

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Bestimmung von Zytokinexpressionsprofilen aus humanen  
Blut- und Hautproben bei Patienten mit small fiber  
Neuropathie**

Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.  
Vorgelegt von  
Waldemar Kafke  
aus Nyтва

Würzburg, Oktober 2011

Referentin: Prof. Dr. med. Claudia Sommer  
Korreferentin: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2012

Der Promovend ist Arzt.

Meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern gewidmet, die mich jederzeit herzlich und selbstlos unterstützt haben.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Definition der small fiber Neuropathie (SFN)	1
1.2 Klinische Einschluss- und Diagnosekriterien für SFN	1
1.3 Klinisches Bild der SFN	2
1.4 Epidemiologie der SFN	3
1.5 Ätiologie der SFN	4
1.6 Pathophysiologie der SFN	4
1.7 Diagnostik der SFN	5
1.7.1 Klinische Untersuchung	5
1.7.2 Neurophysiologische Untersuchungen	5
1.7.3 Funktionstestung der A- $\delta$ - und C-Fasern	5
1.7.4 Messung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD)	6
1.8 Therapie der SFN	7
1.9 Pathophysiologische Grundlagen neuropathischer Schmerzen	8
1.10 Zytokine und Schmerz	8
1.10.1 Eigenschaften von Zytokinen	8
1.10.2 Ausgewählte pro-inflammatorische Zytokine	9
1.10.2.1 Tumor Nekrose Faktor (TNF)	9
1.10.2.2 Interleukin 1 (IL-1)	10
1.10.2.3 Interleukin 2 (IL-2)	10
1.10.2.4 Interleukin 6 (IL-6)	10
1.10.2.5 Interleukin 8 (IL-8)	11
1.10.3 Ausgewählte anti-inflammatorische Zytokine	11
1.10.3.1 Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF $\beta$ )	11
1.10.3.2 Interleukin 4 (IL-4)	11
1.10.3.3 Interleukin 10 (IL-10)	12
1.10.4 Zytokine bei neuropathischem Schmerz - im Tiermodell	12
1.10.5 Zytokine bei neuropathischem Schmerz – beim Menschen	14
1.11 Zielsetzung und Hypothese der Studie	15
1.11.1 Zielsetzung	15
1.11.2 Hypothese	15

<b>2. Patienten, Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Patientenkollektiv	15
2.2 SFN Diagnose	16
2.3 Klinische Untersuchungen	16
2.3.1 Anamnese und neurologische Untersuchung	16
2.3.2 Standardisierte Schmerz- und Depressionsfragebögen	16
2.3.3 Elektroneurographie	17
2.3.4 Quantitativ sensorische Testung (QST)	17
2.3.4.1 Kontrollkollektiv für QST-Messungen	18
2.3.5 Hautstanzbiopsien bei Patienten und freiwilligen Kontrollprobanden	19
2.3.5.1 Kontrollkollektiv für Hautuntersuchungen	19
2.4 Immunhistochemie	19
2.4.1 Immunfluoreszenz mit PGP 9.5	19
2.4.2 Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD)	20
2.4.3 Immunhistochemie zum Nachweis von Entzündungszellen	20
2.5 Blutentnahme für Zytokinbestimmungen	21
2.5.1 Standardlaboruntersuchungen	22
2.5.2 Zytokinbestimmungen	22
2.5.3 Kontrollkollektiv für Blutuntersuchungen	22
2.6 Genexpressionsanalysen aus Blut- und Hautproben	23
2.6.1 RNA Extraktion aus Vollblut	23
2.6.2 RNA Extraktion aus Hautproben	24
2.6.3 Messung der optischen Dichte	24
2.6.4 Reverse Transkriptions PCR bei humanen Blutproben	25
2.6.5 Reverse Transkriptions PCR bei humanen Hautbiopsien	26
2.6.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	27
2.6.6.1 Praktische Durchführung der qRT-PCR	28
2.7 Statistische Auswertung der Daten	29
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1 Klinische Daten	30
3.2 QST-Befund	30
3.3 Hautbiopsiebefunde	31

3.4 Immunhistochemie	33
3.5 Zytokinexpression im Blut	34
3.6 Zytokinexpression in der Haut	36
3.7 Fragebogendaten	37
3.7.1 ADS	37
3.7.2 GCPS	38
3.7.3 McGill	40
3.7.4 NPSI	43
3.8 Korrelationen der Fragebogendaten mit den Zytokinwerten	44
<b>4. Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	45
4.2 Zu den Unterschieden der Untergruppen LD-SFN und NLD-SFN	45
4.3 Zur erhöhten Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in betroffener Haut von Patienten mit LD-SFN	46
4.4 Zur erhöhten Genexpression von IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$ 1 im Blut bei SFN-Patienten	46
4.5 Woher kommen die lokal und systemisch nachgewiesenen Zytokine bei unseren SFN-Patienten?	47
4.5.1 Mögliche lokale Zytokinquellen	47
4.5.2 Mögliche systemische Zytokinquellen	48
4.6 Zum möglichen lokalen Einfluss von Zytokinen auf die Nozizeptoren der Haut	49
4.7 Unterschiedliche Modalitäten von C-Fasern	49
4.8 Klinische Bedeutung unserer Daten	50
4.9 Kritikpunkte und offene Fragen	50
4.10 Ausblick	51
4.11 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen	51
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>6. Tabellarische Übersichten der Patientendaten</b>	<b>67</b>
Tabelle 6.1 Übersicht zum Patientenkollektiv	67
Tabelle 6.2 Übersicht der Patienten mit längenabhängiger SFN	67

Tabelle 6.3 Übersicht der Patienten mit nicht-längenabhängiger SFN	68
Tabelle 6.4 QST-Charakteristika des Patientenkollektivs in Relation zu veröffentlichten Referenzdaten	70
Tabelle 6.5 Inter-individueller Vergleich der relativen Genexpression in Haut	71
Tabelle 6.6 Übersicht der Fragebogendaten	72
Tabelle 6.7 Übersicht über die Daten des GCPS	72
Tabelle 6.8 Übersicht über die Daten des McGill	73
Tabelle 6.9 Übersicht über die Daten des NPSI	74
<b>7. Anhang</b>	<b>75</b>
7.1 Geräte, Materialien und Chemikalien	75
Tabelle 7.1: Geräte und Laborhilfen	75
Tabelle 7.2: Verbrauchsmaterialien	76
Tabelle 7.3: Medikamente	76
Tabelle 7.4: Chemikalien, Puffer und Lösungen für die RNA-Extraktion aus Vollblut	76
Tabelle 7.5: Chemikalien, Puffer und Lösungen für die RNA-Extraktion aus Hautbiopsien	77
Tabelle 7.6: Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie mit PGP 9.5	77
Tabelle 7.7: Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie zum Nachweis von Entzündungszellen	78
Tabelle 7.8: Enzyme, Primer, Puffer und Nukleinsäuren für die Reverse-Transkriptase PCR	78
Tabelle 7.9: Enzyme, Primer, Puffer und Nukleinsäuren für die Real-Time PCR	79
Tabelle 7.10: Verwendete Software	79
7.2 Standardisierte Fragebögen	80
7.2.1 Allgemeine Depressionsskala (ADS)	80
7.2.2 Graded chronic pain scale (GCPS)	81
7.2.3 Kurzform des McGill-Fragebogens	82
7.2.4 Neuropathic pain scale inventory (NPSI)	83
7.3 Abkürzungen	88



# **1. Einleitung**

## **1.1 Definition der small fiber Neuropathie (SFN)**

Unter Polyneuropathien (PNP) versteht man eine Gruppe heterogener Erkrankungen mit verschiedenen Ätiologien und klinischen Ausprägungsformen. Klinisch betreffen sie symmetrisch oder asymmetrisch v.a. die distalen Extremitäten und gehen mit sensiblen, motorischen und autonomen Symptomen einher. Eine PNP kann zudem schmerzhaft oder schmerzlos verlaufen; die Ursache hierfür ist nicht bekannt (Üçeyler und Sommer 2008). Bei Auftreten von neuropathischem Schmerz wird dieser als direkte Folge einer Läsion oder Erkrankung, die das somatosensible System betreffen, definiert (Treede et al. 2008). Als „small fiber Neuropathie“ (SFN) bezeichnet man eine sensible Neuropathie, die ausschließlich bzw. ganz überwiegend dünn-bemerkte A- $\delta$ - und nicht-bemerkte C-Fasern betrifft (Lacomis 2002; Hoitsma et al. 2004; Lauria 2005; Fink und Oaklander 2006; Devigili et al. 2008). Die A- $\delta$ -Fasern übertragen Kältewahrnehmungen und schmerzhafte mechanische Reize. Daneben stellen sie die präganglionären sympathischen und parasympathischen cholinergen Fasern. Die C-Fasern übertragen Wärmewahrnehmungen, schmerzhafte Hitzereize und leichte Berührungsreize und stellen die postganglionären unmyelinisierten autonomen Fasern. Bei sensiblen und autonomen Neuropathien sind diese Fasern meist auch betroffen (Lauria 2005).

Patienten mit einer SFN berichten typischerweise über brennende Schmerzen oder schmerzhafte und unangenehme Missempfindungen (Dysästhesien) in den Füßen bei normalen oder allenfalls geringfügig pathologischen neurologischen und neurophysiologischen Untersuchungsbefunden (Stewart et al. 1992). Typischerweise ist die intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) in den betroffenen Hautpartien reduziert (Holland et al. 1998).

## **1.2 Klinische Einschluss- und Diagnosekriterien für eine SFN**

Ein allgemein akzeptierter klinischer Goldstandard für die Diagnosekriterien einer SFN existiert bislang nicht. Diesem am nächsten kommt die Definition, dass die SFN eine sensible Neuropathie ist, die mit Schmerzen und Dysästhesien einhergeht und abnorme Befunde der Funktion dünn- und nicht-bemerkter Nervenfasern in einer neurologischen, elektrophysiologischen oder histologischen Untersuchung zeigt. Dabei wird von einer möglichen SFN gesprochen, wenn eines der Kriterien vorhanden ist, von einer wahrscheinlichen SFN, wenn zwei Kriterien zutreffen und

von einer gesicherten SFN, wenn alle drei Kriterien zutreffen (Lacomis 2002). Eine SFN liegt nicht vor, wenn Hinweise auf die Beteiligung dick-bemerkter Fasern vorliegen, wie eingeschränkter Lagesinn an den Zehen, vermindertes Vibrationsempfinden an oder über den Knöcheln, Muskelatrophien oder Lähmungen, Areflexie oder pathologische elektrophysiologische Befunde (Stewart et al. 1992). Neuere Kriterien fordern für die Diagnose einer SFN mindestens zwei der aufgeführten Kriterien: klinische Hinweise auf eine Beeinträchtigung von dünn- und nicht-bemerkten Nervenfasern, wie Hypalgesie und Thermhypästhesie, Allodynie und/oder Hyperalgesie; pathologische Befunde der Warm- und Kaltempfindungsschwellen am Fuß in der quantitativ sensorischen Testung (QST); eine am distalen Unterschenkel reduzierte intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) und keine pathologischen Befunde der peripheren motorischen und sensiblen Neurographien (Devigili et al. 2008).

### **1.3 Klinisches Bild der SFN**

Das klinische Bild der SFN ist geprägt vom neuropathischen Schmerz. Die Patienten berichten zumeist über sensible Plusssymptome, wie brennende, scharfe, einschießende oder kribbelnde Missempfindungen und Schmerzen in den Füßen. Sie können auch sensible Negativsymptome wie Taubheitsgefühl, Kälte- und Engegefühl äußern (Stewart et al. 1992; Holland et al. 1998; Lacomis 2002; Hoitsma et al. 2004). Die Schmerzen und Missempfindungen können sich in der Nacht verschlimmern und stören dann oft den Schlaf (Lacomis 2002; Lauria 2005). Die Positivsymptome sind häufig symmetrisch und zeigen typischerweise eine längenabhängige Verteilung, d.h. die Beschwerden beginnen an den Füßen und breiten sich nach proximal aus (Holland et al. 1998; Lauria 2005).

Bei SFN-Patienten können gleichzeitig zu den sensiblen Beschwerden auch Störungen des autonomen Nervensystems vorliegen. Diese Störungen umfassen atem- und belastungsabhängige Herzfrequenzschwankungen im Sinne einer Herzfrequenzstarre (Stewart et al. 1992), Gesichterröten, Hypo- und Hyperhidrose (Novak et al. 2001; Devigili et al. 2008), orthostatische Hypertension und Impotenz (Novak et al. 2001).

Zum zeitlichen Verlauf der SFN existieren bislang nur wenige Studien. So wurde in einer Arbeit eine Progression von einer SFN zu einer Neuropathie mit Beteiligung der großen Fasern beschrieben (Periquet et al. 1999). Detaillierte Daten wurden in einer

prospektiven Studie erhoben. Dabei zeigten 10,9% der 46 über einen Zeitraum von etwa zwei Jahren untersuchten Patienten mit SFN eine spontane Remission, bei 45,6% gab es keine Veränderungen zu den Voruntersuchungen und bei 30,4% der Patienten verschlimmerten sich die Schmerzen (Devigili et al. 2008).

In der Literatur sind auch Fälle von SFN beschrieben, die nicht die typische längenabhängige Verteilung der Beschwerden aufweisen. Zwei Studien berichten über eine akut einsetzende, nicht längenabhängige SFN mit neuropathischen Schmerzen, die generalisiert auftritt oder überwiegend proximale Bereiche der Extremitäten, das Gesicht und den Stamm betrifft (Holland et al. 1998; Gorson et al. 2008). Eine trigeminale Form der SFN wurde ebenfalls beschrieben (Lauria et al. 2005). Die Patienten klagen dabei über persistierende Brennschmerzen im Bereich der vorderen zwei Drittel der Zunge.

#### **1.4 Epidemiologie der SFN**

Es existieren bisher keine epidemiologischen Studien zur SFN. Allerdings gibt es epidemiologische Daten zur schmerzhaften diabetischen Neuropathie, aus denen hervorgeht, dass 11 bis 26% der Diabetiker an einer schmerzhaften Neuropathie leiden (Sadosky et al. 2008). Diabetes mellitus (DM) ist eine der Hauptursachen für eine SFN. Weiterhin gibt es Studien in denen Patientenkollektive mit sensiblen Neuropathien untersucht wurden. Die Angaben dieser Studien zur Häufigkeit der SFN sind uneinheitlich. Periquet et al. untersuchten 117 Patienten mit einer schmerzhaften sensiblen Neuropathie, wovon 44 Patienten (38%) eine SFN hatten (Periquet et al. 1999). Bei Wolfe et al. hatten von 93 untersuchten Patienten mit einer sensiblen Polyneuropathie zwei Patienten eine ausschließliche Beteiligung der kleinen Fasern (Wolfe et al. 1999). Von 45 Patienten, die in einer weiteren Studie untersucht wurden, hatten fünf (11%) (Lefaucheur und Creange 2004) eine SFN, während in einer anderen Studie von insgesamt 124 Patienten 67 (54%) eine SFN hatten (Devigili et al. 2008). Die Schwankungsbreite dieser Studienergebnisse erklärt sich aus den unterschiedlichen Selektionen der Patientenkollektive. So wurden bei Studien mit relativ niedrigen SFN-Prävalenzen zum einen Patienten mit manifesten pathologischen elektrophysiologischen und elektromyographischen Auffälligkeiten eingeschlossen (Wolfe et al. 1999) oder es wurden in den Einschlusskriterien Areflexie oder Ataxie als mögliche Hinweise auf die Beteiligung der dick-bemerkten Fasern zugelassen (Lefaucheur und Creange 2004). In den Studien mit relativ hohen

SFN-Prävalenzen hingegen erfolgte eine genauere Trennung zwischen elektrophysiologischen und klinischen Aspekten, die für oder gegen eine Beteiligung der dick-bemerkten Fasern sprechen (Periquet et al. 1999; Devigili et al. 2008).

### **1.5 Ätiologie der SFN**

In Studien, die unselektierte Patientenkollektive mit sensiblen Neuropathien untersuchten, wurde gezeigt, dass DM und eine verminderte Glukosetoleranz (Impaired glucose tolerance, IGT) Hauptursachen einer SFN sind (Periquet et al. 1999; Devigili et al. 2008; Vlckova-Moravcova et al. 2008; Bednarik et al. 2009). Daneben gibt es zahlreiche weitere Ursachen der SFN, wie z.B. HIV–Infektion (Polydefkis et al. 2002), Medikamente wie Metronidazol (Bradley et al. 1977) oder Statine (Lo et al. 2003), Alkoholmissbrauch (Koike et al. 2001) und Autoimmunerkrankungen, wie z.B. systemischer Lupus erythematodes (SLE) (Goransson et al. 2006), Sjögren-Syndrom (Chai et al. 2005) und Zöliakie (Chin und Latov 2005). Die SFN ist auch ein Hauptsymptom beim M. Fabry – einer x-chromosomal vererbten lysosomalen Speicherkrankheit (Dutsch et al. 2002) und bei Hypothyreose (Orstavik et al. 2006).

Bei einem Teil der Patienten mit einer gesicherten SFN kann keine Ursache festgestellt werden. Diese Fälle werden als idiopathisch eingestuft (Periquet et al. 1999; Devigili et al. 2008). Allerdings konnte in einer Studie ein Patientenkollektiv mit einer gesicherten SFN über einen Zeitverlauf von etwa zwei Jahren untersucht werden. Dabei konnte bei 25% der Patienten mit einer initial als idiopathisch eingestuften SFN im Verlauf eine ätiologische Zuordnung erfolgen. Dabei konnte man bei 14,3% einen DM, bei 7% eine IGT und bei einem der Patienten ein Sjögren-Syndrom sichern (Devigili et al. 2008).

### **1.6 Pathophysiologie der SFN**

Genauso wie die Ätiologie der SFN sehr heterogen ist, sind auch die pathophysiologischen Vorgänge bei ihrer Entstehung weitestgehend ungeklärt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass dünn- und nicht-bemerkte Nervenfasern empfindlicher auf eine lokale Ischämie reagieren als dick-bemerkte Nervenfasern (Parry und Brown 1982). Zusätzlich wurde auch nachgewiesen, dass es beim DM (Sorensen et al. 2006) und bei Sarkoidose (Hoitsma et al. 2002) zu einer Beeinträchtigung dieser Fasern kommt. Dabei gibt es Hinweise darauf, dass bei

diesen Erkrankungen die kleinen Fasern durch oxidativen Stress geschädigt werden könnten (Manzella et al. 2001; Rothkrantz-Kos et al. 2002). Zudem existieren Daten, die Hinweise auf eine Beeinträchtigung des axonalen Zytoskeletts und der axonalen Transportmechanismen bei der diabetischen (Medori et al. 1988; McLean 1997) und alkoholinduzierten Neuropathie (Koike und Sobue 2006) mit überwiegender Beteiligung der dünn- und nicht-bemerkten Nervenfasern liefern.

Daneben wird auch eine Rolle der pro-inflammatorischen Zytokine bei der Entstehung des neuropathischen Schmerzes bei der SFN angenommen. Die pro-inflammatorischen Zytokine könnten dabei in ihrem Einflussbereich die Erregbarkeit der Nozizeptoren steigern (Marchand et al. 2005; Üçeyler und Sommer 2008).

## **1.7 Diagnostik der SFN**

### **1.7.1 Klinische Untersuchung**

Die Sensitivität der neurologischen Untersuchung für die Diagnose einer SFN liegt bei 62,6% und die Spezifität bei 46% (Devigili et al. 2008). Typisch sind eine Thermhypästhesie und eine Hypalgesie. Das Vibrationsempfinden, die Tiefensensibilität und der Lagesinn sind meist erhalten oder nur geringfügig gestört (Lacomis 2002). Die klinische Untersuchung zeigt keine Beeinträchtigung des motorischen Systems.

### **1.7.2 Neurophysiologische Untersuchungen**

Bei den neurophysiologischen Untersuchungen von motorischen und sensiblen Nerven finden sich in der Regel unauffällige bis marginal pathologische Befunde bei Patienten mit einer reinen SFN (Seneviratne und Gunasekera 2002).

### **1.7.3 Funktionstestung der A $\delta$ - und C-Fasern**

Um eine funktionelle Beeinträchtigung der A $\delta$ - und C-Fasern zu beurteilen, können spezielle Tests herangezogen werden, die die Funktionen dieser Fasern erfassen. Dazu gehört u.a. die quantitativ sensorische Testung (QST) (Magda et al. 2002; Shukla et al. 2005; Devigili et al. 2008) und Testungen der Funktionen des autonomen Nervensystems (Stewart et al. 1992; Novak et al. 2001; Hoitsma et al. 2004; Devigili et al. 2008).

Die QST besteht aus 13 psychophysischen Tests, die zur quantitativen Untersuchung der Funktionen der A $\delta$ - und C-Fasern geeignet sind (Chong und Cros

2004). Mit ihr lassen sich thermische und mechanische Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen quantifizieren. Patienten mit einer SFN zeigen bei der QST typischerweise erhöhte Schwellen für Warm- und Kaltempfindungen als Funktion der kleinen Fasern (Magda et al. 2002; Shukla et al. 2005; Devigili et al. 2008). Die Angaben zur Sensitivität der QST bei der Diagnose einer SFN schwanken in der Literatur zwischen 36 bis 85% (Nebuchennykh et al. 2009). Beispielsweise betrug in der Arbeit von Devigili et al. die Sensitivität 56,7% und die Spezifität 36,5% (Devigili et al. 2008).

Ebenfalls kommt die Messung evozierter Potentiale bei der Beurteilung der kleinen Fasern zum Einsatz. Hierbei werden wiederholt definierte schmerzhaft Reize, wie z.B. durch Infrarotlaser (Dotson 1997), Hitze (Chen et al. 2001; Valeriani et al. 2002) oder elektrischen Strom (Mueller et al. 2010), auf die Haut appliziert und die evozierten Potentiale mittels in die Kopfhaut eingebrachter Elektroden über dem sensorischen Cortex abgeleitet.

Bei der Laser Doppler Flowmetry (LDF) wird entsprechend dem Doppler-Effekt die Frequenzverschiebung des auf die Haut gerichteten Laserssignals durch die in den Hautkapillaren strömenden Erythrozyten gemessen. Dabei wird die Hautdurchblutung standardisierter Hautareale nach definierten Reizen, wie z.B. elektrische Stimuli (Hilz et al. 2000) und Kälte (Bornmyr et al. 1998), bestimmt.

Um die autonome Funktion der intraepidermalen Nervenfasern zu untersuchen, stehen z.B. die Messung der sympathischen Hautantwort (sympathetic skin response, SSR) (Sandroni und Low 2001; Low 2004) oder der quantitative sudomotorische Axonreflex (QSART) zur Verfügung (Stewart et al. 1992; Novak et al. 2001). Eine weitere Methode das autonome Nervensystem zu testen ist die Analyse der Herzfrequenzvarianz während tiefer Atemzüge oder eines Valsalva-Maneuvers. Dabei kommt es bei Vorliegen einer autonomen Dysfunktion zu einer verminderten Schwankung der Herzfrequenz während des Tests (Stewart et al. 1992; Novak et al. 2001).

#### **1.7.4 Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD)**

Die Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) ist eine wichtige Komponente bei der Diagnostik der SFN (Lauria 2005). Dies ist ein objektives Verfahren bei dem die intraepidermalen Fasern mittels des panaxonalen Markers protein gene product 9.5 (PGP 9.5) immunzytochemisch angefärbt und entweder

mittels eines Lichtmikroskops oder mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert werden (Lauria et al. 2005; Sommer und Lauria 2007). Devigili et al. geben für die Messung der IENFD bei der Diagnostik von SFN eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 88,8% an (Devigili et al. 2008). Bei einer anderen Patientengruppe mit einer schmerzhaften Neuropathie betrug die Sensitivität der IENFD-Bestimmung 80% und die Spezifität 82% (Vlčková-Moravcová et al. 2008).

### **1.8 Therapie der SFN**

Es existieren bislang wenige spezifische Therapiestudien zur Behandlung der SFN. Grundsätzlich beinhaltet die Therapie neuropathischer Schmerzen einen kausalen und einen symptomatischen Ansatz (Al-Shekhlee et al. 2002). Bezüglich einer symptomatischen Therapie konnte gezeigt werden, dass bei der SFN Gabapentin und Tramadol (Ho et al. 2009) wirksam war. Als kausal wirksam zeigte sich oral verabreichtes Prednison bei einer akut aufgetretenen SFN (Dabby et al. 2006).

Die Ätiologie der SFN ist vielfältig und oft unbekannt (Periquet et al. 1999; Devigili et al. 2008). Darum existieren nur in wenigen Fällen mit bekannter Ursache, wie z.B. beim DM durch optimale Blutzuckerkontrolle (Al-Shekhlee et al. 2002; Lauria 2005) oder bei alkoholischer Neuropathie durch Alkoholkarenz (Al-Shekhlee et al. 2002) kurative/kausale Therapieansätze.

In den meisten anderen Fällen bleibt die symptomatische Therapie mit dem Ziel der Linderung der sensiblen Plusssymptome (Al-Shekhlee et al. 2002; Namaka et al. 2004; Lauria 2005). Die größte Erfahrung gibt es bei der symptomatischen Behandlung der schmerzhaften diabetischen Neuropathie (Hoitsma et al. 2004). Mit Ausnahme der HIV-induzierten Neuropathie, scheint es keine Unterschiede zwischen der Behandlung der schmerzhaften diabetischen Neuropathie und anderen sensiblen Neuropathien zu geben. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtung könnte man annehmen, dass die Ergebnisse der Therapiestudien zur schmerzhaften diabetischen Neuropathie auf andere Neuropathien, und damit auch auf die SFN, übertragbar sein könnten (Hoitsma et al. 2004).

Die dabei zum Einsatz kommenden Substanzen umfassen Antidepressiva, wie z.B. Amitriptylin (Max et al. 1987) und Duloxetin (Raskin et al. 2006), Antikonvulsiva, wie z.B. Gabapentin (Backonja et al. 1998) und Pregabalin (Richter et al. 2005; Freeman et al. 2008) und Opioide, wie z.B. Tramadol (Harati et al. 1998) und Oxycodon (Gimbel et al. 2003).

Die Therapie neuropathischer Schmerzen ist schwierig und bleibt für den Patienten oftmals unbefriedigend (Hoitsma et al. 2004; Zin et al. 2008), da auch bei optimaler Therapie Ansprechraten von nur 50 bis 60% erreicht werden (Zin et al. 2008).

## **1.9 Pathophysiologische Grundlagen neuropathischer Schmerzen**

Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen spielt sowohl das periphere als auch das zentrale Nervensystem eine Rolle. Es gibt auch Hinweise auf die Beteiligung immunologischer Mechanismen.

Auf peripherer Ebene spielt unter anderem die Spontanaktivität verletzter und unverletzter Axone eine Rolle. Darüber hinaus beeinflussen pro-inflammatorische Zytokine, Katecholamine und Wachstumsfaktoren die ektopische Aktivität und Überempfindlichkeit von peripheren Axonen. Auch ein hereditärer Defekt eines Natriumkanals spielt bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen auf der Ebene eines peripheren Axons eine Rolle (Campbell und Meyer 2006; Baron et al. 2010).

Bei den zentralen Mechanismen der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen spielen Veränderungen auf präsynaptischer, postsynaptischer und interneuronaler Ebene, sowie Veränderungen deszendierender inhibitorischer Regelkreise und immunologischer Mechanismen eine Rolle (Campbell und Meyer 2006; Baron et al. 2010).

### **1.10 Zytokine und Schmerz**

Die Bedeutung von Zytokinen bei der Schmerzentstehung und -aufrechterhaltung wird durch zahlreiche tierexperimentelle und klinische Studien untermauert. Pro- und anti-inflammatorische Zytokine spielen im nozizeptiven System sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem eine Rolle (Üçeyler und Sommer 2008; Austin und Moalem-Taylor 2010).

#### **1.10.1 Eigenschaften von Zytokinen**

Zytokine sind kleine Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 15 bis 25 kDa und werden nach ihrer Funktion in Interleukine, Chemokine, Interferone und Wachstumsfaktoren unterteilt. Sie werden hauptsächlich von Immunzellen ausgeschüttet und sind Teil der Informationsvermittlung bei Immunreaktionen. Allerdings können sie auch von nicht-Immunzellen ausgeschüttet werden.



Sie entfalten ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen. Als Folge der Rezeptoraktivierung werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und die Genexpression dieser Zellen beeinflusst. Auf diese Weise können Zytokine die Wirkung anderer Zytokine und auch die Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose ihrer Zielzellen mitsteuern.

Durch Pleiotropie ist ein einzelnes Zytokin in der Lage eine Fülle von Zielzellen, die den Rezeptor dafür exprimieren, zu beeinflussen und so auch zahlreiche Effekte auszulösen. Umgekehrt können durch Redundanz verschiedene Zytokine die gleiche Wirkung auf die gleiche Zielzelle haben. Weiterhin können verschiedene Zytokine synergistisch und antagonistisch auf ihre Zielzellen wirken (Heinrich 2007; Üçeyler und Sommer 2008; Schütt 2009).

Die Einteilung der Zytokine nach ihren pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften gliedert sie nach der Zugehörigkeit entweder in Th1- oder Th2-Zytokine mit Überlappung. Bei der Th1-Immunantwort werden als Reaktion auf bakterielle und virale Infektionen pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet, die durch eine zelluläre Immunantwort für den Anstoß einer Entzündung sorgen. Dabei wird neben der Entstehung einer zellvermittelten Immunität, die Entwicklung von zytotoxischen IgG vorangetrieben. Die Th2-Immunantwort soll primär Parasiten abwehren. Dabei initiieren Zytokine eine humorale Immunantwort mit IgE. Zusätzlich besitzen Zytokine der Th2-Immunantwort anti-inflammatorische Eigenschaften (Schütt 2009).

### **1.10.2 Ausgewählte pro-inflammatorische Zytokine**

Aufgelistet sind exemplarisch Zytokine, die in Blutproben, Seren und Hautbiopsien von Patienten dieser Studie gemessen wurden.

#### **1.10.2.1 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF)**

Hauptproduzenten von TNF sind Makrophagen, natürliche Killerzellen, T- und B-Zellen. TNF wirkt über zwei spezifische Rezeptoren TNFR1 (CD120a) und TNFR2 (CD120b). TNF ist an der Organisation von Lymphfollikeln und der Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Weiterhin induziert es die endotheliale Adhäsion und damit auch die Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Locksley et al. 2001). TNF spielt auch eine Rolle bei der Apoptose. Dabei haben die beiden TNF-Rezeptoren eine gegensätzliche Wirkung. Bindet TNF den TNFR1 auf

der Zielzelle, wird die Apoptose dieser Zelle direkt eingeleitet. Wird aber der TNFR2 gebunden, so resultiert daraus eine Aktivierung der Zielzelle und damit Schutz vor Apoptose (Schütt 2009).

#### **1.10.2.2 Interleukin-1 (IL-1)**

IL-1 wird vor allem von Makrophagen, Granulozyten, phagozytierenden Zellen in Leber und Milz, Epithelzellen, wie Keratinozyten, Gingiva- und Synovialzellen produziert. Zusätzlich sind sowohl Astrozyten und die Mikroglia in der Lage dieses Zytokin auszuschütten (Dinarello und Mier 1986). Es entfaltet spezifisch seine Wirkung über seine Rezeptoren CD 121a und CD121b (Schütt 2009). Dabei wirkt es zum einen direkt als Pyrogen (Dinarello und Mier 1986) und zum anderen auch als Induktor der positiven Akut-Phase-Reaktion. Weiterhin spielt IL-1 eine Rolle bei der Aktivierung und der Induktion zur Proliferation von T-Zellen (Dinarello et al. 1986).

#### **1.10.2.3 Interleukin-2 (IL-2)**

IL-2 wird hauptsächlich von aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen gebildet. Daneben sind auch natürliche Killerzellen und dendritische Zellen in der Lage IL-2 nach Stimulation mit mikrobiellen Antigenen zu produzieren (Létourneau et al. 2009). Der IL-2-Rezeptor besteht aus drei Untereinheiten, der  $\alpha$ - (CD25), der  $\beta$ - (CD122) und der  $\gamma$ -Untereinheit (CD 132) (Malek 2008). IL-2 ist an der Differenzierung und Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der T-Zell-Entitäten beteiligt und kontrolliert die Proliferation und das Überleben regulatorischer T-Zellen. Damit ist es ein entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz (Létourneau et al. 2009).

#### **1.10.2.4 Interleukin-6 (IL-6)**

Hauptproduzenten von IL-6 sind T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen (Schütt 2009). Der IL-6-Rezeptor besteht aus zwei Membranproteinen, der  $\alpha$ -Kette (CD 126) und der  $\beta$ -Kette (CD130). Die  $\alpha$ -Kette ist für die Bindung des Liganden und die  $\beta$ -Kette für die Signaltransduktion verantwortlich (Nishimoto et al. 2000). IL-6 hat zahlreiche Funktionen, so induziert es die Akut-Phase-Reaktion in der Leber und ist wie IL-1 als Pyrogen für die Entwicklung von Fieber verantwortlich (Nijsten et al. 1987). Daneben nimmt IL-6 zusammen mit IL-3 auch Einfluss auf die Hämatopoese. Diese Zytokine bewirken den Übergang von der G0- zur G1-Phase der

hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Weiterhin induziert IL-6 im Knochenmark die Reifung der Megakaryozyten und sorgt damit für die vermehrte Verfügbarkeit von Thrombozyten im peripheren Blutbild (Kishimoto et al. 1992).

#### **1.10.2.5 Interleukin-8 (IL-8)**

Das IL-8 gehört zu den Chemokinen. Chemokine sind eine spezielle Unterform der Zytokine, die im Rahmen von Entzündungsvorgängen oder Thrombosen ausgeschüttet werden; sie können u.a. Leukozyten anziehen (Brat et al. 2005; Schütt 2009).

IL-8 kann von vielen Zellen ausgeschüttet werden. Dazu zählen u.a. Monozyten, T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen von Gefäßen und auch Keratinozyten und Fibroblasten der Haut. IL-8 wird nur bei Co-Expression von IL-1, TNF und bakteriellem Lipopolysaccharid gebildet (Harada et al. 1994). CXCR1 und CXCR2 sind zwei homologe Rezeptoren, die IL-8 mit hoher Affinität binden (Brat et al. 2005). Zusätzlich stimuliert IL-8 die Angiogenese (Hu et al. 1993; Brat et al. 2005).

### **1.10.3 Ausgewählte anti-inflammatorische Zytokine**

#### **1.10.3.1 Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF $\beta$ )**

TGF $\beta$  ist Teil einer Superfamilie von mindestens 35 Unterformen bei Vertebraten (Ramos-Mondragon et al. 2008). Es kommt bei Säugern in drei Isoformen vor und kann von den meisten Zellen des Körpers ausgeschüttet werden (Lawrence 2001). Die Effekte des TGF $\beta$  werden über zwei spezifische Rezeptoren (T $\beta$ RI und T $\beta$ RII) vermittelt (Ramos-Mondragon et al. 2008). Die Wirkweise des TGF $\beta$  kann in drei Hauptbereiche eingeteilt werden. Über die Inhibition des Zellzyklus in der späten G1-Phase wird die Zellproliferation gestoppt. Damit spielt es eine große Rolle bei der Regulation von Wachstum und embryonaler Entwicklung. Daneben hat es einen immunsuppressiven Effekt. Darüber hinaus verstärkt TGF $\beta$  die Bildung der extrazellulären Matrix. TGF $\beta$  kann Reparaturprozesse bei der Wundheilung und Entzündungsprozessen initiieren (Lawrence 1996).

#### **1.10.3.2 Interleukin-4 (IL-4)**

IL-4 wird in basophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und CD4<sup>+</sup> Th2-Zellen produziert (Weiss und Brown 2001). Es wirkt über zwei spezifische

Rezeptoren. Der Typ I Rezeptor ist auf hämatopoetischen Zellen nachweisbar und entsteht aus der Interaktion zweier Untereinheiten, der  $\alpha$ -Untereinheit (IL4R $\alpha$  =CD124) und der IL-2  $\gamma$ c-Kette (CD132). Die zweite Untereinheit ist auch Bindungsstelle für andere Zytokine (IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21). Der Typ II Rezeptor von IL-4 ist auf nicht-hämatopoetischen Zellen nachweisbar. Es hat die gleiche  $\alpha$ -Untereinheit, wirkt aber über die Dimerisation mit der IL-13 R  $\alpha$ 1-Untereinheit. Durch diese Eigenschaften können zahlreiche weitere Zytokine mit den IL-4-Rezeptoren interagieren (Sholl-Franco et al. 2009). IL-4 fördert die Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen zu TH2-Zellen. So reguliert IL-4 die Th1-Immunantwort. Zusätzlich induziert IL-4 in B-Zellen den selektiven Immunglobulin-Klassenswitch zu IgG1 und IgE (Weiss und Brown 2001).

### **1.10.3.3 Interleukin-10 (IL-10)**

IL-10 wird hauptsächlich von Th2-, B-Zellen, Mastzellen, dendritischen Zellen, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet (O'Garra und Vieira 2007). Beim Menschen können im Gegensatz zu Nagern neben Th2-Zellen auch Th1-Zellen IL10 produzieren. Zusätzlich kann IL-10 die Funktion sowohl der Th1-, wie auch der Th2-Zellen herunterregulieren (Del Prete et al. 1993). IL-10 wirkt über einen spezifischen Rezeptor; dieser besteht im aktivierten Zustand aus einem Tetramer, das aus jeweils zwei IL-10R1- und zwei IL-10R2-Peptidketten besteht (Donnelly et al. 1999). IL-10 hat anti-inflammatorische Eigenschaften. Dies wird über mehrere Mechanismen vermittelt. Es inhibiert die Antigenpräsentation und die Expression der MHCII-Moleküle. Zusätzlich blockiert es die Differenzierung von dendritischen Zellen aus monozytären Vorläufern. Zudem unterbindet IL-10 die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Mosser und Zhang 2008).

### **1.10.4 Zytokinregulation bei neuropathischem Schmerz – im Tiermodell**

Dass Zytokine bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Schmerzen eine entscheidende Rolle spielen, konnte tierexperimentell gut belegt werden. Beispielsweise kommt es nach einer Nervenläsion durch Ligation des N. ischiadicus (chronic constriction injury, CCI) (Bennett und Xie 1988) bereits in der ersten Stunde nach Läsion zu einem deutlichen Anstieg der lokalen pro-inflammatorischen Zytokinexpression parallel zu schmerz-assoziiertem Verhalten (Okamoto et al. 2001; Al-Shatti et al. 2005; Üçeyler et al. 2008). Zusätzlich zu den lokalen Auswirkungen

der peripheren Nervenschädigung werden auch Effekte im ZNS beobachtet. Auf der Ebene des Rückenmarkes wurden nach CCI (DeLeo et al. 1997; Lee et al. 2004), Crush-Läsionen (Ohtori et al. 2004) oder spinal nerve ligation (SNL) (Arruda et al. 1998; Kim et al. 2007) entweder eine erhöhte Expression oder Immunreaktivität für pro-inflammatorische Zytokine nachgewiesen. Bei der Crush-Läsion wird der N. ischiadicus und N. tibialis aufgesucht und mit einer Pinzette für maximal 30 Sekunden komprimiert (De Koning et al. 1986). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass es bei transgenen Mäusen mit einer astrozytären Überexpression von TNF im Vergleich zu Wildtypmäusen zu einer ausgeprägteren Allodynie nach Transsektion eines Spinalnerven kommt (DeLeo et al. 2000). Die direkte intraneurale Injektion von physiologischen Mengen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 $\beta$  ruft ebenfalls Schmerz-assoziiertes Verhalten bei den Versuchstieren hervor (Wagner und Myers 1996; Zelenka et al. 2005). Ähnlich wie bei der direkten intraneuralen Injektion beobachtete man auch nach intrathekaler Mikroinjektion von IL-1 Anzeichen für Hyperalgesie bei den Versuchstieren (Oka et al. 1993).

Die Behandlung mit Zytokininhibitoren und anti-inflammatorischen Zytokinen kann umgekehrt Schmerzverhalten bei Versuchstieren nach peripheren Nervenverletzungen reduzieren.

Die systemische Gabe von Thalidomid, das u.a. die Halbwertszeit von TNF durch Abbau von dessen mRNA verstärkt (Klausner et al. 1996), bewirkte bei Ratten nach CCI eine deutliche Reduktion des Schmerzverhaltens. Allerdings hatte Thalidomid nur dann einen Effekt, wenn es vor Entstehung der Hyperalgesie verabreicht wurde (Sommer et al. 1998). Das rekombinante TNF-Rezeptor-Fusionsprotein Etanercept, das kompetitiv den TNF-Rezeptor inhibiert, zeigte bei Mäusen nach CCI ähnliche Wirkung wie Thalidomid (Sommer et al. 2001). Eine Reduktion des Schmerzverhaltens bei Mäusen nach CCI konnte auch durch die systemische Gabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-1-Rezeptoren erreicht werden (Sommer et al. 1999).

Die lokale Behandlung mit den anti-inflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-10 oder IL-13 vor intraplantarer und intraartikulärer Injektion von Zymosan erbrachte eine Schmerzreduktion bei Mäusen und Ratten (Vale et al. 2003). Auch die direkte intrathekale Injektion von IL-10 führte zu einer Verminderung von Allodynie und Hyperalgesie bei Versuchstieren nach CCI (Milligan et al. 2005). Ein weiterer Ansatz ist der gentherapeutische Einsatz von anti-inflammatorischen Zytokinen zur

Schmerzreduktion. Beispielsweise wurden apathogene Adenoviren durch intrathekale Injektion als Vektoren dazu genutzt, um Gensequenzen von IL-10 in die spinale Mikroglia und in Astrozyten von Ratten einzuschleusen (Milligan et al. 2005). Eine andere Gruppe nutzte Herpes-simplex Viren als Vektoren zur Einschleusung einer Gensequenz von IL-4 in Neurone der Spinalganglien von Rattenembryos (Hao et al. 2006). Diese Gensequenzen standen unter der Kontrolle viraler Promotoren und führten zu einer verstärkten Expression dieser anti-inflammatorischen Gene mit nachfolgender Reduktion von Schmerzverhalten bei Versuchstieren nach CCI und SNL. Nackte Plasmid-DNA, die für IL-10 kodiert, führte nach intrathekaler Applikation zu einer erhöhten Expression von IL-10 und zu einer Verminderung des Schmerzverhaltens bei Versuchstieren nach CCI (Milligan et al. 2006; Soderquist et al. 2010).

#### **1.10.5 Zytokinregulation bei neuropathischen Schmerzsyndromen – beim Menschen**

Es existieren zahlreiche Arbeiten, die die Rolle der Zytokine bei neuropathischen Erkrankungen auf lokaler und systemischer Ebene beleuchten. Ein Beispiel hierfür ist eine Studie, bei der eine erhöhte Genexpression und erhöhte Serumproteinspiegel von IL-2 und TNF bei Patienten mit schmerzhafter Neuropathie im Vergleich zu gesunden Kontrollen einerseits und zu Patienten mit nicht-schmerzhafter Neuropathie andererseits nachgewiesen wurde. Die gleiche Studie wies auch nach, dass die Proteinspiegel von IL-4 bei Patienten mit schmerzloser PNP im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich erhöht waren (Üçeyler et al. 2007).

Beim komplexen regionalen Schmerzsyndrom (CRPS) konnte gezeigt werden, dass in der lokal an der betroffenen Extremität gewonnenen Flüssigkeit aus künstlich herbeigeführten Hautblasen (blister fluid) mehr IL-6 und TNF nachweisbar ist als an der nicht betroffenen Extremität (Huygen et al. 2002). Eine weitere Studie konnte im Liquor bei Patienten mit CRPS einen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhten Spiegel von IL-1 $\beta$  und IL-6 nachweisen (Alexander et al. 2005). Eine andere Gruppe fand erhöhte Spiegel des löslichen TNF-Rezeptors im Serum (Maihofner et al. 2005). In einer weiteren Studie wurde eine erhöhte Expression von IL-8 und TNF im Serum betroffener Patienten nachgewiesen, während die Expression der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 im Serum erniedrigt war (Üçeyler et al. 2007).

Im Serum von Patienten mit Fibromyalgie-Syndrom (FMS) wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte pro-inflammatorische Zytokine gemessen (Wallace et al. 2001; Gur et al. 2002). In einer weiteren Studie wurde bei FMS-Patienten eine reduzierte Gen- und Proteinexpression der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 nachgewiesen (Üçeyler et al. 2006).

### **1.11 Zielsetzung und Hypothese der Studie**

In der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten, die einen möglichen Einfluss von Zytokinen bei der Entstehung neuropathischer Syndrome, wie z.B. schmerzhafter PNPs und CRPS untersucht haben (siehe Abschnitt 1.10.5). Da für die SFN bislang keine vergleichbaren Studien existieren haben wir hier die systemischen und lokalen Zytokinprofile von Patienten mit SFN mittels quantitativer Genexpressionsanalyse untersucht.

#### **1.11.1 Zielsetzung**

- Systematische und prospektive Rekrutierung von Patienten mit SFN im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden.
- Untersuchung von lokalen und systemischen Expressionsprofilen pro- und antiinflammatorischer Zytokine als mögliche Ursache von Schmerz.

#### **1.11.2 Hypothese**

Patienten mit SFN haben lokal und systemisch eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer und algetischer Zytokine.

## **2. Patienten, Material und Methoden**

Im Anhang sind in den Tabellen 7.1, 7.2, 7.3 und 7.10 die verwendeten Geräte, Materialien, Medikamente und die verwendete Software aufgelistet.

### **2.1 Patientenkollektiv**

Es wurden insgesamt 24 Patienten mit SFN (10 Frauen, 14 Männer) in die Studie eingeschlossen. Der Altersmedian betrug 53 Jahre (von 34 bis 76 Jahre). Alle Patienten wurden prospektiv zwischen 2005 und 2008 an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg rekrutiert, wo sie sich stationär oder ambulant zur

Diagnostik und Behandlung vorstellten. Alle Studienteilnehmer wurden schriftlich und mündlich über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg befürwortet.

## **2.2 SFN Diagnose**

Die Diagnose der SFN wurde nach den diagnostischen Kriterien von Lacomis gestellt (Lacomis 2002). Eine sichere SFN wurde diagnostiziert, wenn eine Beeinträchtigung der kleinen Fasern klinisch, in der QST und hautbioptisch nachweisbar war. Eine wahrscheinliche SFN lag vor, wenn nur zwei dieser drei Kriterien erfüllt waren und eine mögliche SFN wenn nur ein Kriterium erfüllt war (Lacomis 2002; Devigili et al. 2008).

## **2.3 Klinische Untersuchungen**

### **2.3.1 Anamnese und neurologische Untersuchung**

Alle Patienten wurden detailliert anamnestiziert und unterzogen sich einer vollständigen neurologischen Untersuchung.

### **2.3.2 Standardisierte Schmerz- und Depressionsfragebögen**

Alle Studienteilnehmer wurden mittels standardisierter Schmerz- und Depressionsfragebögen untersucht. Bei den Fragebögen handelte es sich um die Kurzform des McGill-Fragebogens, die deutsche Form des Neuropathic pain scale inventory (NPSI), Graded chronic pain scale (GCPS) und die Allgemeine Depressionsskala (ADS). Diese sind einzeln aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang unter 7.2 gesondert aufgeführt. Die Kurzform des McGill-Fragebogens erfragt sinnes- und gefühlsbezogene (affektive) und bewertende (deskriptive) Aspekte von subjektiven Schmerzempfindungen und bezieht diese auf eine sich steigernde Intensitätsskala. Damit ist es möglich verschiedenartige Schmerzen in ihren Qualitäten und ihrer Stärke quantitativ zu erfassen und so beispielsweise als Erfolgs- und Verlaufskontrolle für Therapieansätze zu nutzen (Melzack 1987). Der NPSI umfasst Fragen nach Spontanschmerzen, Schmerzattacken, evozierten Schmerzen und Gefühlsstörungen. Dabei werden die einzelnen Schmerzqualitäten je nach Intensität einer Skala von 0 bis 10 zugeordnet (Sommer et al. 2011). Der GCPS erfasst die Schmerzen in einem zeitlichen Verlauf von aktuell bis rückwirkend der vergangenen vier Wochen und erfragt in welchem Maße die Schmerzen die täglichen



Aktivitäten, die Freizeitaktivitäten und die Arbeitsfähigkeit eingeschränkt haben. Dabei wird der Schweregrad einer Skala von 0 bis 10 zugeordnet (Von Korff et al. 1992). Es bestehen Zusammenhänge zwischen Schmerzsyndromen und Depression (Wise et al. 2007). Deshalb wurde zur Erfassung möglicher depressiver Symptome der Patienten die ADS verwendet. Dabei wird das Vorhandensein von depressiven Stimmungslagen, negativen Denkmustern, körperlichen Beschwerden und motorischen Hemmungen innerhalb der vergangenen sieben Tage erfasst und einer Häufigkeitsskala zugeordnet (Hautzinger 1993).

### **2.3.3 Elektroneurographie**

Zum Ausschluss einer Beteiligung großer Fasern im Rahmen einer möglichen begleitenden Polyneuropathie wurde bei jedem Patienten jeweils ein motorischer (N. tibialis) und ein sensibler Nerv (N. suralis) elektrophysiologisch untersucht. Die Messungen erfolgten nach standardisierten Verfahren (Kimura 2001). Die Labor-internen Normwerte sind hierbei: für den N. tibialis eine Reizantwortamplitude von  $\geq 10$  mV und eine Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) von  $\geq 40$  m/s; für den N. suralis eine Reizantwortamplitude von  $\geq 10$   $\mu$ V (bei Alter > 65 Jahre: 5  $\mu$ V) und eine NLG von  $\geq 40$  m/s.

### **2.3.4 Quantitativ sensorische Testung (QST)**

Bei der QST wurden beim gleichen Patienten am Fußrücken (betroffenes Hautareal) im Vergleich zum Gesicht (nicht betroffenes Hautareal) Schwellenwerte für die Empfindung mechanischer, thermischer und vibrierender Reize bestimmt. Die dabei erhobenen Werte umfassten die Wärme- und Kälteempfindungsschwelle (warm-/cold detection threshold = WDT/CDT), die Empfindungsschwelle für alternierende Wärme- und Kältereize (thermal sensory limen, TSL), die Schwelle für schmerzhafte Hitze- und Wärmeempfindung (cold/heat pain threshold, CPT/HPT), die Schwelle für taktile Reize (mechanical detection threshold, MDT), die Schwelle für schmerzhafte mechanische Reize (mechanical pain detection threshold, MPT), die Empfindlichkeit für schmerzhafte mechanische Reize (mechanical pain sensitivity, MPS), Allodynie (dynamic mechanical allodynia, DMA), wind-up ratio (WUR), Pallästhesie (vibration detection threshold, VDT) und die Empfindungsschwelle für schmerzhaften lokalen Druck (pressure pain threshold, PPT).

Diese Sinnesmodalitäten spiegeln die Funktionen der dünn- bzw. unbemerkten (Temperatur und Schmerz) und der dickbemerkten Nervenfasern (Oberflächensensibilität) wider. Die Messungen erfolgten mit einem standardisierten QST-Gerät (Somedic AB, Stockholm, Schweden) nach dem Protokoll des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerz (DFNS) (Rolke et al. 2006).

Die Auswertung erfolgte durch die Erstellung eines Z-scores. Dabei dienten die Detektionsschwellen des Kontrollkollektivs als Normalwerte (Nulllinie). Die jeweiligen Detektionsschwellen der Patienten wurden anschließend diesen Normalwerten zugeordnet.

#### **2.3.4.1 Kontrollkollektiv für QST-Messungen**

Die Ergebnisse der Patientenmessungen wurden mit den Ergebnissen eines alters- und geschlechtsadaptierten Kontrollkollektivs verglichen. Die Probanden setzten sich aus Mitarbeitern der Neurologischen Universitätsklinik, sowie der Patienten der Universitäts-Augenklinik Würzburg zusammen. Die Kontrollprobanden von den Stationen der Augenklinik waren alle entweder zur Kontrolle eines erhöhten Augeninnendrucks oder wegen einer bevorstehenden Kataraktoperation stationär in der Klinik. Es wurden 21 Kontrollprobanden für die QST-Untersuchung rekrutiert (10 Frauen, 11 Männer). Der Altersmedian betrug 53 Jahre (von 33 bis 72 Jahre). Dabei wurde distal der rechte oder linke Fußrücken und die rechte oder linke Gesichtshälfte gemessen. Welche Areale gemessen wurden, war von der Verteilung der Beschwerden beim Patienten abhängig, dem die jeweiligen Kontrollprobanden alters- und geschlechtsadaptiert zugeordnet wurden.

#### **2.3.5 Hautstanzbiopsien bei Patienten und freiwilligen Kontrollprobanden**

Nach Ausschluss von Kontraindikationen, wie z.B. bekannte Wundheilungsstörung, Entzündungen im zu biopsierenden Bereich und nach ausführlicher Aufklärung, erfolgte die Hautstanzbiopsie. Um die Biopsieentnahme weitestgehend zu standardisieren, wurde immer am linken Unterschenkel etwa 10 cm oberhalb des Außenknöchels (betroffenes Areal), sowie an der linken Oberschenkelaußenseite etwa 20 cm unterhalb der Spina iliaca anterior superior (nicht betroffenes Areal) biopsiert. Die Biopsien wurden mittels einer 5 mm Hautstanze (Biopsy Punch 5mm, FA Stiefel, Deutschland) und nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt (Lauria et al. 2005).

Nach Sprühdesinfektion wurde die jeweilige Hautstelle mit 2 ml Scandicain 1% betäubt. Anschließend wurde mittels einer Hautstanze eine ca. 3 mm tiefe Biopsie entnommen. Nach Abtrennung des Hautstückes von der Subcutis mit einem Skalpell wurde das Biopsat in der Mitte geteilt. Eine Hälfte wurde für die Genexpressionsanalyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das andere Stück für die Immunhistochemie in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Biopsate für die Genexpressionsanalyse wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Biopsate für die Immunhistochemie wurden nach der Fixierung in 4% PFA über Nacht am nächsten Tag drei Mal mit 0,15 M Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in 10% Saccharose mindestens über Nacht bei 4°C gelagert. Die Biopsiestellen wurden mittels sterilen Heftpflastern (Leukostrip, Smith&Nephew, Medical Limited, England) und Hautpflastern versorgt.

#### **2.3.5.1 Kontrollkollektiv für Hautuntersuchungen**

Insgesamt wurden 17 gesunde Freiwillige rekrutiert (11 Frauen, 6 Männer). Zwölf von ihnen ließen sich eine distale und weitere fünf sowohl eine distale als auch eine proximale Biopsie entnehmen. Die Probanden setzten sich aus Patienten ohne neuropathische Erkrankungen, Angestellten der Klinik und aus deren Bekannten- und Familienkreis zusammen. Der Altersmedian betrug 39 Jahre (von 23 bis 71 Jahre).

### **2.4 Immunhistochemie**

#### **2.4.1 Immunfluoreszenz mit PGP 9.5**

Nach der Inkubation in 10% Saccharose über Nacht wurde das Biopsat in Tissue Tek (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und in, durch flüssigen Stickstoff gekühltem, 2-Methylbutan eingefroren. Mittels eines gekühlten Mikrotoms (CM 3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden bei -20°C von jeder Patientenprobe drei 40 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger übertragen und bei Raumtemperatur für 30 Minuten luftgetrocknet. Danach wurden die Schnitte mit 10% BSA (bovinen Serumalbumin), gelöst in PBS (Phosphat-Buffer-Saline), für 30 Min. bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit Kaninchenantikörpern gegen humanes PGP9.5 (primärer Antikörper, 1:800, UltraClone, England) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte nach dreimaliger Waschung mit PBS die Inkubation der Schnitte für zwei Stunden bei Dunkelheit und

Raumtemperatur mit einem Cyanin 3,18 konjugierten IgG (sekundärer Antikörper, Ziegenantikörper gegen Kaninchen, 1:50, Amersham, USA). Nach der Inkubation wurden die Proben mit DABCO (1,4-Diazabicyclo-Octan) und einem Deckgläschen abgedeckt und mittels VitroClud (R. Lagenbeck, Teningen, Deutschland) versiegelt. Die Lagerung der gefärbten Schnitte erfolgte bei 4°C.

Eine Auflistung der verwendeten Materialien und Reagenzien findet sich in Tabelle 7.6.

#### **2.4.2 Bestimmung der IENFD**

Die Bestimmung der IENFD erfolgte nach veröffentlichten Kriterien (Lauria, Cornblath et al. 2005). Hierzu wurden ein mit einer CCD-Kamera (Visitron Systems, Tuchheim, Germany) ausgerüstetes Mikroskop (Axiophot2, Zeiss, Göttingen, Deutschland) und der Spot Advanced Software (Windows Version 4,5) verwendet. Die Ergebnisse der IENFD wurden mit unseren Labor-internen Normwerten für den distalen Unterschenkel verglichen, die aus Daten von insgesamt 85 gesunden Kontrollprobanden mit einem Altersmedian von 49 Jahren (von 23 bis 86 Jahre) stammten. Demnach beträgt der Normwert  $9 \pm 3$  Fasern/mm.

#### **2.4.3 Immunhistochemie zum Nachweis von Entzündungszellen**

Zum Nachweis von Entzündungszellen wurden von den Hautbiopsaten zunächst 10 µm dünne Schnitte angefertigt. BSA wurde in TRIS-Puffer (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) gelöst und anschließend dazu verwendet die Schnitte bei Raumtemperatur zu blocken. Es wurden primäre Antikörper gegen Makrophagen (CD68, 1:3000, Abcam, Deutschland) und T-Lymphozyten (CD3, 1:200, Abcam, Deutschland) verwendet. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal mit TRIS-Puffer gewaschen und anschließend unter dem Abzug in einer Lösung bestehend aus 200 ml Methanol und 3,5 ml 30% Wasserstoffperoxid für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die erneute dreimalige Waschung mit TRIS-Puffer. Der Sekundärantikörper (biotinyliertes Ziege-anti-Maus IgG, 1:100, Vector laboratories, USA) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert, auf die Schnitte gegeben und für 45 Min. bei Raumtemperatur belassen. Nach erneuter dreimaliger Waschung mit TRIS-Puffer wurde Streptavidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC Kit, Vector laboratories, Burlingame, USA) auf die Schnitte

gegeben und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Streptavidin-Biotin-Komplex wurde hergestellt indem Reagenz A (Avidin) und Reagenz B (biotinylierte Meerrettich Peroxydase H), im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 Min. bei Raumtemperatur vorinkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Verdünnung im Verhältnis 1:50 mit 1% BSA. Im Anschluss an diesen Schritt erfolgte die dreimalige Waschung mit TRIS-Puffer. Anschließend wurde auf die Schnitte DAB-Puffer (3,3-Diaminobezidin-Tetrachlorid-Dihydrat) mittels einer Spritze mit aufgesetztem Filter (Corning, New York, USA) aufgetragen und für 10 Min. bei Raumtemperatur belassen. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schnitte zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und für 45 Sek. mit Hämalaun gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte für zehn Min. unter fließend kaltem Leitungswasser gewässert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 90, 96 und 100%) und mit Tissue clear (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) behandelt. Abschließend erfolgte die Versiegelung der Schnitte mit Tissue Mount (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) und Deckgläschen. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien und Reagenzien findet sich in Tabelle 7.7.

## **2.5 Blutentnahme für Zytokinbestimmungen**

Da die systemische Zytokinexpression durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden kann (Pedersen und Toft 2000; Kovacs und Messingham 2002), erfolgte die Gewinnung und Asservierung der Proben unter standardisierten Bedingungen. So wurde, um Einflüsse der zirkadianen Zytokinexpression auf die Messungen so gering wie möglich zu halten, die Blutabnahme morgens nüchtern zwischen 8 und 10 Uhr durchgeführt. Für die Zytokinmessungen wurde Blut in zwei Serum- und zwei EDTA-Monovetten entnommen.

Die Blutröhrchen wurden nach der Entnahme sofort auf Eis gelagert. Die Aliquotierung des EDTA-Blutes und des Serums erfolgte innerhalb von 15 Min. nach der Blutentnahme. Dazu wurden 2 ml Caps verwendet und mit jeweils 500 µl EDTA-Blut gefüllt. Die Serumröhrchen wurden für 5 min. bei 5000 U/min und Raumtemperatur mit der Zentrifuge (Rotixa/P, FA Hettich, Deutschland) zentrifugiert. Das Serum wurde à 500 µl aliquotiert. Die Blut- und Serumproben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die verwendeten Materialien und Reagenzien sind in Tabelle 7.4 aufgeführt.

### **2.5.1 Standard Laboruntersuchungen**

Die Laboruntersuchungen umfassten Elektrolyte, Leber- und Nierenwerte, CRP, BSG, Cholesterin- und Triglyzeridspiegel, TSH, HbA1c, Nüchternblutzucker und ein kleines Blutbild.

### **2.5.2 Zytokinbestimmungen**

In allen Blutproben wurden die relativen Genexpressionen pro- und anti-inflammatorischer Zytokine bestimmt. Die pro-inflammatorischen Zytokine umfassten IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und TNF. Die anti-inflammatorischen Zytokine umfassten IL-4, IL-10 und TGF. Die bei reversen Transskriptase- und quantitativen Real-Time PCR verwendeten Reagenzien inklusive Primer sind in den Tabellen 7.8 und 7.9 aufgeführt.

### **2.5.3 Kontrollkollektiv für Blutuntersuchungen**

Die Kontrollgruppe für die Blutuntersuchungen bestand aus 34 gesunden Freiwilligen, die sich aus den Angestellten der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg und Patienten von den Stationen der Universitäts-Augenklinik Würzburg zusammensetzten. Die Kontrollprobanden von den Stationen der Augenklinik waren alle entweder zur Kontrolle eines erhöhten Augeninnendrucks oder wegen einer bevorstehenden Kataraktoperation stationär in der Klinik.

Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Kontrollgruppe waren: vorbekannte Schmerzerkrankungen, Polyneuropathien, aktuelle Infektionen, fieberhafte oder entzündliche Erkrankungen.

In den Altersdekaden 30-40, 41-50, 51-60, 61-70 und 71-80 Jahre wurden jeweils vier Frauen und Männer rekrutiert mit maximal drei Jahren Unterschied. In der Gruppe der 71 bis 80 Jährigen wurden die Kontrollen in Alter und Geschlecht exakt den beiden Patienten dieser Altersgruppe angepasst ausgewählt. Der Altersmedian betrug 51,5 Jahre (von 31 bis 75 Jahre).

## **2.6 Genexpressionsanalysen aus Blut- und Hautproben**

Die hierbei verwendeten Materialien sind in Tabelle 7.4 und 7.5 aufgeführt.

### **2.6.1 RNA Extraktion aus Vollblut**

Für die RNA-Gewinnung aus EDTA-Vollblut wurde der Roti-Quick-Kit (Roti-Quick-Kit, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Dieser besteht aus Lösung 1 (=Guanidin Thiocyanat), Lösung 2 (= Phenol) und Lösung 3 (= Isopropanol). Dem zuvor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in 2 ml Eppendorf Caps gelagerten EDTA-Vollblut wurden auf Eis 500  $\mu\text{l}$  Lösung 1 hinzugefügt. Die gefrorene Blutprobe wurde mit einer 20G-Nadel zerstoßen und homogenisiert indem die Blutprobe durch wiederholtes Auf- und Abziehen mittels einer 1 ml-Spritze durch die 20G-Nadel mit der Lösung 1 vermischt wurde. Gleichzeitig begann mit der Homogenisierung die Lyse der Zellen. Nach mindestens zehnmalem Auf- und Abziehen des Gemisches wurde 650  $\mu\text{l}$  Lösung 2 hinzupipettiert und auf dem Vortexer (GLW L46) solange gemischt bis es zu einem Farbumschlag nach braun kam (Zeichen für Zelllyse). Die Suspension wurde danach für 10 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 15 Min. bei 10 000 Umdrehungen pro Minute (UpM) und  $4^{\circ}\text{C}$  mit der Zentrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation folgte die Abnahme von 600  $\mu\text{l}$  der oberen wässrigen Phase der Probe. Dieser Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Cap überführt und mit 600  $\mu\text{l}$  Lösung 3 vermischt.

Das Gemisch wurde für mindestens 40 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt erfolgte die erneute Zentrifugation für 15 Min. und 10000 UpM bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde abgenommen und entsorgt. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das Pellet auf dem Boden des Caps nicht verloren ging. Anschließend wurde das Pellet in 600  $\mu\text{l}$  Lösung 1 mittels vortexen aufgelöst und danach nochmals mit 600  $\mu\text{l}$  Lösung 3 vermischt. Es folgte ein erneuter Inkubationsschritt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 30 bis 60 Min. und danach eine erneute Zentrifugation für 20 Min. bei 14000 UpM und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Sedimente mit 500  $\mu\text{l}$  70%-Ethanol vermischt und für 10 Min. bei Raumtemperatur belassen. Diese Suspension wurde erneut für 20 Min. bei 14000 UpM und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment bei Raumtemperatur so lange getrocknet, bis kein Alkohol mehr im Cap vorhanden war. Anschließend wurde das Pellet mit 33  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser aufgelöst und für 5 Min. bei Raumtemperatur auf einen Schüttler (GLW L-40) gestellt.

Die Proben lagerten bis zur Messung der Menge der extrahierten RNA für mindestens eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.6.2 RNA Extraktion aus Hautproben**

Die gefrorene Hautbiopsieprobe wurde in frische, mit 1 ml Trizol gefüllte, 2 ml Caps überführt und taute auf Eis auf. Anschließend wurde die Probe mit dem Polytron PT 1600 E Homogenisator (Kinematica AG, Luzern, Schweiz) in Trizol homogenisiert.

Danach wurden der Probe 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugefügt und gründlich gevortext bis die Farbe nach Rosa umschlug. Die Probe wurde danach für drei Minuten bei Raumtemperatur belassen und dann für 15 min. bei 12000 UpM und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die Probe wies drei Phasen auf: die oberste Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in ein frisches 1,5 ml Cap überführt und mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropyl-Alkohol vermischt. Nach gründlichem Vortexen wurde die Probe erneut für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 Min. bei 12000 UpM und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das verbleibende Pellet in 75% Ethanol aufgelöst und gründlich gevortext. Diesem Schritt schloss sich eine erneute Zentrifugation für fünf Min. bei 7500 UpM und  $4^{\circ}\text{C}$  an.

Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet trocknete auf Eis solange bis kein Alkohol mehr im Cap vorhanden war. Das getrocknete Pellet wurde in gleicher Weise, wie nach der mRNA-Extraktion aus Vollblut behandelt.

### **2.6.3 Messung der optischen Dichte**

Das Messverfahren der optischen Dichte der RNA-Ausbeute war für Extraktionen aus Blut- und Hautbiopsien identisch. Mit dieser Methode wurde die Konzentration der RNA in der Probe in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  mit dem Eppendorf Spectrometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die jeweiligen Proben wurden aufgetaut und anschließend 3  $\mu\text{l}$  der Probe in einem separaten 1,5 ml Cap mit 87  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser verdünnt und gevortext. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurde vor der Messung die Messküvette mit 70% Ethanol vorgespült. Die Eichung erfolgte indem 90  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser in die Messküvette gegeben wurden, um die Leerprobe zu bestimmen.

Nach der Eichmessung wurde mithilfe der Absaugpumpe ECOM-P 4153 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) das Volumen aus der Küvette entfernt. Um sicher zu gehen, dass keine Verunreinigungen in der Küvette die folgenden Messungen verfälschten, wurde erneut 90  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser hineinpipettiert und drei Mal gemessen. Die Werte



sollten Null oder nahe bei null sein. Die Leerprobe wurde mittels der Absaugpumpe entfernt und 90 µl der vorher vorbereiteten Probe hineinpipettiert und drei Mal gemessen. Zwischen den Messungen der Proben wurde die Küvette mit destilliertem Wasser gespült. Die Ausgabe und Dokumentation der Messergebnisse erfolgte mithilfe des Druckers (DPU-414 Thermal Printer, Seiko Instruments, Japan). Der Mittelwert der dreimaligen Messung ergab die Grundlage für die Berechnung des für die weiteren Messungen nötigen RNA-Volumens.

#### **2.6.4 Reverse Transkriptions-PCR bei humanen Blutproben**

Die reverse Transkriptions-PCR dient der Umschreibung der extrahierten messenger RNA (mRNA) in copy-DNA (cDNA). Für die reverse Transkription von humanen Blutproben waren 750 ng RNA pro Probe notwendig. Die Bestandteile des Reaktionsansatzes für die reverse Transkription wurden in 200 µl Caps gegeben und vermischt. Das Volumen an RNase freiem Wasser erhielt man, wenn man berücksichtigte, dass der Ansatz vor der Hitzedenaturierung 37,8 µl pro Probe betragen und vorher 5 µl Random Hexamers in den Reaktionsansatz hinzugefügt werden sollten. Anschließend wurde die Probe für drei Min. auf einem Heizblock (FA Liebisch, Bielefeld, Deutschland) bei 85°C erhitzt und denaturiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass Basenpaarungen innerhalb oder zwischen benachbarten mRNA-Strängen aufgeschmolzen und sich die Random Hexamers an die zu transkribierende RNA anlagern konnten. Nach dem Denaturierungsschritt wurden der Probe 2 µl Oligo-DT's hinzugefügt. Sowohl die Oligo-DT's wie auch die Random Hexamers sind Primer, die verhindern, dass die bei der RNA-Extraktion freiwerdende ribosomale RNA (rRNA), während der reversen Transkription mit in cDNA umgeschrieben wird (Schneinert 1997). Um einen vollständigen Reaktionsansatz mit einem Volumen von 100 µl zu erhalten, wurden jeder Probe 60,2 µl eines vorher vorbereiteten Master Mix hinzupipettiert. Die Tabelle 1 zeigt die Bezeichnungen und die Mengen der Reagenzien (Taq Man Reverse Reagents, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) pro Probe:

Reagenz	Volumen
10x RT-Buffer	10 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	22 µl
dNTPs	20 µl
RNAse Inhibitor	2 µl
Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	6,2 µl

**Tab. 1: Mengen der Reagenzien für die reverse Transkriptions-PCR pro Probe bei humanen Blutproben.**

Der vollständige Reaktionsansatz wurde gevortext und zur reversen Transkription in den PCR-Cycler Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Die Cyclereinstellungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Schritt	Temperatur	Dauer
Annealing	25°C	10 Min
Reverse Transskription	48°C	60 Min
Enzyminaktivierung	95°C	5 Min

**Tab. 2: Cyclereinstellungen für die reverse Transskriptions-PCR.**

Nach der reversen Transkription wurden die Proben bis zu ihrer weiteren Bearbeitung bei – 20°C gelagert.

### 2.6.5 Reverse Transkriptions-PCR bei humanen Hautbiopsien

Zur reversen Transskription von humanen Hautbiopsien wurden pro Probe 500 ng RNA benötigt. Das Volumen an RNA berechnete sich nach dem Mittelwert der gemessenen optischen Dichte. Die Differenz zu den 34,75 µl Gesamtansatz pro Probe wurde mit RNAse freiem Wasser aufgefüllt. Mit dem Master Mix sollten ein Gesamtvolumen von 100 µl pro Cap erreicht werden. Dazu wurden zu jeder Probe 65,25 µl des vorbereiteten Master Mix hinzugegeben.

Die Zusammensetzung des Master Mix in Tabelle 3 aufgeschlüsselt:

Reagenz	Volumen
10x RT-Buffer	10 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	22 µl
dNTPs	20 µl
Random Hexamers	5 µl
RNAse Inhibitor	2 µl
Multiscribe Reverse Transskriptase	6,25 µl

**Tab. 3: Zusammensetzung des Master Mix bei der reversen Transskriptions-PCR bei humanen Hautbiopsien.**

Der Reaktionsansatz von 100 µl wurde gevortext und in den PCR-Cycler Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gegeben.

Die transkribierten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Cyclereinstellungen sind in Tabelle 4 Aufgeführt.

Schritt	Temperatur	Dauer
Annealing	$25^{\circ}\text{C}$	10 Min.
Reverse Transskription	$37^{\circ}\text{C}$	60 Min.
Enzyminaktivierung	$95^{\circ}\text{C}$	5 Min.

**Tab. 4: Cyclereinstellungen bei der reversen Transskriptions-PCR bei humanen Hautbiopsien.**

### 2.6.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ist eine Methode, mit der es möglich ist, die relative Menge an mRNA eines bestimmten Transkriptes in der Probe zu bestimmen (Giulietti et al. 2001).

Die Methode beruht darauf, die gewünschten DNA-Abschnitte durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) zu vervielfältigen. Zusätzlich werden genspezifische Primer in 5'-3'- und 3'-5'- Richtung und weitere Oligonukleotide zur Signaldetektion an die Zielsequenz der cDNA gekoppelt. Die gewünschte cDNA-Zielsequenz ist im intakten Zustand zunächst mit einem 5'-gebundenen fluoreszierenden Farbstoff (Reporting Dye = Reporter) und einem 3'-gebundenen Quencher markiert. Die fluoreszierenden Eigenschaften des Reporters werden im Beisein des Quenchers soweit unterdrückt, dass keine Lichtsignale emittiert werden können. Während der DNA-Polymerisation wird der 3'-Quencher vom 5'-Reporter getrennt und ist anschließend in der Lage nach Anregung durch einen Laser Licht zu emittieren. Dieses kann photometrisch gemessen werden.

Für die Bestimmung der mRNA-Expression wurde der Ct-Wert (Threshold Cycle) herangezogen. Der Ct-Wert bezeichnet die Anzahl an Zyklen, die gefahren werden müssen, um ein überschwelliges Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Der Ct-Wert ist umso niedriger, je stärker das Zielgen exprimiert wird und umgekehrt.

Für jedes Zielgen wird auf einer Platte neben der Probe gleichzeitig auch ein Calibrator gemessen. Dieser wurde aus den Genexpressionen der gesamten Kontrollgruppe für jedes Zielgen eigens bestimmt. Diejenige Probe, die dem Mittelwert der gesamten Messung am nächsten kam, wurde als Calibrator ausgewählt. Der Calibrator diente als interne Kontrolle und zur Vergleichbarkeit der PCR-Läufe. Zur endgültigen Auswertung gelangten nur die PCR-Läufe deren arithmetisch gemittelter Ct-Wert zwischen den Läufen um weniger als einen Ct-Wert schwankte.

Auf jeder Platte wurden zudem die 18s-Werte jeder Probe und des Calibrators bestimmt. Als „Haushaltsgen“ wird 18s konstitutiv in jeder eukaryoten Zelle exprimiert. Die Messung dieses „Haushaltsgenes“ erlaubt Rückschlüsse auf das gesamte individuelle Expressionsniveau der Proben (Bustin 2000).

### 2.6.6.1 Praktische Durchführung der qRT-PCR

Zur Messung der Proben wurden 96 Well-Platten (Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Mit diesen war es möglich gleichzeitig bis zu 18 Proben für ein bestimmtes Ziel zu messen.

Vor der Messung wurden die Reaktionsansätze für die Zielgene und die 18s-RNA hergestellt.

Die Bestandteile und die Volumina pro Well sind in Tabelle 5 aufgeführt:

Volumen für Ziel	Reagenz	Volumen für 18s
8,75µl	Wasser	10 µl
12,5µl	Master Mix	12,5 µl
1,25µl	Primer	1,25 µl

**Tab. 5: Mengen der Reagenzien für die qRT-PCR pro Well.**

Beim Wasser handelte es sich um destilliertes und steriles Wasser. Es wurde der Taq Man Universal Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die verwendeten Primer (Taq Man, Gene expression assay, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) sind im Anhang unter 7.1.9 in einer Tabelle zusammengefasst. In die Wells der PCR-Reaktionsplatte (Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), die für die Messung des Zielgens in den Proben und dem Calibrator bestimmt waren, wurden pro Well jeweils 22,5 µl des vorbereiteten Reaktionsansatzes gegeben. Jede Probe und der Calibrator wurden als Triplet und die 18s-Proben als Doublettes gemessen. Das Volumen für den Reaktionsansatz von 18s beträgt 23,8 µl pro Well. Um eine Verunreinigung der Reaktionsansätze des Zielgens, wie auch der 18s-RNA, auszuschließen, wurde ein zusätzliches Triplet mit einer Leerprobe, die keine cDNA enthalten durfte, auf der gleichen Platte gemessen. Die Wells für das Zielgen wurden mit jeweils 5 µl sterilem Wasser bei der Leerprobe und 5 µl cDNA der Proben aufgefüllt. Die Volumina für die 18s-RNA betragen 2,5 µl Wasser für die Leerprobe und 2,5 µl cDNA der zu messenden Proben pro Well. Nachdem die Wells mit dem Reaktionsansatz und der cDNA aufgefüllt waren, wurde die Platte mittels Micro Amp 8-Cap Strips (Applied Biosystems) versiegelt und kurz gevortext. Danach wurde die

versiegelte Platte in den Gene Amp 7700 sequence detection System Cyler Abi Prism (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gegeben.

Bei 45 Zyklen und 25 µl Ansatz pro Well wurden folgende Cylerbedingungen eingestellt (Tab. 6):

Schritt	Temperatur	Dauer
Annealing	50°C	2 Min.
Denaturierung	95°C	10 Min. und 15 Sek.
Amplifikation	60°C	1 Min.

**Tab. 6: Cyclereinstellungen bei der qRT-PCR.**

Die relative mRNA-Expression des Zielgenes in der Probe wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode bestimmt (Livak und Schmittgen 2001; Fleige et al. 2006). Dazu wurden zuerst der Ct-Wert (threshold cycle) der Probe und des Calibrators in Bezug zu ihren endogenen Kontrollen (18s) gesetzt und anschließend voneinander subtrahiert.

$$\Delta Ct (\text{Probe}) = \text{Ct-Wert (Zielgen der Probe)} - \text{Ct-Wert (endogene Kontrolle der Probe)}$$

$$\Delta Ct (\text{Calibrator}) = \text{Ct-Wert (Zielgen des Calibrators)} - \text{Ct-Wert (endogene Kontrolle des Calibrators)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Probe}) - \Delta Ct (\text{Calibrator})$$

Die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode erlaubte es zu berechnen, wie viel fach die mRNA-Expression des Zielgenes der Probe über oder unter der Expression des Zielgenes beim Calibrator lag.

## 2.7 Statistische Auswertung der Daten

Die Daten der qRT-PCR-Messungen wurden statistisch mittels SPSS-Software (Version 16.0.2, München, Deutschland) analysiert. Da die Daten im Kolmogorov-Smirnov-Test keine Normalverteilung zeigten, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Korrelation der Fragebogen- und PCR-Daten wurde die Korrelation nach Spearman verwendet. Bei den nicht-normalverteilten QST-Daten wurden nach der log-Transformation die Z-Scores berechnet und die Daten mittels („one-way“) ANOVA mit einem post-hoc Tukey-Test ausgewertet. Bei  $p < 0,05$  wurden die Ergebnisse als signifikant angenommen.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Klinische Daten**

Es wurden 24 Patienten untersucht (10 Frauen, 14 Männer) mit einem mittleren Alter von 53 Jahren (34 bis 76). Der Median der Erkrankungsdauer lag bei 3 Jahren (1 bis 41). Alle Patienten erfüllten die Kriterien für die Diagnose der SFN (Lacomis 2002). Acht Patienten erfüllten die Kriterien einer „gesicherten“, 14 Patienten die einer „wahrscheinlichen“ und zwei Patienten die einer „möglichen“ SFN.

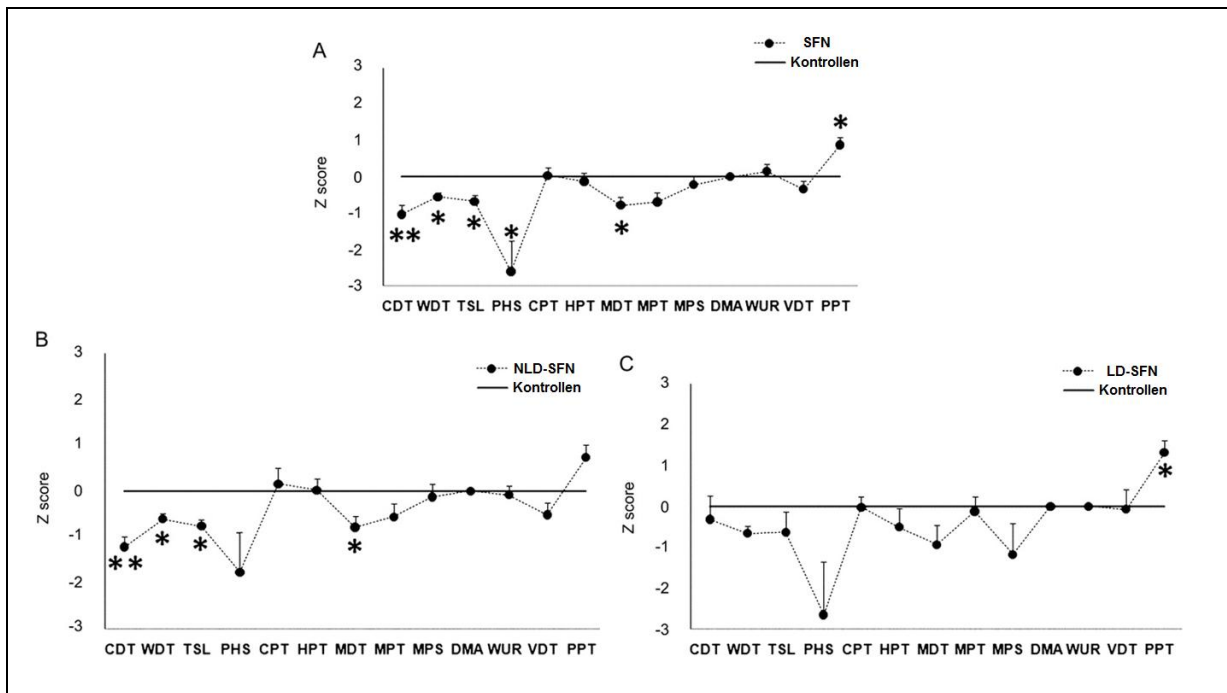
Die Ätiologie der SFN konnte bei drei Patienten nachgewiesen werden. Zwei von ihnen hatten einen Diabetes mellitus Typ II und ein Patient einen Diabetes mellitus Typ I. Bei den restlichen 21 Patienten wurde keine Ursache gefunden und sie wurden als idiopathisch eingestuft (Tabelle 6.1). In den Tabellen 6.2 und 6.3 sind die klinischen Charakteristika aller Patienten detailliert aufgeführt.

### **3.2 QST-Befund**

Zweiundzwanzig der 24 in die Studie eingeschlossenen Patienten erhielten eine QST. Die ersten zwei Patienten wurden zu einem Zeitpunkt untersucht als in unserer Klinik die QST-Messung noch nicht zur Verfügung stand.

Bei 20 der Patienten fanden sich erhöhte Kälte- (CDT) und Wärmeschwellen (WDT) und erhöhte Schwellen für alternierende Warm- und Kaltreize (TSL). Ein Patient aus dieser Gruppe zeigte zusätzlich noch paradoxe Hitzeempfindungen (PHS).

Ein Patient wies erhöhte Werte nur für Warm- und Kaltreize und berichtete zusätzlich über paradoxe Hitzeempfindungen. Ein weiterer Patient zeigte erhöhte Schwellen für Warm- und Kaltreize und zusätzlich noch erhöhte Empfindlichkeit für mechanische Reize (MDA). Details werden als Z-scores in Abb. 3.1 und in Tabelle 6.4 aufgeführt.



**Abb. 3.1: Z-Scores der gesamten Gruppe der SFN-Patienten und der Untergruppen mit LD-SFN und NLD-SFN im Vergleich zu Kontrollen (\*p < 0,05; \*\*p < 0,001). CDT (p=0,03), WDT (p=0,039), PHS (p<0,0001), MDT (p=0,01), MPT (p=0,035), PPT (p=0,017); Abkürzungen: CDT (Cold detection threshold), WDT (Warm detection threshold), PHS (Paradoxical heat sensations), MDT (Mechanical detection threshold), MPT (Mechanical pain threshold), PPT (Pressure pain threshold).**

### 3.3 Hautbiopsiebefunde

Bei 21 von 24 Patienten fand sich eine verminderte IENFD in den distalen Hautbiopsien mit einem Median von 3 Fasern/mm (von 0 bis 10 Fasern/mm). In den proximalen Biopsien der Patienten betrug die Faserdichte im Median 7 Fasern/mm (von 1 bis 28 Fasern/mm). Bei den 17 Kontrollprobanden zeigten die distalen Biopsien einen Median der IENFD von 10 Fasern/mm (von 7 bis 13 Fasern/mm) und bei 5 Kontrollprobanden mit proximalen Biopsien einen Median von 11 Fasern/mm (von 9 bis 22 Fasern/mm).

Das Verhältnis der IENFD zwischen proximaler und distaler Haut lag bei Kontrollprobanden im Median bei 1 (Spanne von 1 bis 3), das heißt, die distale und proximale Faserdichte waren bei den meisten Gesunden nicht unterschiedlich, während bei einigen die proximale Faserdichte höher war. Bei den Patienten betrug der Quotient zwischen proximaler und distaler IENFS im Median 2 (Spanne von 1 bis 12), somit hatten einige Patienten distal einen deutlich stärkeren Faserverlust als proximal. Bei 10 Patienten war dieser Quotient besonders hoch, mit normalen

proximalen und stark verminderten distalen Werten. Fälle mit einem Quotienten von  $\geq 5$  wurden als „längenabhängige SFN“ (length-dependent SFN, LD-SFN) definiert. Dabei zeigte sich im Median ein IENFD-Verhältnis von 7 (von 5 bis 12).

Vierzehn Patienten zeigten ein kleineres Verhältnis bei gleichzeitig verminderter IENFD in der proximalen und distalen Biopsie und wurden als „nicht-längenabhängige SFN“ (non-length-dependent SFN, NLD-SFN) definiert. Die Gruppe mit NLD-SFN wies ein medianes IENFD-Verhältnis von 2 auf (von 1 bis 4) (Abb. 3.2).

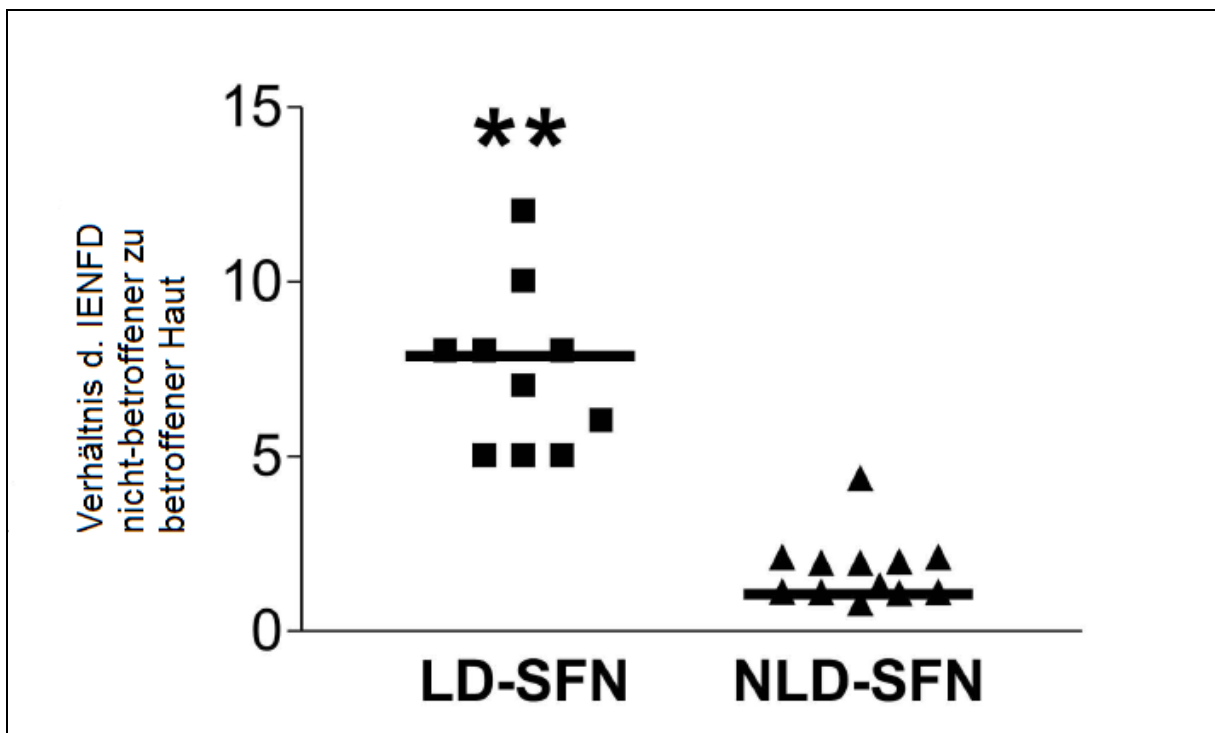


Abb. 3.2: Verhältnis der IENFD von nicht-betroffener zu betroffener Haut bei Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN. Die Patienten mit LD-SFN haben signifikant größeres IENFD-Verhältnis als die Patienten mit NLD-SFN (\*\*p < 0,001). Abkürzungen: IENFD (Intraepidermale Nervenfaserdichte), LD-SFN (Length-dependent small-fiber neuropathy), NLD-SFN (non-length-dependent small fiber neuropathy).



### 3.4 Immunhistochemie

Beim Nachweis von T-Zellen (CD3-positiv) und Makrophagen (CD68-positiv) zeigte sich weder ein Unterschied zwischen proximalen und distalen Biopsien von Patienten mit LD- und NLD-SFN, noch zwischen Patienten und Kontrollen (Abb. 3.3):

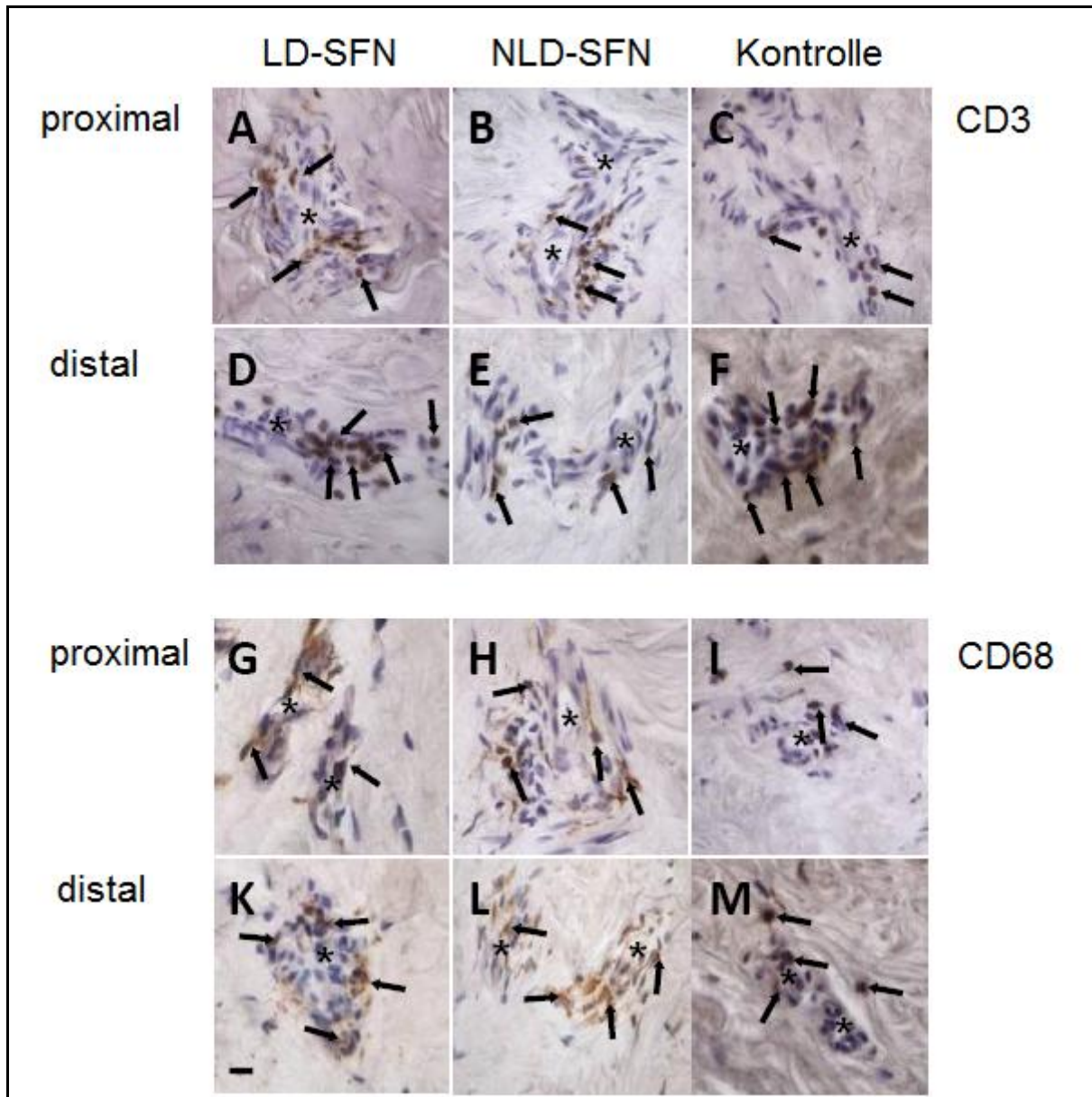


Abb. 3.3: Perivaskuläre Infiltrate mit CD3-positiven T-Zellen und CD68-positiven Makrophagen in proximaler und distaler Haut von Patienten mit LD-SFN, NLD-SFN und gesunden Kontrollen. Die Sterne markieren Blutgefäße, die Pfeile deuten auf T-Zellen oder Makrophagen. Es gibt keinen Unterschied bezüglich der Anwesenheit von entzündlichen perivaskulären Zellen zwischen den Patientenuntergruppen und gesunden Kontrollen. Balken entspricht 20 µm.

Abkürzungen: LD-SFN (length-dependent SFN), NLD-SFN (non-length-dependent SFN).

### 3.5 Zytokinexpression im Blut

In der gesamten SFN-Gruppe und in der Untergruppe der Patienten mit LD-SFN konnte eine zweifach erhöhte systemische Genexpression von IL-2, IL-10 und TGF $\beta$ 1 im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden. In der Gruppe mit NLD-SFN zeigte sich eine erhöhte Genexpression von IL-2 und TGF $\beta$ 1. Die Daten sind graphisch in den Abbildungen 3.4 und 3.5 zusammengefasst.

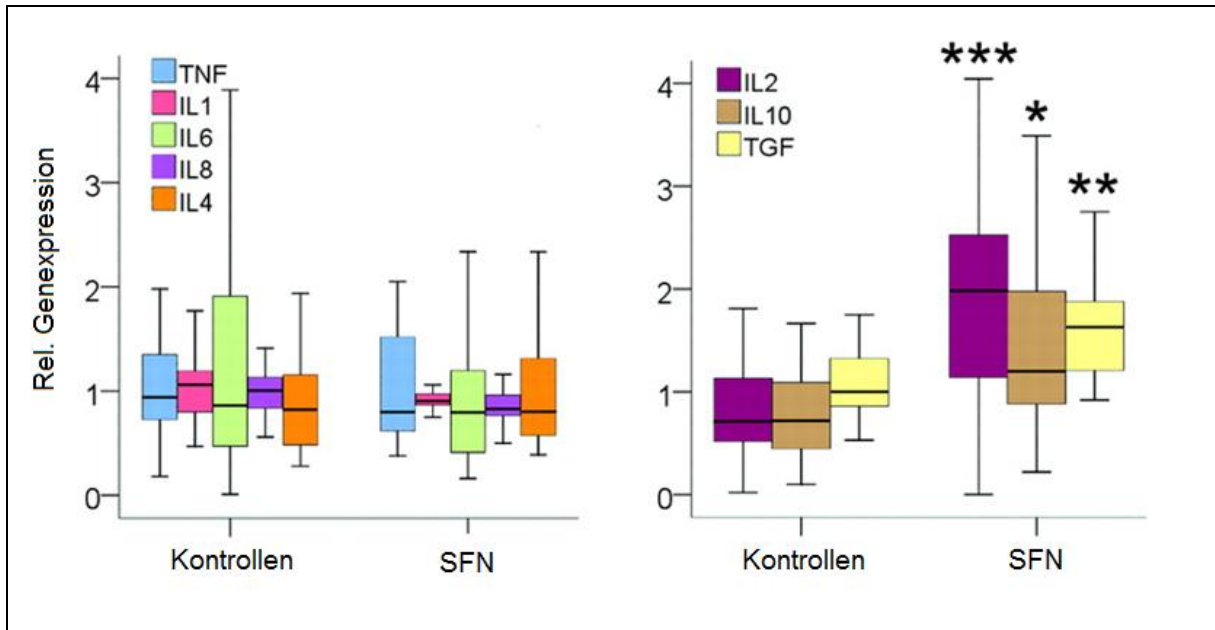
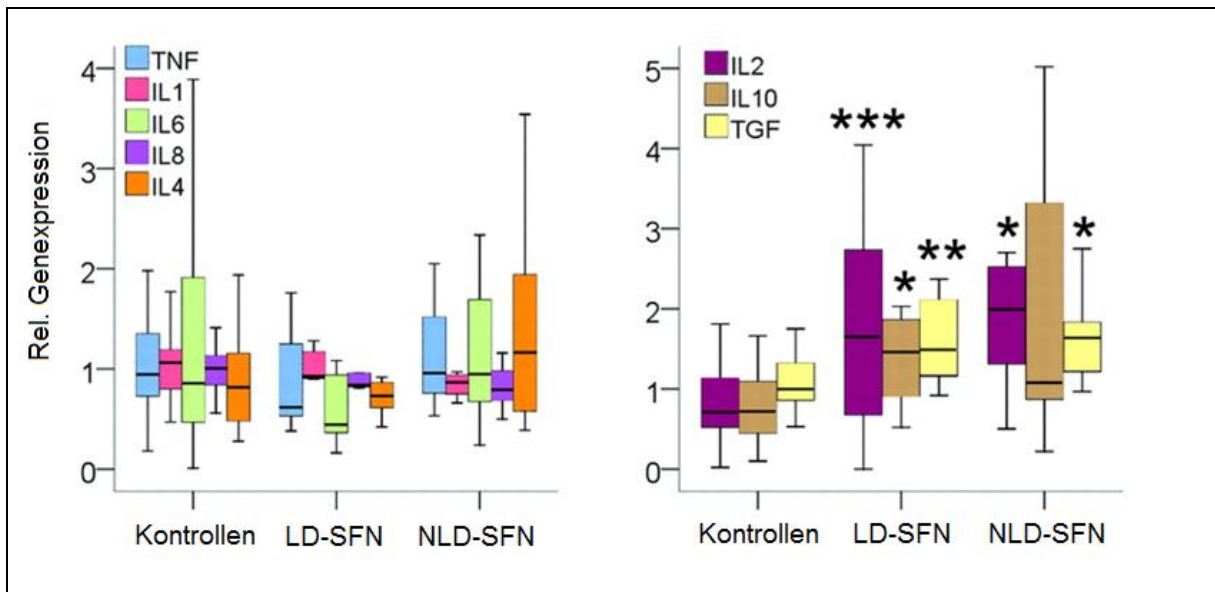


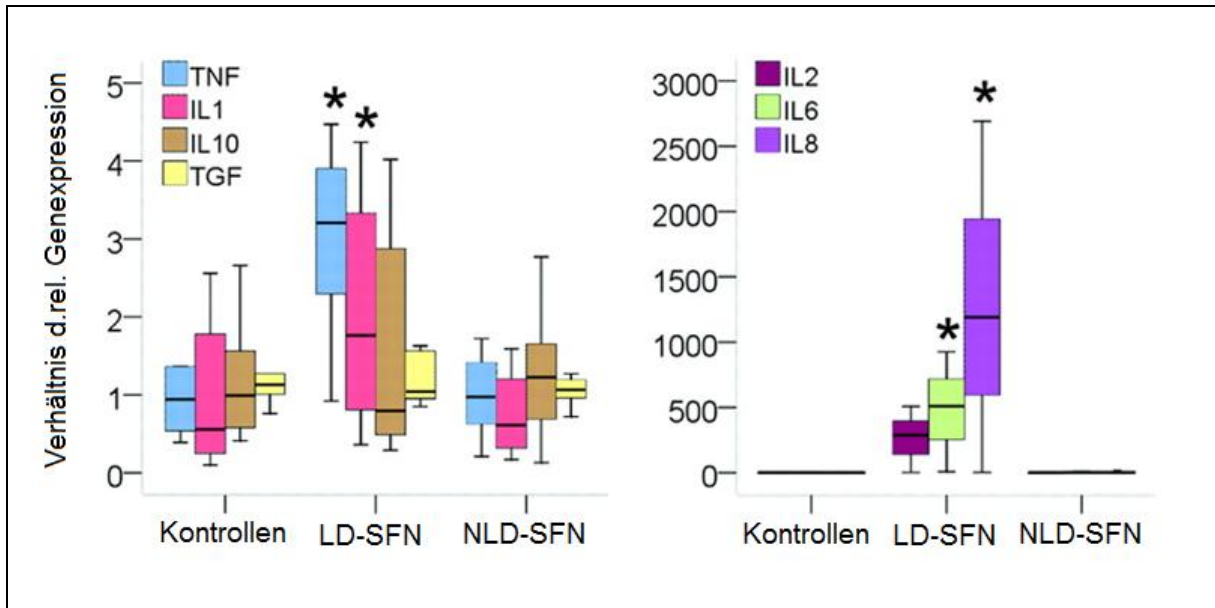
Abb. 3.4: Boxplot-Darstellung der Genexpression der gemessenen Zytokine. Dabei zeigt sich bei den SFN-Patienten im Blut eine erhöhte Genexpression von IL-2, IL-10 und TGF $\beta$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Abb. 3.5:** Darstellung der Zytokingenexpression im Blut der Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Bei den Patienten mit LD-SFN zeigt sich eine erhöhte Genexpression von IL-2, IL1-0 und TGF $\beta$ . Patienten mit NLD-SFN zeigen eine höhere Genexpression von IL-2 und TGF $\beta$  (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

### 3.6 Zytokinexpression in der Haut

Bei der Patientengruppe mit LD-SFN konnte intra-individuell in den distalen betroffenen Hautpartien eine 2,6-fach höhere Genexpression von TNF, zweifach erhöhte Expression von IL-1 $\beta$ , eine über 200fach erhöhte Expression von IL-6 und eine über 500fach erhöhte Expression von IL-8 nachgewiesen werden. Bei den Patienten mit NLD-SFN konnten intra-individuell keine Unterschiede zwischen proximalen und distalen Hautbiopsien gezeigt werden (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Genexpressionsdaten von Zytokinen im Verhältnis distal/proximal in der Haut von Kontrollen und LD-SFN- und NLD-SFN-Patienten. Dabei konnte bei LD-SFN-Patienten intra-individuell in den distalen betroffenen Hautpartien eine 2,6-fach höhere Genexpression von TNF, zweifach erhöhte Expression von IL-1 $\beta$ , 200fach erhöhte Expression von IL-6 und eine über 500fach erhöhte Expression von IL-8 nachgewiesen werden. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).**

Der inter-individuelle Vergleich der Patienten mit gesunden Kontrollen und der Vergleich zwischen den SFN-Untergruppen zeigte eine erhöhte IL-6 und IL-8 Genexpression in den distalen Hautbiopsien der Patienten mit LD-SFN im Vergleich zu den Expressionswerten der distalen Biopsien gesunder Kontrollen. Diese Unterschiede konnten in der Untergruppe mit NLD-SFN nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Im Anhang findet sich in Tabelle 6.5 eine Übersicht der beschriebenen Daten.

### 3.7 Fragebogendaten

Aus Gründen der Übersichtlichkeit finden sich im Anhang in den Tabellen 6.6 bis 6.9 mit Details der Fragebogendaten.

#### 3.7.1 ADS

Da Zusammenhänge zwischen Schmerzsyndromen und Depression bestehen (Wise et al. 2007), wurde zur Erfassung möglicher depressiver Symptome der Patienten die ADS verwendet. Dabei wird das Vorhandensein von depressiven Stimmungslagen, negativen Denkmustern, körperlichen Beschwerden und motorischen Hemmungen innerhalb der vergangenen sieben Tage erfasst und einer Häufigkeitsskala zugeordnet. Dabei wurden als Antwortmöglichkeiten „selten“, „manchmal“, „öfters“ und „meistens“ angeboten, Punktwerten von 0 bis 3 zugeordnet und als Summenwert verrechnet. Wurde ein Summenwert größer als 16 erreicht, galt dies als Hinweis auf eine klinisch relevante Depression (Hautzinger 1993).

Einen Summenwert größer 16 hatten 70,8% (17/24) der Patienten der gesamten SFN-Gruppe. In der Untergruppe mit LD-SFN betrug dieser Anteil 70% (7/10) und in der Untergruppe mit NLD-SFN 71,4% (10/14) (Abb. 3.8).

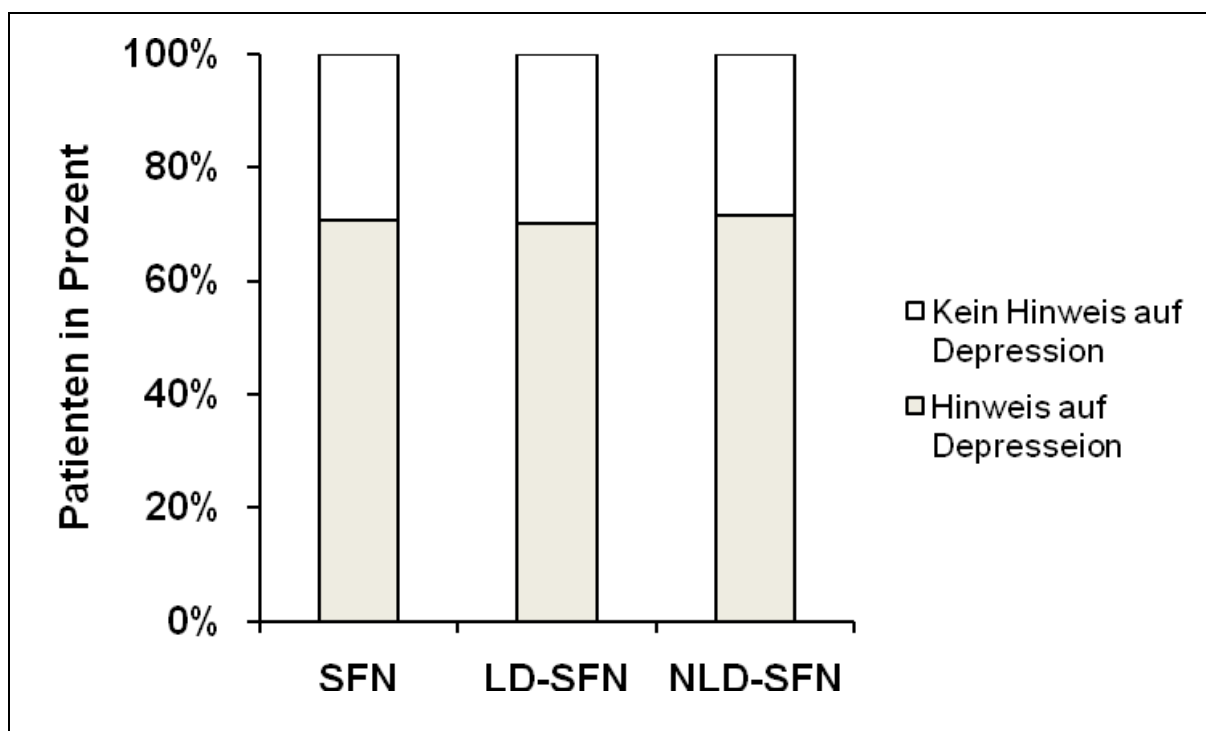
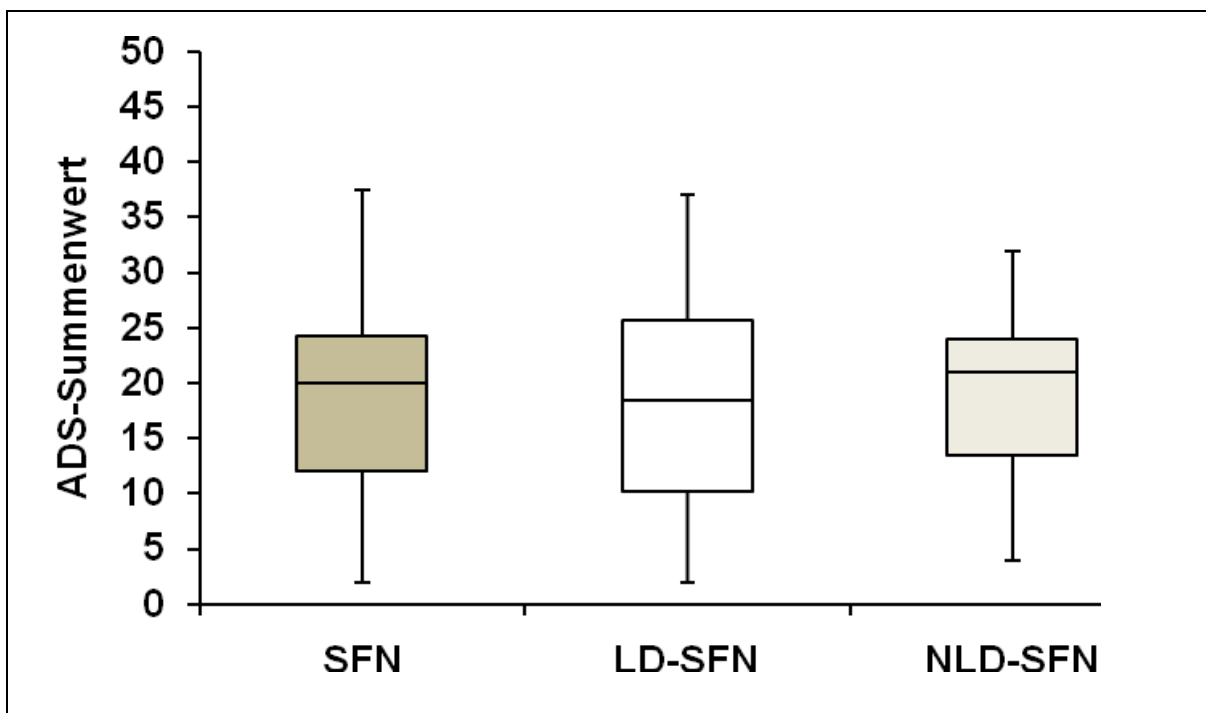


Abb. 3.8 ADS mit und ohne Hinweis auf eine Depression bei Patienten mit SFN und den Untergruppen mit LD-SFN und NLD-SFN.

Der Median des ADS-Summenwertes der gesamten SFN-Gruppe betrug 20 (von 2 bis 37). Im Vergleich mit der Untergruppe mit LD-SFN, die einen Median von 18,5 (von 2 bis 37) aufwies, zeigte die Untergruppe mit NLD-SFN einen höheren Median von 21 (von 4 bis 32). Der Unterschied zwischen den Untergruppen war nicht signifikant (Abb. 3.9).



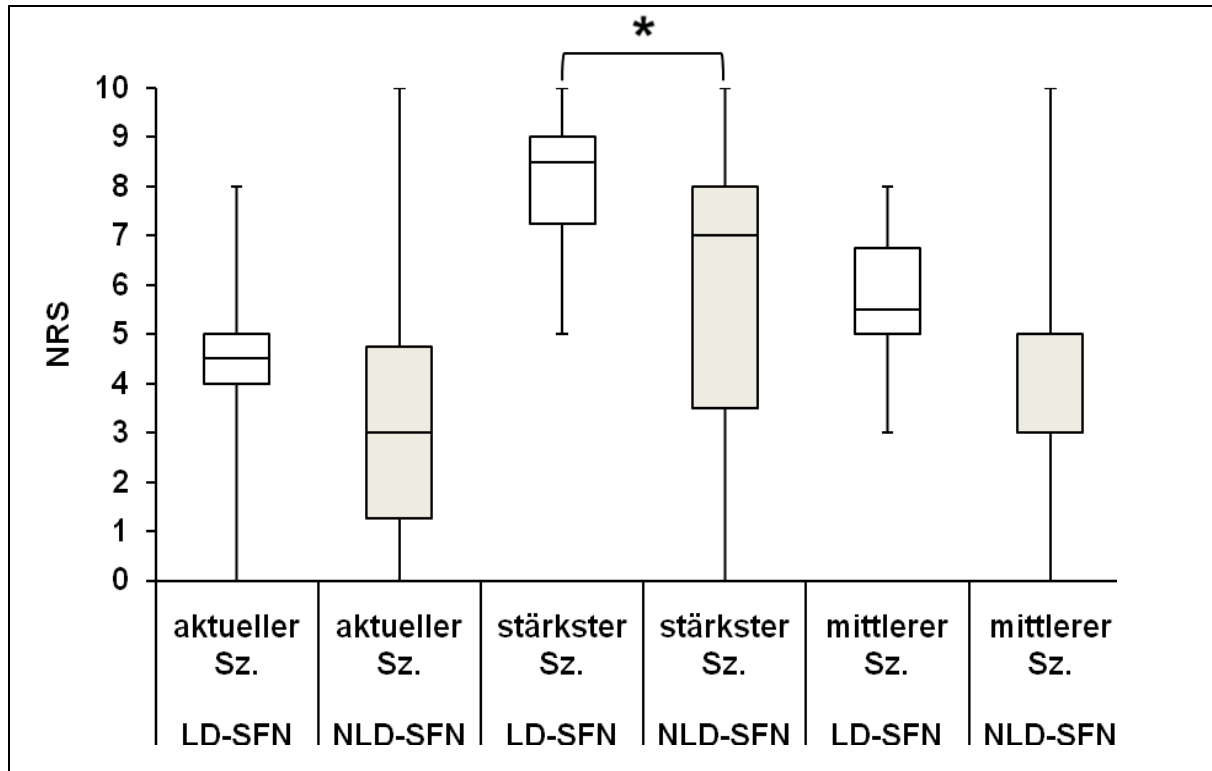
**Abb. 3.8:** Boxplot der ADS-Summenwerte der gesamten SFN-Gruppe und der Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN. Die Unterschiede zwischen den Untergruppen waren nicht signifikant. Allerdings lagen alle Mediane der ADS-Summenwerte über 16. Dies kann als Hinweis auf das Vorliegen einer klinisch relevanten Depression gewertet werden.

### 3.7.2 GCPS

Beim GCPS wird die Intensität der Schmerzen aktuell bis rückwirkend der vergangenen vier Wochen erfragt. Zudem wird auch erfasst in welchem Ausmaß die Schmerzen die täglichen Aktivitäten, die Freizeitaktivitäten und die Arbeitsfähigkeit eingeschränkt haben. Dabei wird der Schweregrad der einzelnen Attribute einer Skala von 0 bis 10 zugeordnet.

Im Vergleich der Untergruppe mit NLD-SFN war der Median der Untergruppe mit LD-SFN der aktuellen Schmerzstärke (LD-SFN 4,5/10 vs. NLD-SFN 3/10) und der Median der mittleren Schmerzstärke in den letzten vier Wochen (LD-SFN 5,5/10 vs.

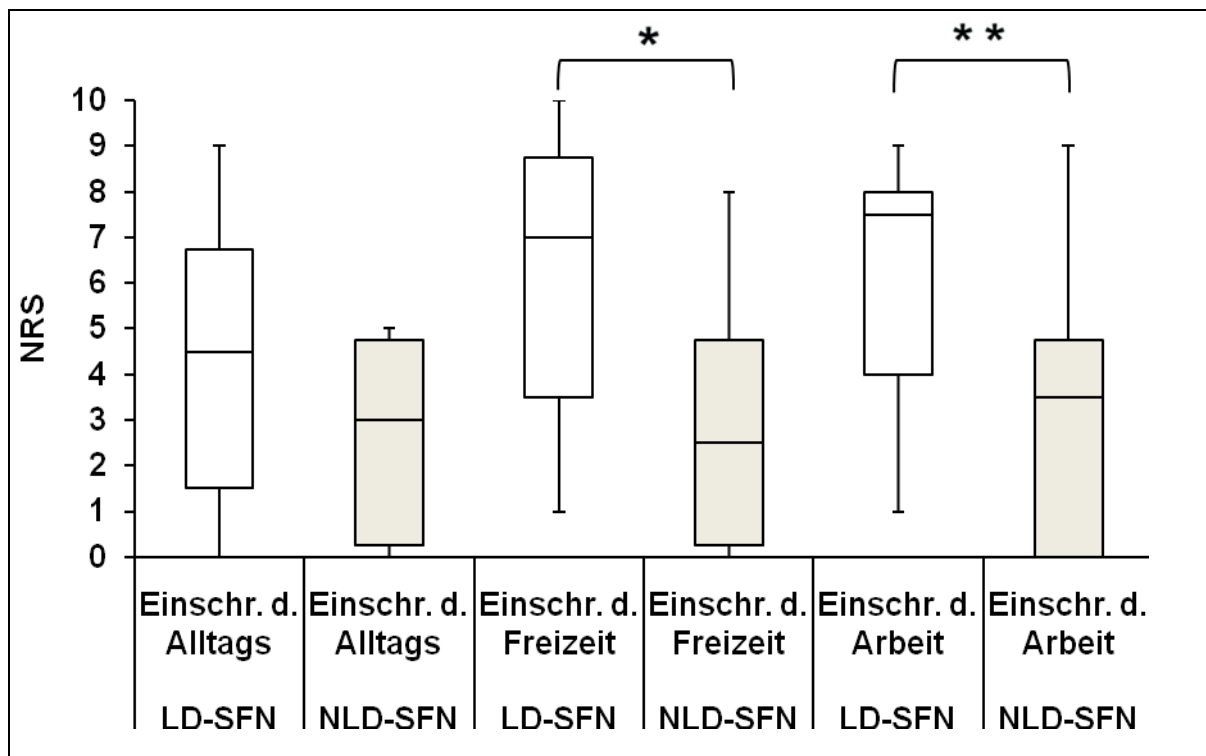
NLD-SFN 5/10) erhöht. Allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied ergab sich dagegen beim Attribut des stärksten Schmerzes in den letzten vier Wochen (Median LD-SFN 8,5/10 vs. Median NLD-SFN 7/10). In Abb. 3.9 sind die Daten graphisch zusammengefasst:



**Abb. 3.9: GCPS-Fragebogen: Boxplot mit Darstellung des aktuellen, mittleren (in den letzten vier Wochen) und stärksten Schmerzes (in den letzten vier Wochen) bei Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN. Dabei zeigte sich ein sign. erhöhter Median beim Item des stärksten Schmerzes in den letzten vier Wochen bei Pat. mit LD-SFN (\* $p < 0,05$ ); Abkürzungen: GCPS (Graded chronic pain scale), NRS (numeric rating scale), Sz. (Schmerz).**

Erhöht, aber ohne signifikanten Unterschied, zeigte sich auch das Item der Einschränkungen durch die Schmerzen in der Untergruppe mit LD-SFN bei Alltagsaktivitäten (Median LD-SFN 4,5/10 vs. Median NLD-SFN 3/10).

In der Untergruppe mit LD-SFN waren dagegen durch die Schmerzen signifikant die Freizeitaktivitäten (Median LD-SFN 7/10 vs. Median NLD-SFN 3,5/10) und die Arbeitsfähigkeit (Median LD-SFN 7,5/10 vs. Median NLD-SFN 3,5/10) eingeschränkt (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: GCPS-Fragebogen: Boxplot mit Darstellung der schmerzbedingten Einschränkung des Alltags, der Freizeit und der Arbeitsfähigkeit in den letzten sechs Monaten bei Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).**

Diese Daten zeigen, dass Patienten mit einer LD-SFN stärker unter Schmerzen und einer stärkeren schmerzbedingten Einschränkung der Aktivitäten in Alltag und Freizeit und der Arbeitsfähigkeit leiden. Details der GCPS-Daten finden sich unter Tabelle 6.7.

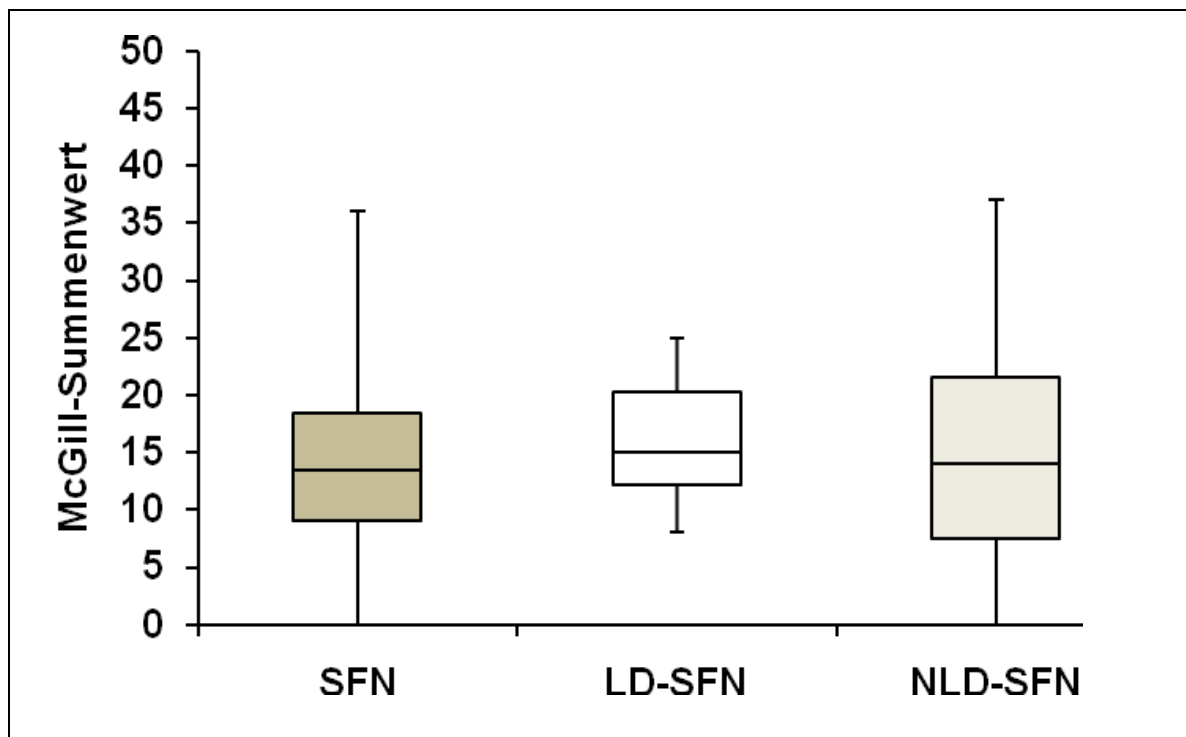
### 3.7.3 McGill-Fragebogen

Den Patienten wurden insgesamt 15 verschiedene deskriptive und affektive Attribute, die den wahrgenommenen Schmerz beschreiben bzw. bewerten sollten, angeboten. Die einzelnen Attribute sollten je nach Zutreffen einer Häufigkeitsskala aus „nicht vorhanden“, „gering“, „mäßig“ und „stark“ zugeordnet werden. Bei der Auswertung entsprachen diese je nach Stärke Zahlenwerten von 0 bis 3. Diese Zahlenwerte wurden abschließend zu Summenwerten addiert und verglichen.

Dabei lag der Median der Summenwerte für die gesamte SFN-Gruppe bei 13,5 (von 0 bis 36). Die Untergruppe mit LD-SFN zeigte einen Median von 15 (von 8 bis 25) und die mit NLD-SFN einen Median von 13 (von 0 bis 36). Die Mediane der

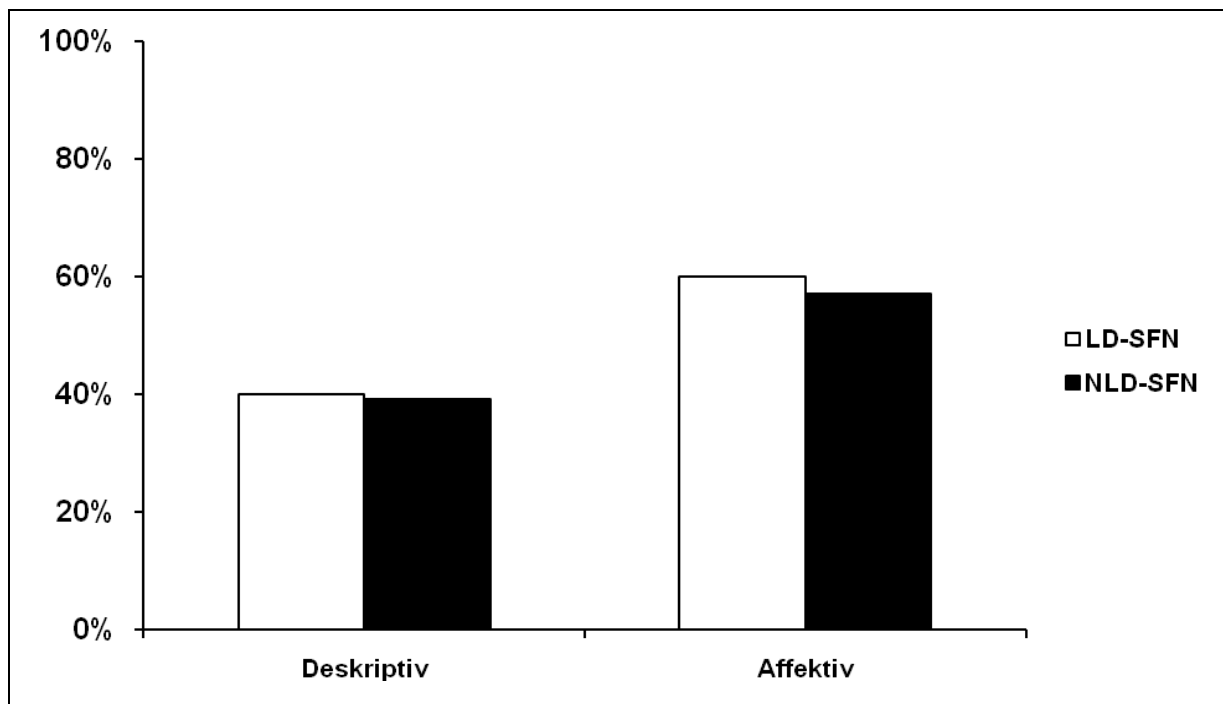


Gesamtsummen aller Unterpunkte ergaben zwischen den Untergruppen mit LD-SFN (15) vs. NLD-SFN (13) keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.11).



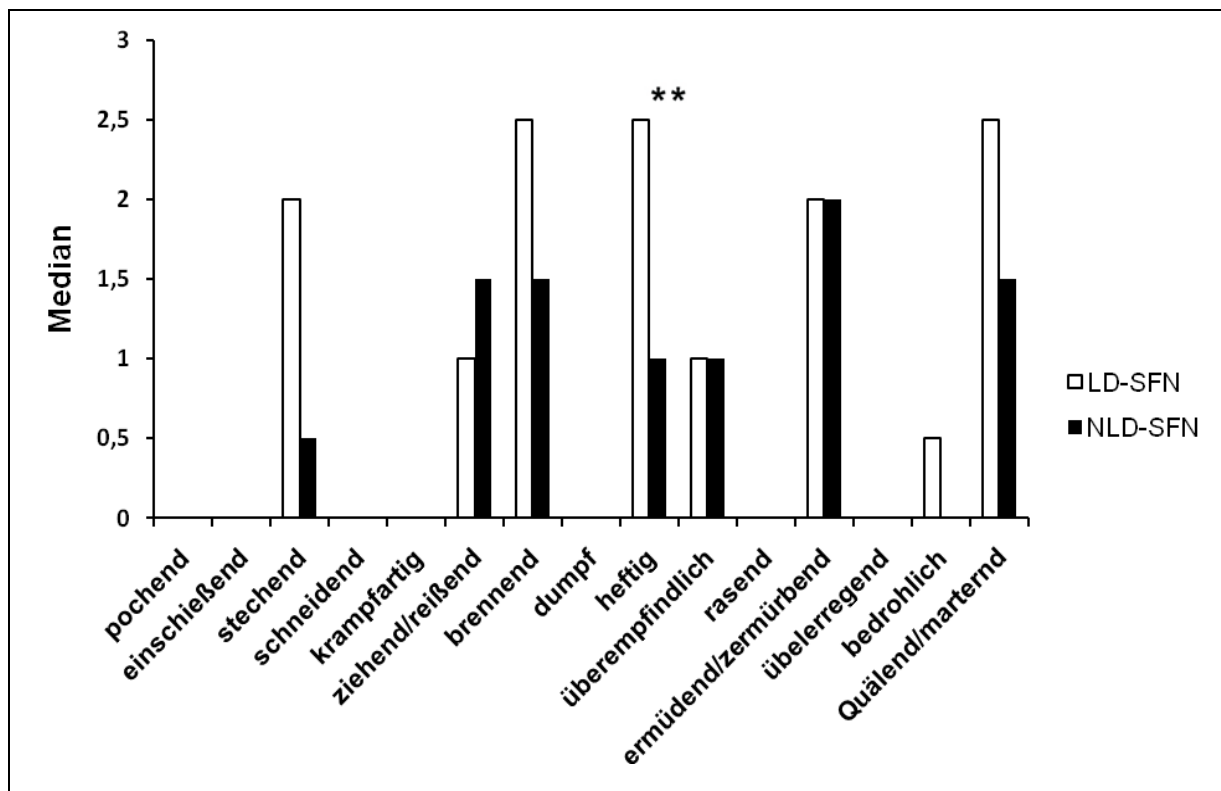
**Abb. 3.11: Boxplot der McGill-Summenwerte der gesamten SFN-Gruppe und der Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN. Die Unterschiede zwischen den Untergruppen waren nicht signifikant.**

Insgesamt lag der Anteil der positiven Antworten beider Untergruppen bei den affektiven über denen der deskriptiven Attribute. Bei der Untergruppe mit LD-SFN lagen die Anteile bei den deskriptiven und affektiven Attributen gering über denen der Untergruppe mit NLD-SFN. Die Unterschiede zwischen den Untergruppen waren nicht signifikant (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Vergleichende Darstellung der Mediane der positiven Antworten der deskriptiven und affektiven Attribute der Untergruppen LD-SFN und NLD-SFN. Die Unterschiede zwischen den Untergruppen waren nicht signifikant.**

Bei der Untergruppe mit LD-SFN lagen die Mediane der Items „stechend“, „brennend“, „heftig“, „bedrohlich“ und „quälend“ über den Medianen der Untergruppe mit NLD-SFN. Allerdings war nur bei dem Attribut „heftig“ mit einem Median von 2,5/3 bei LD-SFN vs. 1/3 bei NLD-SFN ein signifikanter Unterschied vorhanden (Abb. 3.13). Eine detaillierte Auflistung der McGill-Daten finden sich in der Tabelle 6.8.

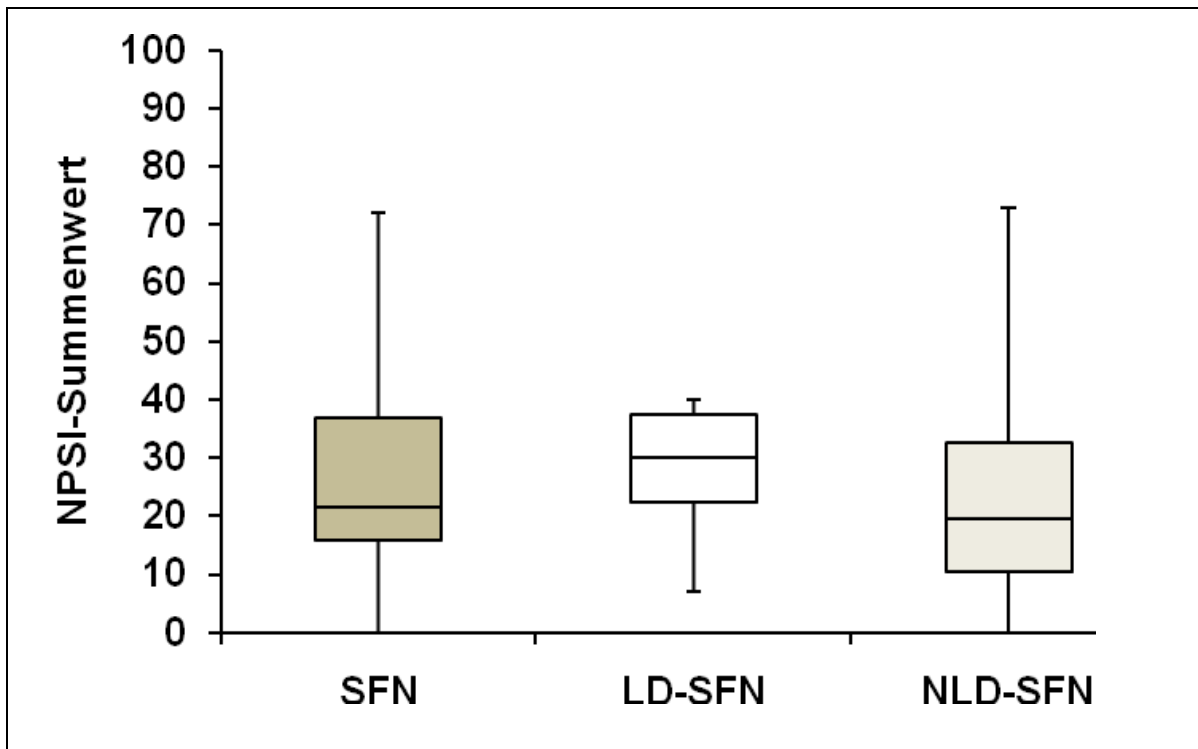


**Abb. 3.13: Kurzform des McGill-Fragebogens: Mediane der Attribute zur Beschreibung des Schmerzcharakters. Bei Pat. mit LD-SFN war gegenüber Pat. mit NLD-SFN lediglich der Median des Attributes „heftig“ signifikant erhöht. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).**

### 3.7.4 NPSI

Mit dem NPSI (validierte deutschen Form siehe (Sommer et al. 2011)) wird die Schwere und Häufigkeit von Spontanschmerzen, Schmerzattacken, evozierten Schmerzen und Gefühlsstörungen erfragt. Dabei werden die einzelnen Schmerzqualitäten je nach Intensität einer Skala von 0 bis 10 zugeordnet.

Der mittlere NPSI-Summenwert der gesamten SFN-Gruppe betrug 21,5 (von 0 bis 72). Bei der Untergruppe mit LD-SFN zeigte sich ein mit 30 (von 7 bis 40) im Vergleich zur Untergruppe mit NLD-SFN mit 19,5 (von 0 bis 72) erhöhter Median. Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14: Boxplot der medianen NPSI-Summenwerte der gesamten SFN-Gruppe und der Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN. Die Patientengruppe mit LD-SFN zeigte einen höheren Summenwert im Vergleich zur gesamten SFN-Gruppe und der Untergruppe mit NLD-SFN. Die Unterschiede zwischen den Untergruppen waren allerdings nicht signifikant.**

Im Vergleich zur Untergruppe mit NLD-SFN zeigten sich bei der Untergruppe mit LD-SFN signifikant erhöhte Werte bei Spontanschmerzen mit brennendem Charakter (Median LD-SFN 5,5/10 vs. Median NLD-SFN 0,5/10;  $p=0.02$ ) und bei Schmerzattacken mit stechendem Charakter (Median LD-SFN 5,5/10 vs. Median NLD-SFN 0/10;  $p=0,007$ ). Alle weiteren Attribute, die unter Spontanschmerz, Schmerzattacken, evozierter Schmerz und Parästhesien subsummiert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen mit LD- und NLD-SFN (Tabelle 6.9).

### **3.8 Korrelationen der Fragebogendaten mit den Zytokinwerten**

Es fand sich kein Zusammenhang zwischen den Genexpressionsdaten aus Blut- und Hautproben der Patienten mit LD- und NLD-SFN und den Fragebogendaten. Dabei wurde beim ADS, McGill und NPSI jeweils der Gesamtsummenscore und beim GCPS der Unterscore „Schmerzintensität“ mit den Zytokinexpressionsprofilen des jeweiligen Patienten korreliert.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Bei dieser Studie wurden prospektiv die Zytokinexpressionsprofile aus Blut- und Hautproben von 24 SFN-Patienten untersucht und mit den Expressionsprofilen von gesunden Kontrollprobanden verglichen.

Als Hauptbefund konnten wir zeigen, dass lokal in den distalen Hautbiopsien von Patienten mit LD-SFN sowohl intra- wie interindividuell im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine signifikant erhöhte Genexpression der pro-inflammatorischen und algetischen Zytokine TNF, IL-1, IL-6 und IL-8 vorliegt (Abb. 3.6 und 3.7). Diese war unabhängig von lokal anwesenden T-Zellen und Makrophagen (Abb. 3.3). Systemisch konnten in den Seren von SFN-Patienten erhöhte Genexpressionen von IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$ 1 nachgewiesen werden (Abb. 3.4).

### **4.2 Zu den Unterschieden der Untergruppen LD-SFN und NLD-SFN**

In den Diagnosekriterien der SFN finden die Untergruppen mit LD-SFN und NLD-SFN keine Berücksichtigung (Lacomis 2002; Devigili et al. 2008). Allerdings deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass es in der SFN Untergruppen gibt, die sich möglicherweise pathophysiologisch voneinander unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde die Unterschiedsschwelle für das IENFD-Verhältnis der LD-SFN zwischen proximalen und distalen Hautproben auf  $\geq 5$  festgelegt. Dies hat sich in der klinischen Diagnose bewährt, da es bezüglich des IENFD-Verhältnisses keine Überlappungen zwischen den Untergruppen gab (Abb. 3.2).

Die Ergebnisse der klinischen Fragebögen NPSI, GCPS, McGill und ADS zeigten keine Korrelation mit den Zytokinexpressionsdaten der SFN-Patienten. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Untergruppe der LD-SFN im Vergleich insgesamt stärker unter Schmerzen litt. Dadurch waren diese Patienten bei täglichen Aktivitäten (Arbeit und Freizeit) stärker als die Untergruppe mit NLD-SFN eingeschränkt.

Der LD-SFN könnten Defekte des axonalen Zytoskeletts und des axonalen Transportes, wie es bei diabetischen und alkoholinduzierten Neuropathien mit überwiegender Beteiligung der dünn- und nicht-bemerkten Nervenfasern nachgewiesen wurde (Medori et al. 1988; McLean 1997; Koike und Sobue 2006), zugrunde liegen. Zudem könnten gestörte Regenerationsmechanismen der Nervenfasern von betroffenen Hautarealen hinzutreten (O'Brien et al. 2009).

Bei der NLD-SFN dagegen, die sich durch einen Verlust der IENFD in proximalen und distalen Hautbiopsien äußert, könnte eine Ganglione- oder Neuronopathie als Auslöser vorliegen (Holland et al. 1998; Gorson et al. 2008).

#### **4.3 Zur erhöhten Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in betroffener Haut von Patienten mit LD-SFN.**

Im Gegensatz zu den Patienten mit NLD-SFN fanden sich beim Vergleich zwischen betroffener und nichtbetroffener Haut in der Untergruppe mit LD-SFN intra-individuell stark erhöhte Genexpressionen von TNF, IL-1, IL-6 und IL-8. Auch inter-individuell waren erhöhte Genexpressionen von IL-6 und IL-8 nachweisbar. Dieser Unterschied in Bezug auf die Untergruppe der NLD-SFN könnte auf unterschiedlichen zugrundeliegenden Pathomechanismen beruhen.

So ist es möglich, dass es bei der LD-SFN durch Untergang von peripheren Axonen durch lokalen oxidativen Stress (Feldman 2003), eine lokale Ischämie (Parry und Brown 1982) oder einen gestörten zytoskelettalen Aufbau mit beeinträchtigten axonalen Transportmechanismen (Medori et al. 1988; McLean 1997; Koike und Sobue 2006), zu einem lokal umschriebenen Untergang der dünn- und nicht-bemerkten Nervenfasern kommt. Gleichzeitig könnte ein Ungleichgewicht zugunsten von pro-inflammatorischen Zytokinen die verbliebenen Nervenfasern sensibilisieren und so die Schmerzphänomene bedingen (Üçeyler und Sommer 2008).

Die Tatsache, dass bei der NLD-SFN weder intra- noch inter-individuell im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden Unterschiede in Bezug auf die Genexpression von lokalen pro-inflammatorischen Zytokinen nachweisbar war, unterstützt die Möglichkeit einer Neuron- bzw. Ganglionopathie (Holland et al. 1998; Gorson et al. 2008) als zugrundeliegenden Pathomechanismus.

#### **4.4 Zur erhöhten Genexpression von IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$ 1 im Blut bei SFN-Patienten.**

Es erscheint auffällig, dass die systemische Genexpression von IL-2 als pro-inflammatorisches Zytokin zusammen mit den Genexpressionen der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 erhöht ist. Allerdings ist die Erhöhung dieser Zytokine nur milde ausgeprägt und zudem spiegelt die Einteilung von IL-2 in die Gruppe der pro-inflammatorischen Zytokine seine Eigenschaften nur ungenau wider. So ist bekannt, dass es neben den pro-algetischen (Pereira et al. 2003) auch

analgetische Eigenschaften besitzt (Song et al. 2002; Yao et al. 2003). Daneben gibt es auch Hinweise darauf, dass die Fähigkeit von TGF $\beta$ , autokrin die Produktion von IL-10 und auch von TGF $\beta$  zu induzieren, von der Anwesenheit von IL-2 abhängig ist (Horwitz et al. 2003). Folglich ist es denkbar, dass hier IL-2, IL-10 und TGF $\beta$  synergistisch im Sinne einer systemischen anti-inflammatorischen Reaktion als mögliche Gegenregulation zur lokalen inflammatorischen Reaktion wirken.

TGF- $\beta$ 1 kann die Wirkungen von IL-2 auf der Ebene der Signaltransduktion unterbrechen (Bright et al. 1997). Wenn man annimmt, dass IL-2 im Sinne einer systemischen pro-inflammatorischen Reaktion erhöht ist, besteht die Möglichkeit, dass die Genexpressionen von IL-10 und TGF- $\beta$  im Rahmen einer antiinflammatorischen Gegenreaktion hochreguliert sein könnten.

## **4.5 Woher kommen die lokal und systemisch nachgewiesenen Zytokine bei SFN-Patienten?**

### **4.5.1 Mögliche lokale Zytokinquellen**

In der Untergruppe der LD-SFN fanden wir in den Biopsien aus betroffener Haut lokal erhöhte Genexpressionen von TNF, IL-1, IL-6 und IL-8.

Es gibt Hinweise darauf, dass Keratinozyten der Haut eine Quelle für die nachgewiesenen Zytokine sein könnten und dass eine sehr enge Interaktion zwischen Keratinozyten und Axonen besteht (Dussor et al. 2009). So konnte nachgewiesen werden, dass Keratinozyten den Capsaicin-Rezeptor Transient Receptor Potential cation channel V1 (TRPV1) exprimieren und es nach seiner Aktivierung zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-8 und Prostaglandin E2, die pro-inflammatorisch wirken, kommt (Southall et al. 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass es beim CRPS in erster Linie die Keratinozyten sind, die pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren (NGF) ausschütten (Li et al. 2010). Das NGF aus den Keratinozyten wiederum bedingt eine Hyperexzitabilität von benachbarten Axonen (Radtke et al. 2010).

Keratinozyten spielen auch eine Rolle bei der Regeneration von IENF (Chen et al. 2010). Hinzu kommt, dass Keratinozyten, ähnlich wie Nervenfasern der Haut, in der Lage sind, Rezeptoren für verschiedene äußere Reize (Denda et al. 2007; Huang et al. 2008) und Ionenkanäle (Zhao et al. 2008) zu exprimieren. Damit liegt die Vermutung nahe, dass Keratinozyten eine aktive Rolle im nozizeptiven System spielen.

Als eine weitere lokale Zytokinquelle kommen Schwann-Zellen in Frage. Diese schütten während der Wallerschen Degeneration viele Faktoren, u.a. Zytokine und Chemokine, aus und sorgen u.a. durch die Anlockung und Einwanderung von Abwehrzellen, insbesondere von Makrophagen, für eine lokale Entzündungsreaktion (Martini et al. 2008; Camara-Lemarroy et al. 2010). Aus unseren Daten lassen sich bezüglich der Schwann-Zellen als Zytokinquelle keine Aussagen treffen.

Weiterhin könnten die lokalen Nervenfasern der Haut eine Quelle dieser Zytokine sein. Es wäre denkbar, dass Axone als Antwort auf eine Schädigung und im Rahmen von Regenerationsvorgängen unter anderem pro-inflammatorische Zytokine ausschütten. Belege hierfür liefern Daten, die zeigen, dass in verletzten Neuronen die Synthese von IL-6 erhöht ist (Richardson et al. 2009) und dass pro-inflammatorische Faktoren wie Calcitonin gene related peptide (CGRP) und TNF einem gesteigerten antegraden axonalen Transport im Falle einer neuronalen Verletzung distal des neuronalen Zellkörpers unterliegen (Schäfers et al. 2002). Diese Daten könnten die erhöhten lokalen pro-inflammatorischen Zytokine bei unseren Patienten mit LD-SFN erklären.

#### **4.5.2 Mögliche systemische Zytokinquellen**

Bei SFN-Patienten fanden sich erhöhte systemische Genexpressionen von IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$ 1. Es stellt sich zum einen die Frage woher diese systemisch nachweisbaren Zytokine stammen und zum anderen welchen pathophysiologischen Anteil sie an der Schmerzentstehung bei der SFN haben.

Es wäre ein Mechanismus denkbar bei dem eine lokale Ausschüttung von anti-algetischen Zytokinen bei entzündlichen Vorgängen im Sinne einer Gegenregulation stattfindet. Die freigesetzten Zytokine könnten dann als Ziel übergeordnete zentrale nozizeptive und anti-nozizeptive Instanzen haben, um auf systemischer Ebene der lokalen Entwicklung von Schmerzen entgegenzuwirken. So konnte unter anderem in einem Tiermodell gezeigt werden, dass die direkte intrathekale Injektion von IL-10 zu einer Verminderung von Allodynie und Hyperalgesie bei Versuchstieren nach CCI führte (Milligan et al. 2005). Umgekehrt konnte man nachweisen, dass peripher ausgeschüttetes und systemisch wirksames IL-6 im ZNS zu einer Sensibilisierung des nozizeptiven Systems führt (Oka et al. 2007).

Es könnten auch systemisch ausgeschüttete anti-inflammatorische Zytokine lokal eine antinozizeptive Wirkung entfalten. So kommen als Quelle Th2-Lymphozyten in



Frage, die anti-inflammatorische Zytokine produzieren und so schmerzassoziertes Verhalten bei Versuchstieren aufheben können (Moalem et al. 2004; Soderquist et al. 2010).

#### **4.6 Zum möglichen lokalen Einfluss von Zytokinen auf die Nozizeptoren der Haut**

Die lokal erhöhte Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine könnte zu einem lokalen Ungleichgewicht zugunsten pro-algetischer Mediatoren führen und die Schmerzphänomene der SFN-Patienten hervorrufen.

Es gibt zahlreiche Belege dafür, dass pro-inflammatorische Zytokine Axone sensibilisieren können. So konnte gezeigt werden, dass sich nach lokaler Stimulation von verletzten Axonen mit TNF eine Allodynie (Schäfers et al. 2003) und ektopische Aktivität ohne Beteiligung von Nozizeptoren entwickelt (Sorkin et al. 1997).

Zusätzlich sorgt TNF über die Regulation der Ausschüttung von NGF (Woolf et al. 1997) für eine NGF-vermittelte erhöhte Genexpression des Capsaicin-Rezeptors TRPV1 (Cortright und Szallasi 2004). Gestützt werden diese Beobachtungen von Daten, die belegen, dass es in vitro bei isolierten sensiblen Neuronen im Beisein von TNF zu einer erhöhten Empfindlichkeit für Capsaicin kommt (Nicol et al. 1997).

#### **4.7 Unterschiedliche Modalitäten von C-Fasern**

Es ist bekannt, dass C-Fasern nicht ausschließlich nozizeptive Reize detektieren und weiterleiten. So gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass Untergruppen von C-Fasern für die Perzeption und Propagation von Juckreiz zuständig sind (Boulais und Misery 2008; Schuhknecht et al. 2011; Ständer et al. 2011). Zudem gibt es enge gegenläufige Interaktionen zwischen Juckreiz und Schmerz. So bedingen schmerzhafte Reize eine Verminderung der Wahrnehmung von juckenden Reizen. Andererseits können analgetisch wirksame Opioide Juckreize auslösen (Ikoma et al. 2006).

Diese Fakten deuten darauf hin, dass die in den histologischen Schnitten mit PGP9.5 dargestellten IENF nicht ausschließlich dem nozizeptiven System untergeordnet sind. Wir müssen annehmen, dass bei einer Reduktion der IENFD nicht ausschließlich nozizeptive dünn-bemerkte C-Fasern, sondern auch C-Fasern des prurigeren Systems betroffen sind.

Dies wirft ein neues Licht auf unsere Hypothese, dass die Schmerzen unserer SFN-Patienten im Rahmen einer Sensibilisierung der verbliebenen dünn-bemerkten nozizeptiven Fasern durch pro-inflammatorische Zytokine hervorgerufen werden. Unter Berücksichtigung der Interaktionen zwischen dem nozizeptiven und prurigergen System wäre es denkbar, dass zusätzlich zum Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen durch die Reduktion IENFD es zu einem Ungleichgewicht antagonistischer nozizeptiver und prurigerrer Effekte kommt und so in einer lokalen Entstehung von Schmerz mündet.

#### **4.8 Klinische Bedeutung unserer Daten**

Wir konnten zeigen, dass es bei der SFN zwei Subgruppen gibt (LD-SFN und NLD-SFN), die sich in ihrem lokalen Zytokinexpressionsprofil unterscheiden. Folglich könnte der Nachweis von lokal erhöhten Genexpressionen pro-inflammatorischer Zytokine in der Diagnostik hilfreich sein, Patienten mit einer LD-SFN ausfindig zu machen und damit einer lokalen anti-inflammatorischen Therapie zuzuführen.

In Bezug auf systemisch angewendete Zytokininhibitoren existieren bereits viele im klinischen Alltag verwendete und weitere vielversprechende noch experimentelle Substanzen. So sind zahlreiche etablierte Rezeptorinhibitoren und Antagonisten von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Anakinra, Adalimumab, Etanercept und Infliximab nicht mehr aus dem klinischen Alltag bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis und anderen entzündlichen Erkrankungen wegzudenken (Singh et al. 2009; Ren und Dubner 2010). Zudem gibt es erste tierexperimentelle Hinweise auf eine Wirksamkeit von Etanercept und Infliximab bei der Linderung von schmerzassoziiertem Verhalten (Chen et al. 2011; Dogrul et al. 2011; Watanabe et al. 2011).

Durch unsere Daten könnte die Entwicklung und Anwendung von lokal anwendbaren, weniger nebenwirkungsträchtigen anti-inflammatorischen Substanzen an Bedeutung gewinnen.

#### **4.9 Kritikpunkte und offene Fragen**

In diese Studie wurde nur eine kleine Zahl an Patienten- und gesunden Kontrollprobanden eingeschlossen. Zudem war es nicht möglich aufgrund der Größe der Hautbiopsien genügend Material für vergleichende lokale Zytokindaten auf Proteinebene zu sammeln. Folglich konnten wir nicht nachverfolgen, ob die lokal

erhöhten Genexpressionen der pro-inflammatorischen Zytokine der Patienten mit LD-SFN tatsächlich im selben Maße auf Proteinebene translatiert werden, um die vermuteten pathophysiologischen Vorgänge zu induzieren.

Weiterhin offen bleibt die Frage nach dem Stellenwert der Zytokine innerhalb des Netzwerkes von pro-algetischen und anti-algetischen Substanzen und deren Einfluss auf die Entwicklung und Unterhaltung von Schmerz. Das Zusammenspiel eines pro-algetischen „inflammatorischen Cocktails“ bei der Entwicklung von Schmerz scheint weitaus schlüssiger zu sein als die alleinige Wirkung von Zytokinen (Kessler et al. 1992; Ma et al. 2006; Maingret et al. 2008; Üçeyler et al. 2009).

Es gibt Hinweise, dass eine Untergruppe von nicht-bemerkten C-Fasern bei der Detektion und Fortleitung von Juckreizen (Boulais und Misery 2008; Schuhknecht et al. 2011; Ständer et al. 2011) eine wichtige Rolle spielen. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, ob der Untergang von nicht-bemerkten C-Fasern zu einem Ungleichgewicht zwischen antagonistischen nozizeptiven und prurigergen Effekten führt. Dies könnte zu einer lokalen Entstehung von Schmerz führen. Mit unseren Daten kann keine Aussage gemacht werden, ob die Reduktion der IENFD ausschließlich auf Kosten der nozizeptiven Fasern geht und ob nicht noch weitere Pathomechanismen bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz eine tragende Rolle spielen.

#### **4.10 Ausblick**

Weitere Studien mit einem größeren Patienten- und Kontrollkollektiv sind notwendig, um unsere Daten zu bestätigen. Dabei wäre eine Möglichkeit verlässliche vergleichende Daten zwischen lokalen quantitativen Protein- und Genexpressionsanalysen von Zytokinen zu sammeln, indem zum einen größere Hautbiopsien entnommen werden und zum anderen zusätzliche Methoden, wie Zellkulturen menschlicher Haut, angewendet werden würden.

#### **4.11 Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob Patienten mit SFN eine lokal und systemisch erhöhte Expression pro-inflammatorischer und algetischer Zytokine haben. Es wurden 24 Patienten mit SFN und insgesamt 72 gesunde Probanden von 2005 bis 2008 prospektiv rekrutiert und die Zytokinexpressionsprofile von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen aus Blut- und Hautproben gemessen.

Die Patienten wurden nach Prüfung der klinischen Einschlusskriterien (Lacomis 2002) mittels neurologischer Untersuchung, elektrophysiologischer Tests, der QST und ausführlichen Laborbestimmungen untersucht. Zudem wurden Daten mit etablierten klinischen Schmerzfragebögen (GCPS, NPSI, Kurzform des McGill) und der Allgemeinen Depressionsskala erhoben (ADS).

Entsprechend einem standardisierten Protokoll wurden den Patienten und gesunden Kontrollen Blut- und Hautproben entnommen und asserviert. Aus diesen wurden anschließend die Gesamt-RNA extrahiert und mittels reverser und quantitativer real-time PCR die Expressionen von ausgewählten pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen gemessen. Immunhistochemisch erfolgte die Bestimmung der IENFD aus proximalen und distalen Hautproben der eingeschlossenen SFN-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Zudem wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von Entzündungszellen in den Hautbiopsaten durchgeführt.

Bei der Analyse der IENFD der SFN-Patienten konnten zwei Untergruppen unterschieden werden. Bei Patienten mit einer „längenabhängigen SFN“ (length-dependent SFN, LD-SFN) konnten normale proximale und stark verminderte distale Werte der IENFD nachgewiesen werden (Quotient  $\geq 5$  bei Verhältnis der IENFD der proximalen zur distalen Hautbiopsie). Bei der Untergruppe mit „nicht-längenabhängiger SFN“ (non-length-dependent SFN, NLD-SFN) zeigte sich ein kleineres Verhältnis bei gleichzeitig verminderter IENFD in den proximalen und distalen Biopsien.

Auf lokaler Ebene konnten in den distalen Hautbiopsien von Patienten mit LD-SFN sowohl intra- wie interindividuell im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant erhöhte Genexpressionen der pro-inflammatorischen und algetischen Zytokine TNF, IL-1, IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden. Diese waren unabhängig von lokal anwesenden T-Zellen und Makrophagen. Auf systemischer Ebene waren in den Seren von SFN-Patienten erhöhte Genexpressionen von IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$ 1 nachweisbar.

Die erhobenen Daten der klinischen Fragebögen NPSI, GCPS, McGill und ADS zeigten keine Korrelation mit den Zytokinexpressionsdaten der SFN-Patienten. Allerdings wurde sichtbar, dass die Untergruppe mit der LD-SFN im Vergleich zur Untergruppe mit NLD-SFN insgesamt stärker von Schmerzen betroffen und bei täglichen Aktivitäten stärker eingeschränkt war.

Zusammenfassend konnte durch unsere Daten die eingangs gestellte Hypothese, dass Patienten mit SFN eine lokal und systemisch erhöhte Expression proinflammatorischer und algetischer Zytokine haben, auf lokaler Ebene bei der Untergruppe mit LD-SFN bestätigt werden. Bei der Untergruppe mit NLD-SFN waren keine Unterschiede bei den Zytokinexpressionen zwischen proximalen und distalen Hautbiopsien im Vergleich zu Kontrollprobanden nachweisbar. Zudem zeigten sich deutliche Unterschiede bei den Quotienten der IENFD zwischen beiden Untergruppen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Unterteilung in LD-SFN und NLD-SFN klinisch bedeutsam und ein möglicher Grundstein für das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der SFN sein könnte. Hieraus könnten sich Fortschritte in der Diagnostik ergeben und gezielte symptomatische und vielleicht sogar kausale Therapien auf lokaler Ebene bei der SFN entwickeln.

## 5. Literaturverzeichnis

- Al-Shatti, T., A. E. Barr, et al. (2005). "Increase in inflammatory cytokines in median nerves in a rat model of repetitive motion injury." Journal of Neuroimmunology **167**: 13-22.
- Al-Shekhlee, A., T. C. Chelimsy, et al. (2002). "Review: small-fiber neuropathy." Neurologist **8**: 237-53.
- Alexander, G. M., M. A. van Rijn, et al. (2005). "Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS." Pain **116**: 213-9.
- Austin, P. J. und G. Moalem-Taylor (2010). "The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines." Journal of Neuroimmunology **229**: 26-50.
- Backonja, M., A. Beydoun, et al. (1998). "Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial." Jama **280**: 1831-6.
- Baron, R., A. Binder, et al. (2010). "Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment." Lancet Neurol **9**: 807-19.
- Bednarik, J., E. Vlckova-Moravcova, et al. (2009). "Etiology of small-fiber neuropathy." J Peripher Nerv Syst **14**: 177-83.
- Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." Pain **33**: 87-107.
- Bornmyr, S., H. Svensson, et al. (1998). "Finger skin blood flow in response to indirect cooling in normal subjects and in patients before and after sympathectomy." Clin Physiol **18**: 103-7.
- Boulais, N. und L. Misery (2008). "The epidermis: a sensory tissue." Eur J Dermatol **18**: 119-27.
- Bradley, W. G., I. J. Karlsson, et al. (1977). "Metronidazole neuropathy." Br Med J **2**: 610-1.
- Brat, D. J., A. C. Bellail, et al. (2005). "The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis." Neuro Oncol **7**: 122-33.
- Bright, J. J., L. D. Kerr, et al. (1997). "TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes." J Immunol **159**: 175-83.

- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**: 169-93.
- Camara-Lemarroy, C. R., F. J. Guzman-de la Garza, et al. (2010). "Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration." Neuroimmunomodulation **17**: 314-24.
- Campbell, J. N. und R. A. Meyer (2006). "Mechanisms of neuropathic pain." Neuron **52**: 77-92.
- Chai, J., D. N. Herrmann, et al. (2005). "Painful small-fiber neuropathy in Sjogren syndrome." Neurology **65**: 925-7.
- Chen, A. C., D. M. Niddam, et al. (2001). "Contact heat evoked potentials as a valid means to study nociceptive pathways in human subjects." Neurosci Lett **316**: 79-82.
- Chen, B., Y. Li, et al. (2011). "Blocking TNF- $\alpha$  with infliximab alleviates ovariectomy induced mechanical and thermal hyperalgesia in rats." Neurological Sciences: 1-7.
- Cheng, C., G. F. Guo, et al. (2010). "Dynamic plasticity of axons within a cutaneous milieu." J Neurosci **30**: 14735-44.
- Chin, R. L. und N. Latov (2005). "Peripheral Neuropathy and Celiac Disease." Curr Treat Options Neurol **7**: 43-48.
- Chong, P. S. and D. P. Cros (2004). "Technology literature review: quantitative sensory testing." Muscle Nerve **29**: 734-47.
- Cortright, D. N. and A. Szallasi (2004). "Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update." Eur J Biochem **271**: 1814-9.
- Dabby, R., R. Gilad, et al. (2006). "Acute steroid responsive small-fiber sensory neuropathy: a new entity?" Journal of the Peripheral Nervous System **11**: 47-52.
- Del Prete, G., M. De Carli, et al. (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." J Immunol **150**: 353-60.
- Denda, M., M. Nakatani, et al. (2007). "Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system." Exp Dermatol **16**: 157-61.
- Devigili, G., V. Tugnoli, et al. (2008). "The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology." Brain.

- Dinarello, C. A., J. G. Cannon, et al. (1986). "Multiple biological activities of human recombinant interleukin 1." J Clin Invest **77**: 1734-9.
- Dinarello, C. A. und J. W. Mier (1986). "Interleukins." Annu Rev Med **37**: 173-8.
- Dogrul, A., H. Gul, et al. (2011). "Systemic and spinal administration of etanercept, a tumor necrosis factor alpha inhibitor, blocks tactile allodynia in diabetic mice." Acta Diabetologica **48**: 135-142.
- Donnelly, R. P., H. Dickensheets, et al. (1999). "The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes." J Interferon Cytokine Res **19**: 563-73.
- Dotson, R. M. (1997). "Clinical neurophysiology laboratory tests to assess the nociceptive system in humans." J Clin Neurophysiol **14**: 32-45.
- Dussor, G., H. R. Koerber, et al. (2009). "Nucleotide signaling and cutaneous mechanisms of pain transduction." Brain Res Rev **60**: 24-35.
- Dutsch, M., H. Marthol, et al. (2002). "Small fiber dysfunction predominates in Fabry neuropathy." J Clin Neurophysiol **19**: 575-86.
- Feldman, E. L. (2003). "Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem." J Clin Invest **111**: 431-3.
- Fink, E. und A. L. Oaklander (2006). "Small-fiber neuropathy: answering the burning questions." Sci Aging Knowledge Environ **2006**: pe7.
- Fleige, S., V. Walf, et al. (2006). "Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR." Biotechnol Lett **28**: 1601-13.
- Freeman, R., E. Durso-Decruz, et al. (2008). "Efficacy, safety, and tolerability of pregabalin treatment for painful diabetic peripheral neuropathy: findings from seven randomized, controlled trials across a range of doses." Diabetes Care **31**: 1448-54.
- Gimbel, J. S., P. Richards, et al. (2003). "Controlled-release oxycodone for pain in diabetic neuropathy: a randomized controlled trial." Neurology **60**: 927-34.
- Giulietti, A., L. Overbergh, et al. (2001). "An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression." Methods **25**: 386-401.
- Goransson, L. G., A. B. Tjensvoll, et al. (2006). "Small-diameter nerve fiber neuropathy in systemic lupus erythematosus." Arch Neurol **63**: 401-4.
- Gorson, K. C., D. N. Herrmann, et al. (2008). "Non-length dependent small fibre neuropathy/ganglionopathy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **79**: 163-9.



- Gur, A., M. Karakoc, et al. (2002). "Regional cerebral blood flow and cytokines in young females with fibromyalgia." Clin Exp Rheumatol **20**: 753-60.
- Hao, S., M. Mata, et al. (2006). "HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain." Mol Pain **2**: 6.
- Harada, A., N. Sekido, et al. (1994). "Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation." J Leukoc Biol **56**: 559-64.
- Harati, Y., C. Gooch, et al. (1998). "Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy." Neurology **50**: 1842-6.
- Hautzinger, M., Bailer, M. (1993). "Allgemeine Depressionsskala." Manual Weinheim Beltz Test Gesellschaft.
- Heinrich, P. C., Haan, S. et al. (2007). Einteilung der Zytokine. Biochemie und Pathobiochemie. Heidelberg, Springer Medizin Verlag. **7**: 777-779.
- Hilz, M. J., M. J. Hecht, et al. (2000). "Abnormal vasoreaction to arousal stimuli--an early sign of diabetic sympathetic neuropathy demonstrated by laser Doppler flowmetry." J Clin Neurophysiol **17**: 419-25.
- Ho, T. W., M. Backonja, et al. (2009). "Efficient assessment of neuropathic pain drugs in patients with small fiber sensory neuropathies." Pain **141**: 19-24.
- Hoitsma, E., M. Marziniak, et al. (2002). "Small fibre neuropathy in sarcoidosis." Lancet **359**: 2085-6.
- Hoitsma, E., J. P. Reulen, et al. (2004). "Small fiber neuropathy: a common and important clinical disorder." J Neurol Sci **227**: 119-30.
- Holland, N. R., T. O. Crawford, et al. (1998). "Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases." Ann Neurol **44**: 47-59.
- Horwitz, D. A., S. G. Zheng, et al. (2003). "The role of the combination of IL-2 and TGF- $\beta$  or IL-10 in the generation and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>regulatory T cell subsets." J Leukoc Biol **74**: 471-478.
- Hu, D. E., Y. Hori, et al. (1993). "Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats." Inflammation **17**: 135-43.
- Huang, S. M., H. Lee, et al. (2008). "Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2." J Neurosci **28**: 13727-37.
- Huygen, F. J., A. G. De Bruijn, et al. (2002). "Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1." Mediators Inflamm **11**: 47-51.

- Ikoma, A., M. Steinhoff, et al. (2006). "The neurobiology of itch." Nat Rev Neurosci **7**: 535-547.
- Kessler, W., C. Kirchhoff, et al. (1992). "Excitation of cutaneous afferent nerve endings in vitro by a combination of inflammatory mediators and conditioning effect of substance P." Exp Brain Res **91**: 467-76.
- Kimura (2001). Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscles: Principles and practice. New York, Oxford University Press.
- Kishimoto, T., S. Akira, et al. (1992). "Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines." Science **258**: 593-7.
- Klausner, J. D., V. H. Freedman, et al. (1996). "Thalidomide as an Anti-TNF-[alpha] Inhibitor: Implications for Clinical Use." Clinical Immunology and Immunopathology **81**: 219-223.
- Koike, H., K. Mori, et al. (2001). "Painful alcoholic polyneuropathy with predominant small-fiber loss and normal thiamine status." Neurology **56**: 1727-32.
- Koike, H. und G. Sobue (2006). "Alcoholic neuropathy." Curr Opin Neurol **19**: 481-6.
- Kovacs, E. J. und K. A. Messingham (2002). "Influence of alcohol and gender on immune response." Alcohol Res Health **26**: 257-63.
- Lacomis, D. (2002). "Small-fiber neuropathy." Muscle Nerve **26**: 173-88.
- Lauria, G. (2005). "Small fibre neuropathies." Curr Opin Neurol **18**: 591-7.
- Lauria, G., D. R. Cornblath, et al. (2005). "EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy." Eur J Neurol **12**: 747-58.
- Lauria, G., S. T. Hsieh, et al. "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." Eur J Neurol **17**: 903-12, e44-9.
- Lauria, G., A. Majorana, et al. (2005). "Trigeminal small-fiber sensory neuropathy causes burning mouth syndrome." Pain **115**: 332-7.
- Lawrence, D. A. (1996). "Transforming growth factor-beta: a general review." Eur Cytokine Netw **7**: 363-74.
- Lawrence, D. A. (2001). "Latent-TGF-beta: an overview." Mol Cell Biochem **219**: 163-70.

- Lefaucheur, J. P. and A. Creange (2004). "Neurophysiological testing correlates with clinical examination according to fibre type involvement and severity in sensory neuropathy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75**: 417-22.
- Létourneau, S., C. Krieg, et al. (2009). "IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets." Journal of Allergy and Clinical Immunology **123**: 758-762.
- Li, W. W., T. Z. Guo, et al. (2010). "Fracture induces keratinocyte activation, proliferation, and expression of pro-nociceptive inflammatory mediators." Pain **151**: 843-52.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**: 402-8.
- Lo, Y. L., T. H. Leoh, et al. (2003). "Statin therapy and small fibre neuropathy: a serial electrophysiological study." J Neurol Sci **208**: 105-8.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**: 487-501.
- Low, P. A. (2004). "Evaluation of sudomotor function." Clin Neurophysiol **115**: 1506-13.
- Ma, C., K. W. Greenquist, et al. (2006). "Inflammatory mediators enhance the excitability of chronically compressed dorsal root ganglion neurons." J Neurophysiol **95**: 2098-107.
- Magda, P., N. Latov, et al. (2002). "Quantitative sensory testing: high sensitivity in small fiber neuropathy with normal NCS/EMG." J Peripher Nerv Syst **7**: 225-8.
- Maihofner, C., H. O. Handwerker, et al. (2005). "Mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a role for TNF-alpha?" Neurology **65**: 311-3.
- Maingret, F. o., B. Coste, et al. (2008). "Inflammatory Mediators Increase Nav1.9 Current and Excitability in Nociceptors through a Coincident Detection Mechanism." The Journal of General Physiology **131**: 211-225.
- Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." Annu Rev Immunol **26**: 453-79.
- Manzella, D., M. Barbieri, et al. (2001). "Chronic administration of pharmacologic doses of vitamin E improves the cardiac autonomic nervous system in patients with type 2 diabetes." Am J Clin Nutr **73**: 1052-7.
- Marchand, F., M. Perretti, et al. (2005). "Role of the immune system in chronic pain." Nat Rev Neurosci **6**: 521-32.

- Martini, R., S. Fischer, et al. (2008). "Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease." Glia **56**: 1566-77.
- Max, M. B., M. Culnane, et al. (1987). "Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood." Neurology **37**: 589-96.
- McLean, W. G. (1997). "The role of axonal cytoskeleton in diabetic neuropathy." Neurochem Res **22**: 951-6.
- Medori, R., L. Autilio-Gambetti, et al. (1988). "Changes in axon size and slow axonal transport are related in experimental diabetic neuropathy." Neurology **38**: 597-601.
- Melzack, R. (1987). "The short-form McGill Pain Questionnaire." Pain **30**: 191-7.
- Milligan, E. D., S. J. Langer, et al. (2005). "Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10." Eur J Neurosci **21**: 2136-48.
- Milligan, E. D., S. J. Langer, et al. (2005). "Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10." European Journal of Neuroscience **21**: 2136-2148.
- Milligan, E. D., E. M. Sloane, et al. (2006). "Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain." Pain **126**: 294-308.
- Moalem, G., K. Xu, et al. (2004). "T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats." Neuroscience **129**: 767-777.
- Mosser, D. M. und X. Zhang (2008). "Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine." Immunol Rev **226**: 205-18.
- Mueller, D., M. Obermann, et al. (2010). "Electrically evoked nociceptive potentials for early detection of diabetic small-fiber neuropathy." Eur J Neurol **17**: 834-41.
- Namaka, M., C. R. Gramlich, et al. (2004). "A treatment algorithm for neuropathic pain." Clin Ther **26**: 951-79.
- Nebuchennykh, M., S. Loseth, et al. (2009). "The value of skin biopsy with recording of intraepidermal nerve fiber density and quantitative sensory testing in the assessment of small fiber involvement in patients with different causes of polyneuropathy." J Neurol **256**: 1067-75.
- Nicol, G. D., J. C. Lopshire, et al. (1997). "Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons." J Neurosci **17**: 975-82.

- Nijsten, M. W. N., E. R. De Groot, et al. (1987). "SERUM LEVELS OF INTERLEUKIN-6 AND ACUTE PHASE RESPONSES." The Lancet **330**: 921-921.
- Nishimoto, N., T. Kishimoto, et al. (2000). "Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease." Ann Rheum Dis **59 Suppl 1**: i21-7.
- Novak, V., M. L. Freimer, et al. (2001). "Autonomic impairment in painful neuropathy." Neurology **56**: 861-8.
- O'Brien, G. S., S. M. Martin, et al. (2009). "Developmentally Regulated Impediments to Skin Reinnervation by Injured Peripheral Sensory Axon Terminals." Current Biology **19**: 2086-2090.
- O'Garra, A. und P. Vieira (2007). "TH1 cells control themselves by producing interleukin-10." Nat Rev Immunol **7**: 425-428.
- Oka, T., S. Aou, et al. (1993). "Intracerebroventricular injection of interleukin-1[beta] induces hyperalgesia in rats." Brain Research **624**: 61-68.
- Oka, Y., T. Ibuki, et al. (2007). "Interleukin-6 is a candidate molecule that transmits inflammatory information to the CNS." Neuroscience **145**: 530-538.
- Okamoto, K., D. P. Martin, et al. (2001). "Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain." Exp Neurol **169**: 386-91.
- Orstavik, K., I. Norheim, et al. (2006). "Pain and small-fiber neuropathy in patients with hypothyroidism." Neurology **67**: 786-91.
- Parry, G. J. und M. J. Brown (1982). "Selective fiber vulnerability in acute ischemic neuropathy." Ann Neurol **11**: 147-54.
- Pedersen, B. K. and A. D. Toft (2000). "Effects of exercise on lymphocytes and cytokines." Br J Sports Med **34**: 246-51.
- Pereira, L. S., D. L. Ferreira-Alves, et al. (2003). "Reduced production of hyperalgesic substances by mononuclear cells from aged rats incubated with carrageenan: role of interleukin 2 and prostaglandins." Inflamm Res **52**: 119-25.
- Periquet, M. I., V. Novak, et al. (1999). "Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy." Neurology **53**: 1641-7.
- Polydefkis, M., C. T. Yiannoutsos, et al. (2002). "Reduced intraepidermal nerve fiber density in HIV-associated sensory neuropathy." Neurology **58**: 115-9.

- Radtke, C., P. M. Vogt, et al. (2010). "Keratinocytes acting on injured afferents induce extreme neuronal hyperexcitability and chronic pain." Pain **148**: 94-102.
- Ramos-Mondragon, R., C. A. Galindo, et al. (2008). "Role of TGF-beta on cardiac structural and electrical remodeling." Vasc Health Risk Manag **4**: 1289-300.
- Raskin, J., F. Wang, et al. (2006). "Duloxetine for patients with diabetic peripheral neuropathic pain: a 6-month open-label safety study." Pain Med **7**: 373-85.
- Ren, K. und R. Dubner (2010). "Interactions between the immune and nervous systems in pain." Nat Med **16**: 1267-76.
- Richardson, P. M., T. Miao, et al. (2009). "Responses of the nerve cell body to axotomy." Neurosurgery **65**(4 Suppl): A74-9.
- Richter, R. W., R. Portenoy, et al. (2005). "Relief of painful diabetic peripheral neuropathy with pregabalin: a randomized, placebo-controlled trial." J Pain **6**: 253-60.
- Rolke, R., R. Baron, et al. (2006). "Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values." Pain **123**: 231-43.
- Rothkrantz-Kos, S., M. Drent, et al. (2002). "Decreased redox state in red blood cells from patients with sarcoidosis." Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **19**: 114-20.
- Sadosky, A., A. M. McDermott, et al. (2008). "A review of the epidemiology of painful diabetic peripheral neuropathy, postherpetic neuralgia, and less commonly studied neuropathic pain conditions." Pain Pract **8**: 45-56.
- Sandroni, P. und P. A. Low (2001). "Autonomic peripheral neuropathies: clinical presentation, diagnosis, and treatment." J Clin Neuromuscul Dis **2**: 147-57.
- Schäfers, M., C. Geis, et al. (2002). "Anterograde Transport of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in the Intact and Injured Rat Sciatic Nerve." The Journal of Neuroscience **22**: 536-545.
- Schäfers, M., D. H. Lee, et al. (2003). "Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation." J Neurosci **23**: 3028-38.
- Schneinert, P. (1997). "Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)." BioTec
- Schütt, C., und Bröker, B. (2009). Chemokine und Chemokinrezeptoren. Grundwissen Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag. **2**: 79-81.

- Schütt, C., und Bröker, B. (2009). Zytokine und ihre Rezeptoren. Grundwissen Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag. **2**: 244-248.
- Schütt, C., und Bröker, B. (2009). Zytokine und Zytokinrezeptoren. Grundwissen Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag. **2**: 71-74.
- Schütt, C., und Bröker, B. (2009). Dendritische Zellen im Zentrum der Macht. Grundwissen Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag. **2**: 74-76.
- Schuhknecht, B., M. Marziniak, et al. (2011). "Title. Reduced intraepidermal nerve fiber density in lesional and non-lesional prurigo nodularis skin as potential sign of subclinical cutaneous neuropathy." British Journal of Dermatology: no-no.
- Seneviratne, U. und S. Gunasekera (2002). "Acute small fibre sensory neuropathy: another variant of Guillain-Barre syndrome?" J Neurol Neurosurg Psychiatry **72**: 540-2.
- Sholl-Franco, A., A. G. da Silva, et al. (2009). "Interleukin-4 as a neuromodulatory cytokine: roles and signaling in the nervous system." Ann N Y Acad Sci **1153**: 65-75.
- Shukla, G., M. Bhatia, et al. (2005). "Quantitative thermal sensory testing -- value of testing for both cold and warm sensation detection in evaluation of small fiber neuropathy." Clin Neurol Neurosurg **107**: 486-90.
- Singh, J. A., R. Christensen, et al. (2009). "Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews." Cochrane Database Syst Rev: CD007848.
- Soderquist, R. G., E. M. Sloane, et al. (2010). "Release of plasmid DNA-encoding IL-10 from PLGA microparticles facilitates long-term reversal of neuropathic pain following a single intrathecal administration." Pharm Res **27**: 841-54.
- Sommer, C. und G. Lauria (2007). "Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy." Lancet Neurol **6**: 632-42.
- Sommer, C., M. Marziniak, et al. (1998). "The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve." Pain **74**: 83-91.
- Sommer, C., S. Petrusch, et al. (1999). "Neutralizing antibodies to interleukin 1-receptor reduce pain associated behavior in mice with experimental neuropathy." Neurosci Lett **270**: 25-8.

- Sommer, C., H. Richter, et al. (2011). "A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the neuropathic pain symptom inventory (NPSI)." BMC Neurol **11**: 104.
- Sommer, C., M. Schäfers, et al. (2001). "Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy." J Peripher Nerv Syst **6**: 67-72.
- Song, P., W. Lie-Cheng, et al. (2002). "Interleukin-2 regulates membrane potentials and calcium channels via mu opioid receptors in rat dorsal root ganglion neurons." Neuropharmacology **43**: 1324-9.
- Sorensen, L., L. Molyneaux, et al. (2006). "The relationship among pain, sensory loss, and small nerve fibers in diabetes." Diabetes Care **29**: 883-7.
- Sorkin, L. S., W. H. Xiao, et al. (1997). "Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres." Neuroscience **81**: 255-62.
- Southall, M. D., T. Li, et al. (2003). "Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes." J Pharmacol Exp Ther **304**: 217-22.
- Ständer, S., U. Raap, et al. (2011). "Pathogenesis of pruritus." JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft: no-no.
- Stewart, J. D., P. A. Low, et al. (1992). "Distal small fiber neuropathy: results of tests of sweating and autonomic cardiovascular reflexes." Muscle Nerve **15**: 661-5.
- Treede, R. D., T. S. Jensen, et al. (2008). "Neuropathic pain." Neurology **70**: 1630-1635.
- Üçeyler, N., T. Eberle, et al. (2007). "Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome." Pain **132**: 195-205.
- Üçeyler, N., J. P. Rogausch, et al. (2007). "Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies." Neurology **69**: 42-9.
- Üçeyler, N., M. Schäfers, et al. (2009). "Mode of action of cytokines on nociceptive neurons." Exp Brain Res **196**: 67-78.
- Üçeyler, N. und C. Sommer (2008). "Status of immune mediators in painful neuropathies." Curr Pain Headache Rep **12**: 159-64.
- Üçeyler, N., A. Tschärke, et al. (2008). "Early cytokine gene expression in mouse CNS after peripheral nerve lesion." Neuroscience Letters **436**: 259-264.
- Üçeyler, N., R. Valenza, et al. (2006). "Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain." Arthritis Rheum **54**: 2656-64.



- Vale, M. L., J. B. Marques, et al. (2003). "Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats." J Pharmacol Exp Ther **304**: 102-8.
- Valeriani, M., D. Le Pera, et al. (2002). "Dipolar modelling of the scalp evoked potentials to painful contact heat stimulation of the human skin." Neurosci Lett **318**: 44-8.
- Vlčková-Moravcová, E., J. Bednařík, et al. (2008). "Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain." Diabet Med **25**: 692-9.
- Vlčková-Moravcová, E., J. Bednařík, et al. (2008). "Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies." Muscle Nerve **37**: 50-60.
- Von Korff, M., J. Ormel, et al. (1992). "Grading the severity of chronic pain." Pain **50**: 133-49.
- Wagner, R. und R. R. Myers (1996). "Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors." Neuroreport **7**: 2897-901.
- Wallace, D. J., M. Linker-Israeli, et al. (2001). "Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study." Rheumatology (Oxford) **40**: 743-9.
- Watanabe, K., S. Yabuki, et al. (2011). "Etanercept attenuates pain-related behavior following compression of the dorsal root ganglion in the rat." European Spine Journal: 1-8.
- Weiss, D. L. und M. A. Brown (2001). "Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression." Immunol Rev **179**: 35-47.
- Wise, T. N., D. A. Fishbain, et al. (2007). "Painful physical symptoms in depression: a clinical challenge." Pain Med **8 Suppl 2**: S75-82.
- Wolfe, G. I., N. S. Baker, et al. (1999). "Chronic cryptogenic sensory polyneuropathy: clinical and laboratory characteristics." Arch Neurol **56**: 540-7.
- Woolf, C. J., A. Allchorne, et al. (1997). "Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha." Br J Pharmacol **121**: 417-24.
- Yao, M. Z., J. F. Gu, et al. (2003). "Adenovirus-mediated interleukin-2 gene therapy of nociception." Gene Ther **10**: 1392-9.

- Zelenka, M., M. Schäfers, et al. (2005). "Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain." Pain **116**: 257-63.
- Zhao, P., T. P. Barr, et al. (2008). "Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain." Pain **139**: 90-105.
- Zin, C. S., L. M. Nissen, et al. (2008). "An update on the pharmacological management of post-herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy." CNS Drugs **22**: 417-42.

## 6. Tabellarische Übersichten der Patientendaten

**Tabelle 6.1 Übersicht zum Patientenkollektiv**

SFN-Patienten (n)	24
Frauen (n)	10
Männer (n)	14
Mittleres Alter	53 (34 bis 76) Jahre
Median der Krankheitsdauer	3 (1 bis 41) Jahre
Ätiologie	
- Idiopathisch (n)	21
- Typ I Diabetes (n)	1
- Typ II Diabetes (n)	2
Lokalisation von Dysästhesien und Schmerz	
- Füße	16
- Füße und Hände	5
- Generalisierte Schmerzen mit Schwerpunkt an Füßen und Händen	3

**Abkürzungen: SFN (small fiber Neuropathie).**

**Tabelle 6.2: Klinische Übersicht der Patienten mit längenabhängiger SFN**

Pat. Nr., Alter in Jahren, Geschl.	Zeit seit Beginn der Symptome (Monate), Symptome	Neurologische Untersuchung	IENF-Verhältnis [betroffen vs. nicht betroffen]	QST [patholog. Items]	Aktuelle Schmerzstärke [NRS]	Schmerzmedikation und Dosierung
1, 38, M	36, Permanentes Brennen und Nadelstichgefühl an Unterschenkeln und Armen	Normal	32	CDT, WDT, TSL	4	Pregabalin 250 mg/d
2, 75, W	> 120, Wiederholte Brennschmerzen in den Füßen	Hypalgesie und Thermhypästhesie von den Ellbögen und Patellae nach distal	10	Keine QST	4	Ibuprofen 400 mg/d
3, 60, W	24, Brennschmerzen in den Füßen und Beinen	Hypästhesie in beiden Füßen	5	Keine QST	5	Duloxetin 30mg/d, Morphin 10 mg/d
4, 36, M	204, Permanente Brennschmerzen in den Füßen und Händen	Normal	5	CDT, WDT, DMA	8	Pregabalin 375 mg/d, Amitriptylin 75mg/d, Tolperison 300 mg/d
5, 33, M	12, Durch Hitze ausgelöste Brennschmerzen in Händen und Füßen	Normal	6	CDT, WDT, TSL, PHS	0 (aber hitzeassoziierte Schmerzattacken mit 10)	Pregabalin 300 mg/d
6, 53, M	12,	Normal	8	CDT, WDT,	3	keine

	Permanente Brennschmerzen in den Fußsohlen und Parästhesien in den Waden			TSL		
7, 54, W	6, Permanente Parästhesien und Schmerzen in den Füßen	Thermhypästhesie an beiden Füßen	5	CDT, WDT, TSL	7	Pregabalin 300 mg/d
8, 46, M	30, Dysästhesien in Händen und Füßen	Normal	8	CDT, WDT, TSL	5	Pregabalin 300 mg/d
9, 64, W	60, Sichelstrumpfförmig ausbreitender Schmerz in beiden Füßen	Normal	8	CDT, WDT, TSL	7	Pregabalin 75 mg/d
10, 43, M	6, Dysästhesien und Brennschmerzen in den Füßen und Beinen	Hyperalgesie und Hyperästhesie der Fußsohlen	7	CDT, WDT, TSL	5	keine

**Abkürzungen: w (weiblich), m (männlich), IENF (Intraepidermal nerve fiber density), CDT (Cold detection threshold), DMA (Dynamic mechanical allodynia), MDT (Mechanical detection threshold), MPT (Mechanical pain threshold), PHS (Paradoxical heat sensations), PPT (Pressure pain threshold), TSL (Thermal sensory limen), WDT (Warm detection threshold), QST (Quantitativ sensorische Testung), NRS (Numeric rating scale).**

**Tabelle 6.3: Klinische Übersicht der Patienten mit nicht-längenabhängiger SFN**

Pat. Nr., Alter in Jahren, Geschl.	Zeit seit Beginn der Symptome (Monate), Symptome	Neurologische Untersuchung	IENF-Verhältnis [betroffen vs. nicht betroffen]	QST [patholog. Items]	Aktuelle Schmerzstärke [NRS]	Schmerzmedikation und Dosierung
11, 50, M	12, Permanente kribbelnde Dysästhesien, Sonnenbrand-ähnliches Gefühl	Allodynie und Hyperalgesie an beiden Beinen und Füßen	1	CDT, WDT, TSL	3	Pregabalin 300 mg/d
12, 69, M	12, Sehr starkes Kribbeln in den Füßen und Beinen, das zu Taubheit führt	Normal	2	CDT, WDT	10	Gabapentin 900 mg/d

13, 73, W	>120, Nächtlicher Brennschmerz der Beine	Kein ASR	2	CDT, WDT, TSL	3	Paracetam ol 1500 mg/d
14, 49, M	84, Persist. Kälte- und Taubheits- gefühl der Zehen und der Fußsohlen	Hypästhesie für Berührung und Kälte; Hypalgesie und Kribbeln ab Th12 abwärts; Par- und Dysästhesien; Pallanästhesie an den Zehen	2	CDT, WDT, TSL	0	keine
15, 70, M	180, Stechender Schmerz an beiden Fußsohlen	Hypästhesie in beiden Waden, Hypalgesie und Thermhypästhe sie in beiden Füßen; keine ASR; Pallhypästhesie an den Zehen	2	WDT, TSL	0	keine
16, 38, W	30, Permanenter stechender und brennender Schmerz an beiden Füßen	Hyperalgesie und Hyperästhesie in beiden Fußsohlen	1	CDT, WDT, TSL	8	Pregabalin 150mg/d
17, 67, M	12, Brennschmerz an den Füßen	Normal	2	CDT, WDT, TSL	5	Oxycodon 20mg/d; Amitriptylin 150mg/d
18, 41, M	60, Intermittierend er Schmerz in der rechten Wade	Hypalgesie seitlich an den Waden	10	CDT, WDT, TSL	1	keine
19, 55, W	24, Stechender Schmerz und Parästhesien im ganzen Körper, besonders an den Füßen	Normal	4	CDT, WDT, TSL	4	Pregabalin 300 mg/d
20, 52, M	12, Brennschmerz und Taubheit in beiden Füßen	Hypästhesie in beiden Füßen und Waden	1	CDT, TSL, PHS	3	Gabapentin 600 mg /d
21, 61, W	492, DM I, Brennschmerz an den Füßen und in den Beinen; permanente u. generalisierte Allodynie	Kein ASR	1	CDT, WDT, TSL	2	Duloxetin 60 mg/d

22, 69, W	264, Kitzeln und Dysästhesien an den Händen und Füßen	Strumpfförmige Hypästhesie in beider Füßen; gestörter Lagesinn an den Zehen, Pallhypästhesie an den medialen Malleoli	1	CDT, WDT, TSL	2	Duloxetin 30 mg/d
23, 46, W	36, Brennende Dysästhesien in den Füßen, Händen und dem Rücken	Normal	1	CDT, WDT, TSL	0	Pregabalin 450 mg/d
24, 43, M	120, Permanente Schmerzen und Parästhesien in den Füßen und Waden	Hypästhesie von der Patella bis zum distalen Bein; Pallhypästhesie an den Zehen	2	CDT, WDT, TSL	5	Mirtazapin 15 mg/d

**Abkürzungen: w (weiblich), m (männlich), ASR (Achillessehnenreflex), IENF (Intraepidermal nerve fiber density), CDT (Cold detection threshold), DMA (Dynamic mechanical allodynia), MDT (Mechanical detection threshold), MPT (Mechanical pain threshold), PHS (Paradoxical heat sensations), PPT (Pressure pain threshold), TSL (Thermal sensory limen), WDT (Warm detection threshold), QST (Quantitativ sensorische Testung), NRS (Numeric rating scale).**

**Tabelle 6.4: QST-Charakteristika des Patientenkollektivs in Relation zu veröffentlichten Referenzdaten: (Rolke, Baron et al. 2006).**

Patienten (n=22)	CDT	WDT	TSL	PHS	DMA
20	+	+	+	Bei 1.Pat zusätzlich +	N
1	+	+	n	+	N
1	+	+	n	n	+

**Abkürzungen: + = erhöhte Schwelle, n = normal, CDT (Cold detection threshold), DMA (Dynamic mechanical allodynia), PHS (Paradoxical heat sensations), TSL (Thermal sensory limen), WDT (Warm detection threshold).**

**Tabelle 6.5: Inter-individueller Vergleich der relativen Genexpression in Haut von Patienten mit LD-SFN und NLD-SFN sowie gesunden Kontrollen.**

Target		Proximal	Distal	Signifikanz
		x-fache Genexpression im Vergleich zu Kontrollen (Kontrollen wurden „1“ gesetzt)		
TNF	Kontrollen	1	1	n.s.
	LD-SFN	0.4	1	n.s.
	NLD-SFN	0.8	1.8	n.s.
IL-1 $\beta$	Kontrollen	1	1	n.s.
	LD-SFN	0.2	0.9	n.s.
	NLD-SFN	1.1	2.5	n.s.
IL-2	Kontrollen	1	1	n.s.
	LD-SFN	0.1	0.7	n.s.
	NLD-SFN	0.5	0.5	n.s.
IL-6	Kontrollen	1	1	n.s.
	LD-SFN	0.1	7.3	P=0.001
	NLD-SFN	0.9	5.6	n.s.
IL-8	Controls	1	1	n.s.
	LD-SFN	0.04	4.8	P=0.002
	NLD-SFN	0.6	1.8	n.s.
IL-10	Kontrollen	1	1	n.s.
	LD-SFN	0.3	0.6	n.s.
	NLD-SFN	0.9	1.2	n.s.
TGF $\beta$ 1	Kontrollen	1	1	n.s.
	LD-SFN	0.1	1.1	n.s.
	NLD-SFN	0.8	1.0	n.s.

**Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant), LD-SFN (length-dependent small fiber Neuropathie), NLD-SFN (non-length-dependent small fiber Neuropathie).**

**Tabelle 6.6: Übersicht der Summenwerte aller klinischen Fragebögen.**

Patientengruppe	Median			
	Aktuelle Schmerzstärke aus GCPS (von – bis)	$\Sigma$ NPSI (von – bis)	$\Sigma$ McGill (von – bis)	$\Sigma$ ADS (von – bis)
Gesamte SFN-Gruppe	4/10 (0/10-10/10)	21,5 (0-72)	15 (0-36)	19,5 (2-37)
LD-SFN	5/10 (0/10-8/10)	30 (7-40)	15 (8-25)	18,5 (2-37)
NLD-SFN	3/10 (0/10-10/10)	19,5 (0-72)	18 (0-36)	19,5 (4-32)

Abkürzungen/Symbole:  $\Sigma$  (Summe), LD-SFN (length-dependent small fiber Neuropathie), NLD-SFN (non-length-dependent small fiber Neuropathie), ADS (Allgemeine Depressionsskala), GCPS (Graded chronic pain scale), NPSI (Neuropathic pain scale inventory).

**Tabelle 6.7: Übersicht über die Daten des GCPS.**

Attribute	LD-SFN: Median (von – bis)	NLD-SFN: Median (von – bis)	Signifikanz
Akt. Schmerz	4,5/10 (0/10-8/10)	3/10 (0/10-10/10)	n.s.
Max. Schm. In letzten 4 Wo.	8,5/10 (5/10-10/10)	7/10 (0/10-10/10)	p=0,03
Schm. In letzten 4 Wo.	5,5/10 (3/10-8/10)	5/10 (0/10-10/10)	n.s.
Einschr. der alltägl. Akt.	4,5/10 (0/10-10/10)	3/10 (0/10-5/10)	n.s.
Einschr. der Freizeit-Aktivitäten	7/10 (1/10-10/10)	3,5/10 (0/10-9/10)	p=0,03
Einschr. der Arbeits-Fähigkeit	7,5/10 (1/10-9/10)	3,5/10 (0/10-9/10)	p=0,006

Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant), LD-SFN (length-dependent small fiber Neuropathie), NLD-SFN (non-length-dependent small fiber Neuropathie), GCPS (Graded chronic pain scale).



**Tabelle 6.8: Übersicht über die Daten des McGill-Fragebogens**

Deskriptive Attribute	Positive Antworten		Median		Signifikanz
	LD-SFN:	NLD-SFN:	LD-SFN:	NLD-SFN:	
- Pochend	40%	28,6%	0/3 (0/3-2/3)	0/3 (0/3-2/3)	n.s.
- Einschießend	40%	42,9%	0/3 (0/3-3/3)	0/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Stechend	80%	50%	2/3 (0/3-3/3)	0,5/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Schneidend	10%	14,3%	0/3 (0/3-3/3)	0/3 (0/3-1/3)	n.s.
- Krampfartig	20%	35,7%	0/3 (0/3-2/3)	0/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Ziehend/Reißend	60%	64,3%	1/3 (0/3-3/3)	1,5/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Brennend	80%	57,1%	2,5/3 (0/3-3/3)	1,5/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Dumpf	30%	21,4%	0/3 (0/3-3/3)	0/3 (0/3-3/3)	n.s.
<b>Affektive Attribute</b>					
- Heftig	100%	71,4%	2,5/3 (1/3-3/3)	1/3 (0/3-3/3)	p= 0,003
- Überempfindlich	60%	57,1%	1/3 (0/3-3/3)	1/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Rasend	20%	42,9%	0/3 (0/3-3/3)	0/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Ermüdend/ Zermürend	70%	64,3%	2/3 (0/3-3/3)	2/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Üblerregend	0%	28,6%	0/3 (0/3-0/3)	0/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Bedrohlich	50%	42,9%	0,5/3 (0/3-3/3)	0/3 (0/3-3/3)	n.s.
- Quälend/Marternd	90%	64,3%	2,5/3 (0/3-3/3)	1,5/3 (0/3-3/3)	n.s.

Aufgeführt sind die einzelnen Attribute, der Anteil der positiven Antworten und die entsprechenden Mediane. Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant), LD-SFN (length-dependent small fiber Neuropathie), NLD-SFN (non-length-dependent small fiber Neuropathie).

**Tabelle 6.9: Übersicht über die Daten des NPSI**

Frage nach:	Positive Antworten		NRS (Median)		Signifikanz
	LD-SFN	NLD-SFN	LD-SFN	NLD-SFN	
Charakter von Spontanschmerzen - Brennend * - Eingeschnürt - Druck	80% 20% 30%	50% 35,7% 57,1%	5,5/10 0/10 0/10	0,5/10 0/10 2/10	p=0,03 n.s. n.s.
Dauer der Spontanschmerzen in den letzten 24 Stunden - Dauerhaft (mehr als 12 Stunden) - Zwischen 8 und 12 Stunden - Zwischen 4 und 7 Stunden - Zwischen 1 und 3 Stunden - Weniger als eine Stunde	60% 10% 0% 10% 20%	50% 7,1% 14,3% 0% 28,6%			
Schmerzattacken wie - elektrische Schläge - stechend * *	30% 80%	28,6% 56%	0/10 5,5/10	0/10 0/10	n.s. p= 0,007
Anzahl der Schmerzattacken in den letzten 24 Stunden - mehr als 20 - zwischen 11 und 20 - zwischen 6 und 10 - zwischen 1 und 5 - keine Schmerzattacken	20% 30% 10% 20% 20%	14,3% 7,1% 14,3% 7,1% 57,1%			
Evozierte Schmerzen durch - Reiben - Druck - Kontakt mit kaltem Gegenstand	10% 40% 10%	35,7% 50% 21,4%	0/10 0/10 0/10	0/10 0,5/10 0/10	n.s. n.s. n.s.
Gefühlstörungen (Parästhesien) - Kribbeln - Ameisenlaufen	80% 60%	78,6% 57,1%	6,5/10 5/10	5,5/10 3/10	n.s. n.s.

**Abkürzungen: n.s. (nicht signifikant), SFN (n=24), LD-SFN (n=10), NLD-SFN (n=14). NRS (Numerische Ratingskala). (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).**

## 7. Anhang

### 7.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

**Tabelle 7.1: Geräte und Laborhilfen**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugpumpe	ECOM-P 4153	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CCD-Kamera		Visitron Systems, Tuchheim, Deutschland
Drucker	PDU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments, Japan
Heizblock		FA Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Homogenisator	Polytron PT 1600	Kinematika AG, Luzern, Swizerland
Mikroskop	Axiophot2	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrotom	CM 3050 S	Leica, Wetzlar, Deutschland
PCR-Cycler für reverse Transskription	Gene Amp PCR-System 9100	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Pipetman Gilson 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Proteinmessung mit Luminex	Luminex 100 System	Luminex Corp., Austin (Texas), USA
QST-Gerät		Somedic AB, Stockholm, Schweden
Real-Time PCR-Cycler	Abi Prism Gene Amp 7700 sequence detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Schüttler	GLW L-40	Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland
Spectrometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	GLW L-46	Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für Serumproben	Rotixa/P	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

**Tabelle 7.2: Verbrauchsmaterialien**

Art	Bezeichnung	Hersteller
Caps	0,2; 1,5; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kanülen	20G, BB Microlance	BD, Fraga, Spanien
Pipettenspitzen	10; 100; 200; 1000 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Skalpell		Braun, Tuttlingen, Deutschland
Spritze 1ml		Braun, Melsungen, Deutschland
Sterile Einmalstanze für Hautbiopsien	Biopsy Punch 5mm	FA Stiefel, Offenbach am Main, Deutschland
Sterile Heftpflaster	Leuko-strip	Smith&Nephew, Medical Limited, England
Reaktionsplatten für Real-Time-PCR	Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Verschlusskappen für PCR-Reaktionsplatten	Micro Amp 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 7.3: Medikamente**

Art	Bezeichnung	Hersteller
Lokalanästhetikum	Scandicain 1%	

**Tabelle 7.4: Chemikalien, Puffer und Lösungen für die RNA-Extraktion aus Vollblut**

Art	Bezeichnung/Inhalt	Hersteller
DEPC-Wasser	Diethyl-Pyro-Carbonat behandeltes Wasser	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
Lösung 1	Guanidin-Thiocyanat	Roti-Quick-Kit, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lösung 2	Phenol	Roti-Quick-Kit, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lösung 3	Isopropanol	Roti-Quick-Kit, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	70%	

**Tabelle 7.5: Chemikalien, Puffer und Lösungen für die RNA-Extraktion aus Hautbiopsien**

<b>Art</b>	<b>Bezeichnung/Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
Chloroform		
DEPC-Wasser	Diethyl-Pyro-Carbonat behandeltes Wasser	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
Isopropyl-Alkohol		
PFA	4% Paraformaldehyd	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
Trizol		

**Tabelle 7.6: Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie mit PGP 9.5**

<b>Art</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Saccharose	10%	
Einbettmittel	Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
2-Methylbutan		FA Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Bovines Serumalbumin, 10%	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
PBS	Phosphat-Buffer-Saline	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
Primärer Antikörper	PGP9.5, 1:800	UltraClone, Isle of Wight, England
Sekundärer Antikörper	Cyanine 3,18 konjugierter IgG-Ziegenantikörper gegen Kaninchen, 1:50	Jackson Immunoresearch Laboratories, Amersham, USA
DABCO	1,4-Diazabicyclo-Octan	
Versiegelungsmittel	VitroClud	R. Lagenbeck, Teningen, Deutschland

**Tabelle 7.7: Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie zum Nachweis von Entzündungszellen**

Art	Bezeichnung	Hersteller
Alkoholreihe	70, 90, 96, 100%	
BSA	Bovines Serumalbumin, 10%	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
DAB-Puffer	3,3-Diaminobezidin-Tetrachlorid-Dihydrat	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
Fixans	Tissue clear	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Färbung	Hämalaun	
Methanol		
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
Primäre Antikörper gegen Makrophagen	CD68, 1:3000	Dako, Glostrup, Dänemark
Primäre Antikörper gegen T-Lymphozyten	CD3, 1:200	Dako, Glostrup, Dänemark
Sekundärantikörper	biotinyliertes Ziege-anti-Maus IgG, 1:100,	Vector laboratories, Burlingame, USA
Streptavidin-Biotin-Komplex	Vectastain ABC Kit: Reagenz A (Avidin), Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxydase H), 1:1	Vector laboratories, Burlingame, USA
Versiegelungsmittel	Tissue Mount	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Wasserstoffperoxid	30%	

**Tabelle 7.8: Enzyme, Primer, Puffer und Nukleinsäuren für die Reverse-Transkriptase PCR**

Art	Bezeichnung	Hersteller
Nukleotide	dNTP's	Taq Man Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Primer	Oligo-DT	
	Random Hexamers	
Puffer	10x RT-Buffer	
	25 mM MgCl <sub>2</sub>	
Reverse Transskriptase	Multiscribe Reverse Transskriptase	
RNA'se Inhibitor		

**Tabelle 7.9: Enzyme, Primer, Puffer und Nukleinsäuren für die Real-Time PCR**

<b>Primer/Puffer</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
IL1 $\alpha$	Hs00174097_m1	Taq Man, Gene expression assay, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
IL2	Hs00174114_m1	
IL4	Hs00174122_m1	
IL6	Hs00174131_m1	
IL8	Hs00174103_m1	
IL10	Hs00174086_m1	
TNF $\alpha$	Hs00174128_m1	
TGF $\beta$ 1	Hs00852894_g1	
18s	Hs99999901_s1	
Puffer, Nukleotide, DNA-Polymerase	Universal Master Mix, Taq Man	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 7.10: Verwendete Software**

<b>Art</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Textverarbeitung, Tabellenkalkulation	Office Paket 2007	Microsoft, USA
Statistische Auswertung	SPSS-Software, Version 16.0.2	SPSS Inc., Chicago, USA
Auswertung der IENFD	Spot Advanced Software, Windows Version 4,5	Diagnostik Instruments, Sterling Heights, USA

## 7.2 Standardisierte Fragebögen

### 7.2.1 Allgemeine Depressionsskala (ADS) (Hautzinger 1993)

Bitte kreuzen Sie bei den folgenden Aussagen die Antwort an, die Ihrem Befinden während der letzten Woche am besten entspricht / entsprochen hat.

Antworten:                      selten = weniger als 1 Tag oder überhaupt nicht  
    manchmal = 1 bis 2 Tage lang  
    öfters = 3 bis 4 Tage lang  
    meistens = die ganze Zeit (5 bis 7 Tage lang)

Während der letzten Woche ...	selten	manchmal	öfters	meistens
1. ... haben mich Dinge beunruhigt, die mir sonst nichts ausmachen. .....	.....	.....	.....	.....
2. ... hatte ich kaum Appetit. .....	.....	.....	.....	.....
3. ... konnte ich meine trübsinnige Laune nicht loswerden, obwohl mich meine Freunde/Familie versuchten aufzumuntern.....	.....	.....	.....	.....
4. ... kam ich mir genauso gut vor wie andere.....	.....	.....	.....	.....
5. ... hatte ich Mühe, mich zu konzentrieren.....	.....	.....	.....	.....
6. ... war ich deprimiert / niedergeschlagen.....	.....	.....	.....	.....
7. ... war alles anstrengend für mich. .....	.....	.....	.....	.....
8. ... dachte ich voller Hoffnung an die Zukunft.....	.....	.....	.....	.....
9. ... dachte ich, mein Leben ist ein einziger Fehlschlag. .....	.....	.....	.....	.....
10. ... hatte ich Angst.....	.....	.....	.....	.....
11. ... habe ich schlecht geschlafen. .....	.....	.....	.....	.....
12. ... war ich fröhlich gestimmt. .....	.....	.....	.....	.....
13. ... habe ich weniger geredet als sonst. .....	.....	.....	.....	.....
14. ... fühlte ich mich einsam.....	.....	.....	.....	.....
15. ... waren die Leute unfreundlich zu mir. .....	.....	.....	.....	.....
16. ... habe ich das Leben genossen.....	.....	.....	.....	.....
17. ... mußte ich weinen. .....	.....	.....	.....	.....
18. ... war ich traurig.....	.....	.....	.....	.....
19. ... hatte ich das Gefühl, daß die Leute mich nicht leiden können.....	.....	.....	.....	.....
20. ... konnte ich mich zu nichts aufraffen.....	.....	.....	.....	.....

**Bitte prüfen Sie, ob Sie alle Feststellungen beantwortet haben!**

ADS © 1993 Hogrefe



## 7.2.2 Graded chronic pain scale (GCPS) (Von Korff, Ormel et al. 1992)

### Schmerzfragebogen (GCPS)

1) Wie würden Sie Ihren Schmerz **jetzt im Augenblick** auf einer Skala einschätzen, wenn 0 = *kein Schmerz* und 10 = *stärkster vorstellbarer Schmerz* bedeuten? Bitte markieren Sie die für Sie zutreffende Zahl:

0 — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10  
kein Schmerz stärkster vorstellbarer Schmerz

2) Wie stark war der **stärkste Schmerz in den letzten 4 Wochen**, wenn 0 = *kein Schmerz* und 10 = *stärkster vorstellbarer Schmerz* bedeuten?

0 — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10  
kein Schmerz stärkster vorstellbarer Schmerz

3) Wie stark war der Schmerz **in den letzten 4 Wochen im Durchschnitt**, wenn 0 = *kein Schmerz* und 10 = *stärkster vorstellbarer Schmerz* bedeuten?

0 — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10  
kein Schmerz stärkster vorstellbarer Schmerz

4) An wie vielen Tagen der letzten 6 Monate konnten Sie aufgrund der Schmerzen nicht Ihren **üblichen Aktivitäten** nachgehen (z.B. Arbeit, Schule, Haushalt, Hobby)?

an  Tagen

5) In welchem Maße haben Schmerzen Ihre **alltäglichen Aktivitäten (Ankleiden, Waschen, Essen, Einkaufen etc.)** in den letzten 6 Monaten beeinträchtigt, wenn 0 = *keine Beeinträchtigung* und 10 = *keine Aktivitäten mehr möglich* bedeuten?

0 — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10  
keine Beeinträchtigung keine Aktivität mehr möglich

6) Wie sehr haben Ihre Schmerzen während der letzten 6 Monate Ihre **Freizeitaktivitäten oder Unternehmungen** im Familien - und Freundeskreis beeinträchtigt, wenn 0 = *keine Beeinträchtigung* und 10 = *keine Aktivitäten mehr möglich* bedeuten?

0 — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10  
keine Beeinträchtigung keine Aktivität mehr möglich

7) In welchem Maße haben Ihre Schmerzen während der letzten 6 Monate Ihre **Arbeitsfähigkeit (einschließlich Hausarbeit)** beeinträchtigt, wenn 0 = *keine Beeinträchtigung* und 10 = *keine Aktivitäten mehr möglich* bedeuten?

0 — 1 — 2 — 3 — 4 — 5 — 6 — 7 — 8 — 9 — 10  
keine Beeinträchtigung keine Aktivität mehr möglich

### 7.2.3 Kurzform des McGill-Fragebogens (Melzack 1987)

#### Kurzfragebogen McGill

Die nachfolgenden Aussagen beschreiben die Schmerzempfindung:

Bitte geben Sie bei jeder Aussage an, ob die genannte Qualität auf Ihre Empfindung zutrifft:

	nicht vorhan den	gering	mäßig	stark
ich empfinde meine Schmerzen als pochend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als einschießend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als stechend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als schneidend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als krampfartig	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als ziehend/reißend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als brennend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als dumpf	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als heftig	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Haut als überempfindlich	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als rasend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als ermüdend/zermürend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als übererregend	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als bedrohlich	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ich empfinde meine Schmerzen als quälend/marternd	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## 7.2.4 Neuropathic pain scale inventory (NPSI) (Sommer et al. 2011)

Patienten-ID: .....

Seite - 1 -

### FRAGEBOGEN NEUROPATHISCHE SCHMERZEN

Datum: .....

Vorname: .....

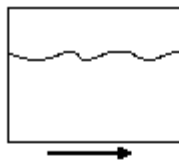
Name: .....

Geschlecht: .....

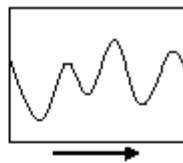
Alter: .....

Sie leiden an Schmerzen.

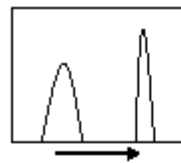
Möglicherweise haben Sie so genannte Spontanschmerzen, die ohne einen erkennbaren Auslöser auftreten. Diese sind entweder dauerhaft, d.h. ohne Unterbrechung ständig vorhanden, treten mit Unterbrechungen auf und/oder schwanken in ihrer Stärke. Zum besseren Verständnis haben wir versucht, dies anhand der folgenden Bilder deutlich zu machen:



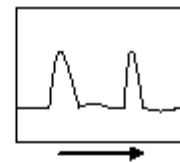
Dauerschmerzen  
mit leichten  
Schwankungen



Dauerschmerzen  
mit starken  
Schwankungen



Schmerzattacken  
(unterbrochener  
Schmerz)  
dazwischen schmerzfrei



Schmerzattacken  
(unterbrochener  
Schmerz)  
auch dazwischen  
Schmerzen

Vielleicht haben Sie auch Schmerzen, die durch bestimmte äußere Auslöser (Berührung, Druck, Kälte) hervorgerufen werden können.

Bei einem Patienten können gleichzeitig mehrere Arten von Schmerzen bestehen.

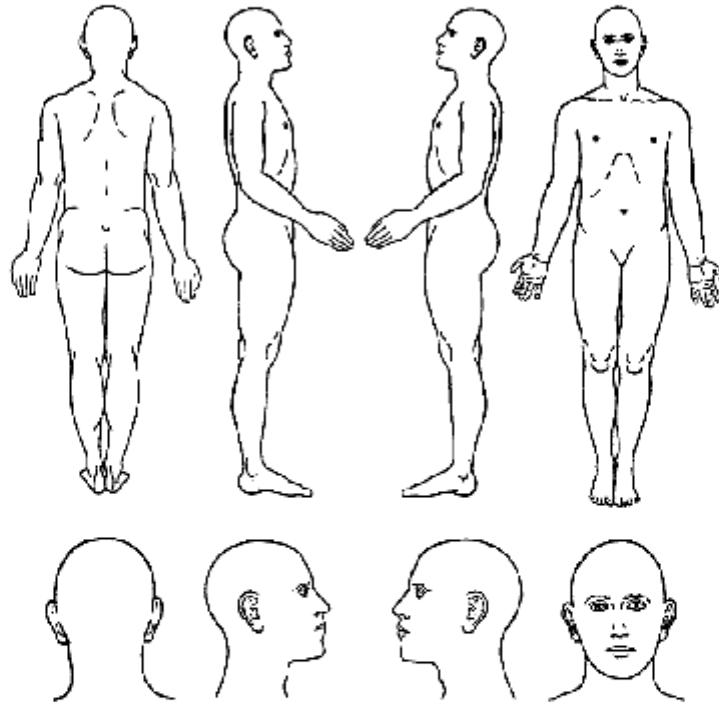
Schmerzen sind für Patienten oft schwer zu schildern und Ärzte haben häufig Schwierigkeiten diese richtig zu verstehen. Deswegen werden Fragebögen entwickelt, die den Ärzten helfen sollen, die Schmerzen ihrer Patienten auch im Einzelnen zu erfassen. Dieses ist ein neuartiger Fragebogen, dessen Nützlichkeit wir testen wollen. Dazu benötigen wir Ihre Hilfe.

**Wo haben Sie Schmerzen ?**

Vorab möchten wir Sie fragen, wo überall Sie unter Schmerzen leiden.

Malen Sie bitte in den nachfolgenden Körperschemata ein, wo Sie überall Schmerzen haben.

Bitte kennzeichnen Sie das ganze Schmerzgebiet (durch Schraffierung mit Bleistift oder Kugelschreiber), damit wir wirklich wissen, wo Sie überall Schmerzen haben.

**Nehmen Sie Medikamente?**

Haben Sie in den letzten 24 Stunden Medikamente gegen Ihre Schmerzen genommen?

ja  nein

Welche Medikamente haben Sie in den letzten 24 Stunden gegen Ihre Schmerzen genommen?

Name des Medikaments	Wie oft haben Sie das Medikament genommen?	Wie viele Tabletten/ Tropfen /Zäpfchen haben Sie genommen?
z.B. Paracetamol 500 mg	2 mal	jeweils 2 Tabletten

Sie werden, wie Sie es vielleicht schon aus anderen Fragebogen kennen, nach der Stärke ihrer Beschwerden gefragt. Da man die Stärke von Beschwerden nicht einfach messen kann, verwenden wir hier eine Skala von 0 bis 10. 0 bedeutet dabei immer, dass Sie die entsprechenden Beschwerden nicht haben. 10 bedeutet, dass Sie die Beschwerden in der für Sie schlimmsten vorstellbaren Stärke haben.

### Spontanschmerzen

Die ersten Fragen beziehen sich nur auf Spontanschmerzen, d.h. solche Schmerzen die ohne äußere Auslöser auftreten.

Haben Sie **Spontanschmerzen**, d. h. Schmerzen, die ohne äußeren Auslöser auftreten?

Bitte kreuzen Sie für jede der folgenden Fragen die Ziffer an, die am besten der **Stärke Ihrer Spontanschmerzen im Mittel über die letzten 24 Stunden** entspricht. Kreuzen Sie „0“ an, wenn Sie diese Art Schmerz nicht verspürt haben. (kreuzen Sie bitte immer nur eine Ziffer an)

Q1. Ist Ihr Schmerz brennend?

kein Brennen 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 schlimmstes vorstellbares Brennen

Q2. Fühlt sich Ihr Schmerz an wie eingeschnürt oder wie in einem Schraubstock eingeklemmt zu sein?

kein Einschnüren 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 schlimmstes vorstellbares Einschnüren

Q3. Fühlt sich Ihr Schmerz wie ein Druck an?

kein Druck 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 schlimmster vorstellbarer Druck

Q4. Wie lange dauerten Ihre Spontanschmerzen in den letzten 24 Stunden?

Kreuzen Sie die Antwort an, die der Dauer am besten entspricht:

dauerhaft (mehr als 12 Stunden)

zwischen 8 und 12 Stunden

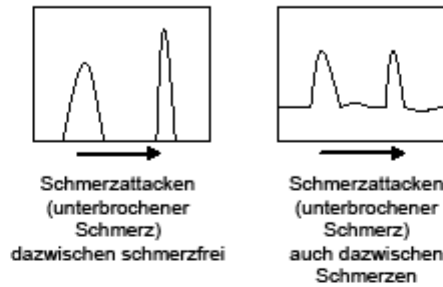
zwischen 4 und 7 Stunden

zwischen 1 und 3 Stunden

weniger als 1 Stunde

**Schmerzattacken / unterbrochener Schmerz**

Beschreibt eines der beiden Bilder die Schmerzen, wie Sie sie verspüren?



Für jede der folgenden Fragen kreuzen Sie bitte die Ziffer an, die am besten die mittlere Stärke Ihrer Schmerzattacken während der letzten 24 Stunden angibt. Kreuzen Sie „0“ an, wenn Sie einen solchen Schmerz nicht verspürt haben. (kreuzen Sie bitte immer nur eine Ziffer an)

Q5. Empfinden Sie Ihre Schmerzattacken wie elektrische Schläge?

überhaupt nicht

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

schlimmste vorstellbare  
elektrische Schläge

Q6. Fühlt sich Ihr Schmerz stechend an?

kein Stechen

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

schlimmstes  
vorstellbares Stechen

Q7. Wie viele dieser Schmerzattacken hatten Sie in den letzten 24 Stunden?

Wählen Sie die Antwort, die am ehesten zutrifft:

- mehr als 20
- zwischen 11 und 20
- zwischen 6 und 10
- zwischen 1 und 5
- keine Schmerzattacken

**Schmerzen, die durch bestimmte Auslöser hervorgerufen oder verschlimmert werden**

Haben Sie Schmerzen, die durch bestimmte Auslöser hervorgerufen oder verschlimmert werden, z. B. durch Reiben, Druck, oder Kontakt mit kalten Gegenständen im schmerzhaften Bereich?

Für jede der folgenden Fragen kreuzen Sie bitte die Ziffer an, die am besten der Stärke der Schmerzen, die durch Auslöser hervorgerufenen oder verschlimmerten entspricht, die Sie im Mittel in den letzten 24 Stunden hatten. Kreuzen Sie „0“ an, wenn Sie diesen Typ Schmerz nicht verspürt haben. **(kreuzen Sie bitte immer nur eine Ziffer an)**

Q8. Haben Sie im schmerzhaften Bereich Schmerzen, die durch Reiben hervorgerufen oder verschlimmert werden?

kein Schmerz 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 maximal vorstellbarer Schmerz

Q9. Haben Sie Schmerzen, die durch Druck auf den schmerzhaften Bereich hervorgerufen werden?

kein Schmerz 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 maximal vorstellbarer Schmerz

Q10. Haben Sie Schmerzen, die durch Kontakt mit einem kalten Gegenstand im schmerzhaften Bereich hervorgerufen oder verschlimmert werden?

kein Schmerz 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 maximal vorstellbarer Schmerz

**Gefühlsstörungen**

Haben Sie im schmerzhaften Bereich ungewöhnliche Gefühlsstörungen?

Für jede der folgenden Fragen kreuzen Sie bitte die Ziffer an, die am besten der Stärke Ihrer ungewöhnlichen Gefühlsstörungen entspricht, die Sie durchschnittlich in den letzten 24 Stunden hatten. Kreuzen Sie „0“ an, wenn Sie dieses Gefühl nicht hatten **(kreuzen Sie immer nur eine Ziffer an)**.

Q11. Empfinden Sie ein Kribbeln?

kein Kribbeln 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 maximal vorstellbares Kribbeln

Q12. Empfinden Sie etwas, das sich anfühlt wie Ameisenlaufen?

kein Ameisenlaufen 

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 maximal vorstellbares Ameisenlaufen

### 7.3 Abkürzungen (englische Begriffe in *kursiv*)

ADS	Allgemeine Depressionsskala
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
CCI	<i>Chronic constriction injury</i>
CDT	<i>Cold detection threshold</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
CPT	<i>Cold pain threshold</i>
CRPS	<i>Complex regional pain syndrome</i>
CWP	<i>Chronic widespread pain</i>
DEPC	Diethyl-Pyro-Carbonat
DMA	<i>Dynamic mechanical allodynia</i>
ENL	Erythema nodosum leprosum
FMS	Fibromyalgie-Syndrom
GABA	<i>Gamma Aminobutyric acid</i>
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GCPS	<i>Graded chronic pain scale</i>
HPT	<i>Heat pain threshold</i>
IENFD	Intraepidermale Nervenfaserdichte
IENF	Intraepidermale Nervenfasern
LDF	<i>Laser Doppler Flowmetry</i>
LD-SFN	<i>Length-dependent SFN</i>
MDT	<i>Mechanical detection threshold</i>
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
MPS	<i>Mechanical pain sensitivity</i>
MPT	<i>Mechanical pain threshold</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NLD-SFN	<i>Non-length-dependent SFN</i>
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPSI	<i>Neuropathic pain scale inventory</i>
NRS	<i>Numeric rating scale</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphat-Buffer-Saline</i>



<i>PDN</i>	<i>Painful diabetic neuropathy</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHN	Postherpetische Neuralgie
<i>PHS</i>	<i>Paradoxical heat sensations</i>
PNP	Polyneuropathie
<i>PPT</i>	<i>Pressure pain threshold</i>
<i>PSL</i>	<i>Partial sciatic ligation</i>
<i>QSART</i>	<i>Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test</i>
QST	Quantitativ sensorische Testung
SFN	Small fiber Neuropathie
<i>SNI</i>	<i>Spared nerve injury</i>
<i>SNL</i>	<i>Spinal nerve ligation</i>
SSR	<i>Sympathetic Skin Response</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
<i>TRPV1</i>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1</i>
<i>TSL</i>	<i>Thermal sensory limen</i>
<i>VDT</i>	<i>Vibration detection threshold</i>
<i>WDT</i>	<i>Warm detection threshold</i>
<i>WUR</i>	<i>Wind up ratio</i>

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Menschen, die zur Durchführung und erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit unermüdlich beigetragen haben:

- Frau Professor Dr. med Claudia Sommer, die neben der Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas auch im klinischen Alltag als Oberärztin auf Station stets hilfsbereit zur Seite stand.
- Frau PD Dr. med Nurcan Üçeyler für die unermüdliche Betreuung, Motivation und Anleitung bei der klinischen und laborchemischen Arbeit sowie beim Korrekturlesen der Dissertationsschrift.
- Allen Mitarbeitern des histologischen Labors und der AG Sommer für die freundliche Unterstützung und Geduld bei der Anleitung und der täglichen gemeinsamen Arbeit. Besonders gilt mein Dank Hiltrud Klüpfel, Barbara Gado, Barbara Broll und Sonja Mildner.
- Frau Professor Dr. med. Eva-Bettina Bröcker für die Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen.
- Meinen Eltern und meinem Bruder für die selbstlose Unterstützung.

Veröffentlichungen:

Üçeyler, N., W. Kafke, et al. (2010). "Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy." Neurology 74(22): 1806-13.

Mitwirkung am Vortrag auf dem Meeting der Peripheral Nerve Society 2007, Snowbird, Utah, USA:

Üçeyler, N., Kafke, W., Toyka, K.V., Sommer, C. (2007). Local and systemic cytokine expression in patients with small fiber neuropathy. *JPNS [Suppl. 1] S87.*

Posterpräsentation auf dem Deutschen Schmerzkongress 2007, Berlin:

Üçeyler, N., Kafke, W., Toyka, K.V., Sommer, C. (2007). Lokale und systemische Zytokinprofile bei Patienten mit small fiber Neuropathie. *Schmerz [Suppl. 1] S116.*