory polyneuropathy.
Acta Neuropathol 92:614-620, 1996

Timar B., Popescu S., Timar R., Baderca F., Duica B., Vlad M., Levai C., Balinisteanu B., Simu M.
The usefulness of quantifying intraepidermal nerve fibers density in the diagnostic of diabetic peripheral neuropathy: a cross-sectional study.
Diabetol Metab Syndr 8:31, 2016

Toth C., Brussee V., Martinez J.A., McDonald D., Cunningham F.A., Zochodne D.W.
Rescue and regeneration of injured peripheral nerve axons by intrathecal insulin.
Neuroscience 139:429-449, 2006

Toth C., Mawani S., Brady S., Chan C., Liu C., Mehina E., Garven A., Bestard J., Korngut L.
An enriched-enrolment, randomized withdrawal, flexible-dose, double-blind, placebo-controlled,
parallel assignment efficacy study of nabilone as adjuvant in the treatment of diabetic peripheral
neuropathic pain.
Pain 153:2073-2082, 2012

Umapathi T., Wan Loo Tan, Seng Cheong Loke, Puay Cheow Soon, Tavintharan S., Yiong Huank Chan
Intraepidermal nerve fiber density as a marker of early diabetic neuropathy.
Muscle Nerve 35:591-598, 2007

Vlckova-Moravcova E., Bednarik J., Dusek L., Toyka K.V., Sommer C.
Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. Muscle Nerve
37:50-60, 2008

Wada R., Yagihshi S.
Role of Advanced Glycation End Products and Their Receptors in Development of Diabetic
Neuropathy.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1043:598-604, 2005

Watson C.P.N., Moulin D., Watt-Watson J., Gordon A., Eisenhoffer J.
Controlled-release oxycodone relieves neuropathic pain: a randomized controlled trial in painful
diabetic neuropathy.
Pain 105:71-78, 2003

Weinstein S.
Intensive and extensive aspects of tactile sensitivity as a function of body part, sex, and laterality
The Skin Senses pp. 195-222, 1968

Wiffen P.J., Derry S., Moore R.A., Aldington D., Cole P., Rice A.S.C., Lunn M.P.T, Hamunen K.,
Haanpaa K., Kalso E.A.
Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia – an overview of Cochrane reviews.
Cochrane Database Syst Rev 11:CD010567, 2013

Wiggin T.D., Sullivan K.A., Pop-Busui R., Amato A., Sima A.A.F, Feldman E.L.
Elevated Triglycerides Correlate with Progression of Diabetic Neuropathy.
Diabetes 58:1634-1640, 2009

Xu Q.-G., Li X.-Q., Kotecha S.A., Cheng S., Sun H.S., Zochodne D.W.
Insulin as an in vivo growth factor.
Experimental Neurology 188:43-51, 2004

Yarnitsky D., Sprecher E., Zaslansky R., Hemli J.A.
Heat pain thresholds: normative data and repeatability.
Pain 60:329-332, 1995

Ziegler E.A., Magerl W., Meyer R.A., Treede R.-D.
Secondary hyperalgesia to punctate mechanical stimuli: central sensitization to A-fibre nociceptor
input.
Brain 122:2245-57, 1999

Ziegler D., Ametov A., Barinov A., Dyck P.J., Gurieva I., Low P.A., Munzel U., Yakhno N., Raz I.,
Novosadova M., Maus J., Samigullin R.
Oral treatment with alpha-lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY
2 trial.
Diabetes Care 29:2365-2370, 2006

Ziegler D., Rathmann W., Dickhaus T., Meisinger C., Mielck A.,
Prevalence of Polyneuropathy in Pre-Diabetes and Diabetes is Associated with Abdominal Obesity
and Macroangiopathy.
Diabetes Care 31:464-469, 2008

Ziegler D., Hidvégi T., Gurieva I., Bongardt S., Freynhagen R., Sen D., Sommerville K.,
Efficacy and safety of lacosamide in painful diabetic neuropathy.
Diabetes Care 33:839-841, 2010

Zilliox L., Peltier A.C., Wren P.A., Anderson A., Smith A.G., Singleton J.R., Feldman E.L., Alexander
N.B., Russell J.W.
Assessing autonomic dysfunction in early diabetic neuropathy
The Survey of Autonomic Symptoms
Neurology 76, 2011

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas, sowie bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler für die unermüdliche Betreuung und Anleitung zur Durchführung und Fertigstellung der Dissertation bedanken.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter des histologischen Labors und der AG Sommer, insbesondere an Barbara Broll, Barbara Dekant, Hiltrud Klüpfel, Sonja Mildner und Kathleen Stahl für die vielseitigen Hilfestellungen und Ratschläge, sowie natürlichen an die Patienten und Probanden, welche Zeit und Geduld geopfert haben, um diese Studie zu ermöglichen.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei meiner Familie und engen Freunden bedanken, die mich während der Zeit der Durchführung und Fertigstellung der Dissertation unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.