

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Quantifizierung von GAP 43 positiven intraepidermalen Nervenfasern  
bei Patienten mit Polyneuropathie und bei gesunden Kontrollen**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Vorgelegt von

Sarah Scheytt

Aus Erbach

Würzburg, Juli 2013

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Nurcan Üçeyler

Koreferent: Professor Dr. med. Matthias Goebeler

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2014

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern gewidmet.

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
1.1	Polyneuropathie: Definition und Epidemiologie .....	1
1.2	Klassifikation .....	1
1.3	Klinische Charakteristika.....	4
1.4	Diagnostik .....	5
1.5	PGP 9.5 – Protein Gene Product 9.5.....	6
1.6	Nervenregeneration .....	7
1.7	GAP 43 – Growth Associated Protein 43 .....	7
1.8	Fragestellung und Zielsetzung .....	9
2	Material und Methoden .....	10
2.1	Einschlusskriterien für die Patientengruppe .....	10
2.2	Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe .....	11
2.3	Gewinnung der Hautbiopsien.....	11
2.4	Gewebeaufarbeitung.....	11
2.5	Immunhistochemische Färbung .....	12
2.5.1	GAP 43 Färbung .....	12
2.5.2	PGP 9.5 Färbung .....	13
2.6	Histologische Auswertung und Dokumentation.....	14
2.7	Statistische Auswertung .....	16
2.8	Materialien.....	17
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Auswertung der klinischen Daten des Patientenkollektivs .....	21
3.1.1	Demographische Daten .....	21
3.1.2	Ätiologien der PNP.....	21

3.2	Auswertung der klinischen Daten des Kontrollkollektivs .....	23
3.3	Auswertung der histologischen Daten .....	24
3.3.1	Quantifizierung der IENFD und der regenerierenden Nervenfasern .....	24
3.3.2	Vergleich zwischen Oberschenkel und Unterschenkel.....	27
3.3.3	Vergleich der IENFD und der Dichte regenerierender Fasern.....	28
3.3.4	Vergleich der Faserdichten zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe	29
3.3.5	Untersuchung von Einflussfaktoren .....	31
1.	<i>Alter</i> .....	31
2.	<i>Geschlecht</i> .....	34
3.	<i>Schmerz</i> .....	37
4.	<i>Diagnosekategorien</i> .....	38
4	Diskussion .....	45
4.1	Normwerte der IENFD .....	45
4.2	Normwerte für die Dichte intraepidermaler regenerierender Nervenfasern .....	46
4.3	IENFD und Dichte an regenerierenden Fasern ist am OS höher als am US.....	48
4.4	PNP Patienten haben mehr GAP 43 positive als PGP 9.5 positive Nervenfasern .....	48
4.5	PNP Patienten haben absolut weniger regenerierende Nervenfasern als gesunde Probanden, deren Anteil an der IENFD ist aber erhöht.....	49
4.6	Höheres Alter ist verbunden mit einer reduzierten IENFD und einer geringeren Dichte an regenerierenden Nervenfasern .....	50
4.7	Das Geschlecht hat keinen Einfluss auf die IENFD und die Dichte regenerierender Fasern .....	51

4.8	Das Auftreten von Schmerzen bei einer PNP steht nicht im Zusammenhang mit einer veränderten IENFD oder Dichte an regenerierenden Fasern .....	51
4.9	Die demyelinisierende PNP zeigt am US eine höhere IENFD und mehr regenerierende Fasern .....	52
4.10	Grenzen der Studie .....	52
4.10.1	Patienten- und Kontrollkollektiv.....	53
4.10.2	Interraterreliabilität der Untersucher .....	54
5	Zusammenfassung .....	55
6	Anhang .....	56
7	Literaturverzeichnis .....	59

# **1 Einleitung**

## **1.1 Polyneuropathie: Definition und Epidemiologie**

Die Polyneuropathien (PNP) sind häufige neurologische Erkrankungen des peripheren Nervensystems, die in ihrer Ätiologie, Pathophysiologie, ihren klinischen Charakteristika und in ihrem Schweregrad sehr unterschiedlich sind. PNP können in unterschiedlichem Ausmaß motorische, sensible und autonome Symptome verursachen und können schmerzhaft oder schmerzlos verlaufen (Dyck et al. 2005, Kap. 45-47).

Die Gesamtprävalenz der PNP beträgt 2 - 7% und steigt bei älteren Personen auf bis zu 15% an (Callaghan et al. 2012). In den Industrienationen ist der Diabetes mellitus die häufigste Ursache der PNP (Hughes 2002). Weitere Ursachen für erworbene PNP können z.B. Alkoholkonsum, Inflammation (erregerbedingt oder autoimmun), Vitaminmangel oder maligne Erkrankungen sein (Mold et al. 2004). Daneben gibt es auch vererbte PNP, die mit einer Prävalenz von 0,04% zu den häufigsten genetisch bedingten neurologischen Erkrankungen gehören (Baets et al. 2011).

## **1.2 Klassifikation**

Die Einteilung der PNP kann anhand verschiedener Kriterien erfolgen (Heuss et al. 2008):

- Zeitlicher Verlauf :  
≤ 4 Wochen: akut; 4-8 Wochen: subakut; > 8 Wochen: chronisch
- Symptomverteilung:  
Symmetrisch - asymmetrisch; distal - proximal
- Betroffene Nervenfasern:  
Sensible, sensomotorische, motorische und/oder autonome PNP
- Ätiologie:
  - Erworben: Metabolisch, medikamentös-toxisch, inflammatorisch, paraneoplastisch etc.

- Hereditär: z.B. die hereditären motorisch-sensiblen Neuropathien (HMSN)
- Schädigungstyp:  
Axonal – demyelinisierend

Die autoimmun bedingten PNP umfassen u.a. das Guillain-Barré Syndrom (GBS), die chronisch-inflammatorische demyelinisierende Neuropathie (CIDP), die multifokale motorische Neuropathie (MMN), die multifokal erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie (MADSAM) und die paraproteinämischen PNP. Bei den autoimmun vermittelten PNP bedingt eine Störung der Immunregulation die Krankheit (Köller et al. 2005). Die CIDP ist die häufigste chronische autoimmune PNP (Dalakas 2011) und das GBS ist die häufigste akute autoimmune PNP (Ueda et al. 2011).

Zu den entzündlich bedingten PNP gehört u.a. die vaskulitische PNP, bei der eine Entzündung der die Nerven versorgenden Blutgefäße (Vasa nervorum) die Nervenschädigung bedingt (Ropper et al. 2009, Kap. 46). Eine PNP kann entweder sekundär bei einer systemischen Vaskulitis begleitend auftreten oder aber es kann zu einer isolierten primären Vaskulitis des peripheren Nervensystems kommen (Collins et al. 2009). Zu den häufigsten systemischen Krankheiten, die zu einer vaskulitischen Neuropathie führen können, gehören die rheumatoide Arthritis, die Polyarteritis nodosa, das Churg-Strauss Syndrom, die Wegener Granulomatose und der Lupus erythematosus (Ropper et al. 2009, Kap. 46). Weitere mögliche Auslöser für das Entstehen einer vaskulären PNP sind Infektionen, Tumore und Medikamente (Neundörfer et al. 2007, Kap. 5.2). Desweiteren werden zu den entzündlich bedingten PNP Formen auch die axonale Neuritis und die Ganglionitis gezählt.

Bei den metabolischen PNP stellt in den westlichen Ländern die diabetische PNP die häufigste Ursache dar. Ca. 20% aller Patienten mit Diabetes mellitus entwickeln innerhalb von zehn Jahren eine PNP und bereits nach 15 Jahren steigt das Risiko eine PNP zu entwickeln auf bis zu 50% an (Picon et al. 2012). Neben dem Diabetes mellitus gibt es noch viele weitere Erkrankungen, die zu einer metabolischen PNP führen können. Zu diesen Erkrankungen gehören u.a. Schilddrüsenfunktionsstörungen,



Urämie, hepatische Neuropathie, Akromegalie und Mangelernährung (Neundörfer et al. 2007, Kap. 5.4).

Unter den toxisch bedingten PNP ist v.a. die alkoholtoxische PNP häufig. Es wird geschätzt, dass ca. 25 - 66% aller chronischen Alkoholkonsumenten in den USA an einer PNP erkrankt sind (Chopra et al. 2012). V.a. Männer im Alter von 40 bis 70 Jahren sind von der alkoholinduzierten Form der Neuropathie betroffen (D'Amour et al. 1994). Eine weitere Gefahr stellen Gewerbe- und Umweltgifte dar. Die Exposition mit Stoffen wie Arsen, Blei und organischen Phosphorverbindungen bergen das größte Risiko eine toxische PNP zu entwickeln. Allerdings geht die Inzidenz der durch Gifte verursachten PNP deutlich zurück, da am Arbeitsplatz Maßnahmen wie die Achtung der Maximalen Arbeitsplatzkonzentration (MAK) eingeführt wurden. Stattdessen steigt die Inzidenz der PNP, die durch Chemotherapeutika oder Immunmodulatoren hervorgerufen werden (Misra et al. 2008).

Die hereditären PNP sind eine klinisch und genetisch heterogene Untergruppe der PNP, für die mittlerweile mehr als 30 verantwortliche Gene bekannt sind. Bei den hereditären PNP werden zwei Gruppen unterschieden: primäre hereditäre PNP wie z.B. das Charcot-Marie-Tooth (CMT) Syndrom und sekundäre hereditäre PNP meist i.R. von Systemerkrankungen wie z.B. der Porphyrie (Reilly et al. 2009).

Eine weitere häufige Unterform der PNP ist die Neuropathie der kleinen Fasern (small fiber neuropathy, SFN), eine sensible PNP, die v.a. die kleinen dünn-myelinisierten A-Delta-Fasern, bzw. die unmyelinisierten C-Fasern oder autonomen Nervenfasern betrifft (Lacomis 2002). Die A-Delta-Fasern übermitteln v.a. die Wahrnehmung von Kälte sowie von schmerzhaften und mechanischen Reizen, wohingegen die C-Fasern die Wahrnehmung von Wärme, schmerzhaften Hitzereizen und Berührungsreizen übermitteln (Lauria et al. 2005). Typischerweise leiden Patienten mit einer SFN an brennenden Schmerzen sowie Dysästhesien bei weitgehend normalen Befunden in den neurophysiologischen Untersuchungen (Stewart et al. 1992). Bei der SFN ist typischerweise eine Verminderung der intraepidermalen Nervenfaserdichte zu beobachten (Holland et al. 1998). Ursächlich für die SFN sind u.a. systemische

Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Amyloidose, Alkoholkonsum oder HIV (Johnsen et al. 1997).

### **1.3 Klinische Charakteristika**

Es gibt eine Vielzahl klinischer Charakteristika der PNP, die in unterschiedlichen Kombinationen und Ausprägungsgraden bei einem Patienten auftreten können. Zu den häufigsten Symptomen gehören Schmerzen, Paresen und Sensibilitätsstörungen, sowie autonome Funktionsstörungen und trophische Veränderungen an Haut, Haaren und Nägeln (Ropper et al. 2009, Kap. 46). Typischerweise haben PNP eine distal-nach-proximal Ausbreitung.

Die klinische Symptomatik hängt v.a. davon ab, welche Nerven durch die Erkrankung geschädigt wurden. Ein Befall der sensiblen Nerven kann zu Plus- und Minussymptomen führen: Plussymptome wie Brennen, Schmerzen, Stechen und Kribbeln und Minussymptomen wie Taubheits- und Pelzigkeitsgefühl (Misra et al. 2008). Der Sensibilitätsverlust hat oft auch ein höheres Verletzungsrisiko zur Folge (Kernich 2001). Bei Befall der motorischen Nerven entwickeln sich Paresen an den Extremitäten mit konsekutiver Gang- oder Feinmotorikstörung (Kernich 2001). Im Verlauf kann es zur Muskelatrophie kommen (Ropper et al. 2009, Kap. 46).

Neben rein sensiblen und rein motorischen PNPs, gibt es die Mischform der sensomotorischen PNP, bei der sowohl sensible, als auch motorische Nerven von der Erkrankung befallen sind.

Eine weitere Nervenfaserkategorie, die durch die PNP beeinträchtigt werden kann, ist die der autonomen Nervenfasern. Eine Schädigung dieser Nerven tritt häufig bei der diabetischen Neuropathie oder dem akuten GBS auf. Typische Symptome bei Schädigung der autonomen Nervenfasern sind sexuelle Funktionsstörungen, Sphinkter- und Blasenentleerungsstörungen, sowie Hypo- bzw. Anhidrosis (Neundörfer et al. 2007, Kap. 2.2).

Neben den physischen Veränderungen können v.a. bei schmerzhaften PNP auch psychische Beeinträchtigungen bis hin zur Depression auftreten, was mit einer

erheblichen Reduktion der Lebensqualität des Patienten einhergeht (Poliakov et al. 2011).

#### **1.4 Diagnostik**

Die Diagnostik der PNP ist aufwändig und beinhaltet u.a. umfangreiche klinische, elektrophysiologische und laborchemische Tests. V.a. die Feststellung der Ätiologie ist aufgrund der zahlreichen Möglichkeiten meist eine Herausforderung (Sommer et al. 2010).

Bereits die Anamnese und die klinische Untersuchung stellen wichtige diagnostische Schritte dar, da sie Informationen über den Verteilungstyp der PNP, die Krankheitsdauer und mögliche Begleiterkrankungen liefern (Neundörfer et al. 2007, Kap. 2.1 und 2.2). Bei positiver Familienanamnese kann eine genetische Testung die Diagnose sichern.

Mit Hilfe der elektrophysiologischen Untersuchungen (Elektroneurographie und -myographie) lassen sich der Verteilungstyp (symmetrisch – asymmetrisch), die Art (motorisch – sensibel) und der Schädigungstyp (axonal – demyelinisierend) der PNP feststellen. Eine axonale PNP äußert sich in der Neurographie typischerweise durch Amplitudenreduktion der Aktionspotenziale, wohingegen sich eine demyelinisierende PNP durch eine Verlängerung der distal motorischen Latenz, sowie einer herabgesetzten Nervenleitgeschwindigkeit äußert (Heuss et al. 2008).

Ein die klinisch-neurologische Untersuchung ergänzendes Verfahren zur Erfassung der beteiligten Nervenfaserklassen ist die quantitative sensorische Testung (QST). Bei der QST werden nach einem standardisierten Untersuchungsverfahren die Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen u.a. für thermische und mechanische Reize bestimmt (Rolke et al. 2006). Die QST dient u. a. dazu eine Beeinträchtigung der dünn- bzw. unbemerkten A-Delta und C-Fasern zu erkennen.

Die Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) bei der Diagnostik einer PNP gewinnt zunehmend an Bedeutung (Sommer 2008). Die Hautstanzbiopsie wird von internationalen (Lauria et al. 2005) und nationalen Leitlinien (Heuss et al.

2008) bei der PNP Diagnostik empfohlen. Für Patienten mit einer reinen SFN ergab sich in einer Studie für die Bestimmung der IENFD eine diagnostische Sensitivität von 77% und Spezifität von 79% (Vlcková-Moravcová et al. 2008). Bei PNP Patienten, die zusätzlich eine Beteiligung der dicken Nervenfasern aufwiesen, ergaben sich ähnliche Werte. Auch für PNP Formen, die bislang durch eine reine Beteiligung der dicken Nervenfasern charakterisiert wurden (z.B. bei Schilddrüsenfunktionsstörungen oder bei der Porphyrie), zeigten weitere Studien eine reduzierte IENFD und damit eine Mitbeteiligung der kleinen Fasern (Sommer 2008).

Für Patienten, bei denen die Verdachtsdiagnose einer behandelbaren PNP mittels der oben genannten Methoden nicht gestellt werden kann, stellt die Nervenbiopsie eine weitere diagnostische Option dar. Der biopsierte Nerv ist in der Regel der N. suralis, ein gut zugänglicher und rein sensibler Nerv. Die Hauptfrage an die Nervenbiopsie ist, ob es sich um eine entzündliche PNP handelt, die mit immunmodulatorischen oder immunsuppressiven Medikamenten therapiert werden könnte (Sommer et al. 2010).

### **1.5 PGP 9.5 – Protein Gene Product 9.5**

Bei der Diagnostik der PNP wird zunehmend auch die Hautbiopsie verwendet. Hierfür werden eine oder mehrere Hautstanzbiopsien entnommen, u.a. um die IENFD zu bestimmen. Um die intraepidermalen Nervenfasern unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wird eine Färbung der Hautschnitte mit Antikörper gekoppeltem Farbstoff durchgeführt. Der Antikörper richtet sich hierbei gegen das protein gene product 9.5 (PGP 9.5), ein Protein aus der Familie der Ubiquitin Hydrolasen. PGP 9.5 wird auch als Ubiquitin Carboxyl-terminale Hydrolase-1 (UCH-L1) bezeichnet, da es die Peptidbindung zwischen einem C-terminalen Glycin und Ubiquitin hydrolisiert. Es handelt sich um ein zytoplasmatisches Protein, das in neuronalen und neuroendokrinen Zellen exprimiert wird (Campbell et al. 2003). Das Protein wurde erstmals aus menschlichem Gehirngewebe isoliert und hat ein Gewicht von 27 kDa (Doran et al. 1983).

Da PGP 9.5 ein Bestandteil myelinisierter und nicht myelinisierter Axone peripherer Nervenfasern ist, wird es in dermalen und epidermalen Nervenfasern exprimiert.

Aufgrund dieser Eigenschaft gilt PGP 9.5 als geeigneter Marker für kutane Hautnervenendigungen und kann zur Diagnostik von PNP verwendet werden (Koskinen et al. 2005). Seit 2005 existieren Leitlinien der European Federation of Neurological Societies (EFNS) zum Einsatz PGP 9.5 gefärbter Hautbiopsien in der Diagnostik peripherer Neuropathien (Lauria et al. 2005). Die Abkürzung IENFD bezieht sich in dieser Arbeit auf die PGP 9.5 gefärbten Nervenfasern.

## **1.6 Nervenregeneration**

Bei PNP kommt es zu einer Nervenschädigung, deren molekulare Mechanismen bisher nur teilweise geklärt sind. Welche Rolle dabei die Regenerationsfähigkeit der betroffenen Nerven spielt, ist weitgehend unklar. Untersuchungen bei traumatischen Nervenschäden haben ergeben, dass unmittelbar nach der Nervenläsion die umgebenden Schwannzellen ihren Phänotyp ändern. Die Expression von Myelin-assoziierten Proteinen wird reduziert und neuronale Wachstumsfaktoren werden hochreguliert. Dazu gehören u.a. der "nerve growth factor", der "brain-derived neurotrophic factor" und der "glial-derived neurotrophic factor" (Sulaiman et al. 2013). In Neuronen, deren Axone geschädigt wurden, werden ebenfalls pro-regenerative Gene hochreguliert. Dies betrifft das "growth associated protein 43" (GAP 43) und das "cytoskeleton associated protein 23" (CAP 23), welche direkt am Wachstum regenerierender Axone beteiligt sind. Desweiteren werden Proteine des Zytoskeletts wie z.B. Aktin und Tubulin hochreguliert (Christie et al. 2013). Zusammen schaffen diese Veränderungen ein Milieu, das die Regeneration von geschädigten Nerven fördert (Sulaiman et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde GAP 43 untersucht, da mit Immunhistochemie gegen dieses Protein, epidermale Nervenfasern quantifizierbar gemacht werden können (Bursova et al. 2012; Narayanaswamy et al. 2012).

## **1.7 GAP 43 – Growth Associated Protein 43**

GAP 43 ist ein membrangebundenes, axonales Phosphorprotein, das initial als ein Bestandteil neuronaler Wachstumskegel und wachsender Neuriten beschrieben worden ist (Gamby et al. 1996). In der Literatur werden u.a. die Synonyme Calmodulin bindendes Protein P-5, pp46, Neuromodulin und Protein F1 verwendet.

GAP 43 ist an vielen verschiedenen Vorgängen im Nervensystem beteiligt. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung synaptischer Verbindungen während der Entwicklung und der Regeneration des Nervensystems und ist an der Modulation von Synapsen, z.B. in Teilen der Großhirnrinde und des limbischen Systems, während des gesamten Lebens beteiligt (Benowitz et al. 1997). Eine der wichtigsten Aufgaben von GAP 43 ist seine Beteiligung an Vorgängen, die das axonale Wachstum, die axonale Formation und die Aufrechterhaltung des Wachstumskegels betreffen. GAP 43 wird verstärkt bei Axonaussprossungen während des neuronalen Wachstums und der axonalen Regeneration exprimiert (Meiri et al. 1986). GAP 43 wird auch als Wachstums- oder Plastizitätsprotein bezeichnet und gilt als Marker für die Axonaussprossung. Dieser Prozess findet sowohl bei der ursprünglichen Entwicklung des Nervensystems, als auch bei Regenerationsvorgängen nach Axonverletzungen statt (Meiri et al. 1986).

GAP 43 wird im ZNS eines Erwachsenen u.a. in Regionen hoher synaptischer Plastizität, wie z.B. im limbischen System exprimiert (Benowitz et al. 1997). Im peripheren Nervensystem ist GAP 43 v.a. in sensiblen Nervenfasern zu finden, zu einem geringeren Teil auch in motorischen Nerven. Nach Nervenverletzungen steigt die Expression von GAP 43 an und es erfolgt ein Transport des Proteins von den dorsalen Spinalganglien in die sensiblen Nervenfasern des peripheren Nervensystems (Verzé et al. 2003).

Die Nervendurchtrennung mit Verlust der Verbindung zwischen dem sensiblen Neuron und seinem peripheren Zielgewebe ist der wichtigste Auslöser für die GAP 43 Synthese (Oestreicher et al. 1997). In Experimenten mit transgenen Mäusen wurde festgestellt, dass eine Nullmutation des GAP 43 Gens die axonale Aussprossung stört und zum Tode kurz nach Geburt führt. Eine Überexpression von GAP 43 dagegen führt zur Ausbildung neuer Synapsen und Aussprossungen nach Verletzungen. Die Funktion von GAP 43 bei der Axonaussprossung besteht in der Regulation der Zytoskelettorganisation in den Nervenenden (Benowitz et al. 1997).

## **1.8 Fragestellung und Zielsetzung**

Das Vorkommen von GAP 43 in Hautbiopsaten von PNP Patienten wurde bisher nur wenig untersucht (Bursova et al. 2012; Narayanaswamy et al. 2012). In Anbetracht der wichtigen Funktionen, die GAP 43 im Nervensystem hat, wird angenommen, dass GAP 43 als Marker für die Diagnose oder Prognose der PNP eine Bedeutung zukommen könnte. Es ist denkbar, dass die Quantifizierung GAP 43 positiver Nervenfasern in der Hautbiopsie Hinweise auf den Schweregrad einer PNP liefert oder Aufschluss über die Regenerationsfähigkeit der betroffenen Nervenfasern geben könnte. Eine höhere Expression von GAP 43 im Sinne einer höheren Anzahl an regenerierenden Nervenfasern könnte evtl. mit einer besseren Prognose oder mit einem besseren Therapieansprechen einhergehen. Mit dem Ziel, die Bedeutung von GAP 43 für die PNP zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit GAP 43 positive Nervenfasern in Hautbiopsien von PNP Patienten quantifiziert und mit den Werten einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die GAP 43 positiven Nervenfasern wurden als regenerierende Fasern bezeichnet. Zusätzlich erfolgte der Vergleich zur IENFD, welche mittels der etablierten PGP Färbung bestimmt wurde. Außerdem wurde analysiert ob Patientensubgruppen, die sich in Merkmalen wie Geschlecht, Alter, Schmerzempfinden oder PNP-Ätiologie unterscheiden, unterschiedliche GAP 43 oder PGP 9.5 Profile aufweisen.

## **2 Material und Methoden**

Die Teilnahme an der Studie erfolgte auf freiwilliger Basis, nachdem die Patienten und Probanden ausführlich mündlich und schriftlich aufgeklärt wurden und daraufhin ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme gaben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät befürwortet.

### **2.1 Einschlusskriterien für die Patientengruppe**

Für die Patientengruppe wurden prospektiv insgesamt 130 Patienten rekrutiert, die sich im Zeitraum der Rekrutierung von Mai 2007 bis April 2010 in der stationären Behandlung der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg befanden und im Rahmen der diagnostischen PNP Abklärung eine Hautbiopsie erhielten.

Für die Diagnosestellung der PNP, die Teil der standardisierten Untersuchung auf den Stationen ist, wurde eine vollständige Anamnese erhoben, die körperliche neurologische Untersuchung durchgeführt, elektrophysiologische Messungen veranlasst und Laboranalysen aus Blut und Liquor vorgenommen.

Die Blutanalysen umfassten die Untersuchung des kleinen Blutbildes, sowie des Differentialblutbildes, des C-reaktiven Proteins (CRP), der Blutkörperkungsgeschwindigkeit, der Leber-, Nieren- und Schilddrüsenfunktionsparameter und Serumelektrolyte.

Außerdem wurden die Nüchtern glukosewerte und der HbA1c-Wert bestimmt und ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt, um einen Diabetes mellitus bzw. eine Glukoseintoleranz nachweisen oder ausschließen zu können.

Bei Hinweisen auf entsprechende Erkrankungen wurden die Patienten auf Vitamin B6- und B12-Mangel, Folsäure-Mangel, monoklonale Immunglobuline, antinukleäre Antikörper, extrahierbare antinukleäre Antikörper, antineutrophile cytoplasmatische Autoantikörper und Rheumafaktoren untersucht. Die Liquoranalyse umfasste sowohl die Routinediagnostik mit der Bestimmung von Zellzahl und Liquoreiweiß, als auch die Immunfixation mit isoelektrischer Fokussierung auf oligoklonale Banden.



In der elektrophysiologischen Untersuchung wurden an den oberen und unteren Extremitäten symptomorientiert zahlreiche sensible und motorische Nerven untersucht.

Ließ sich die Ursache der PNP mittels der genannten diagnostischen Möglichkeiten nicht eindeutig klären, wurde bei den Patienten eine Biopsie des N. suralis durchgeführt.

## **2.2 Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe**

In der Kontrollgruppe befanden sich 27 Personen, die sich freiwillig zur Studienteilnahme bereit erklärten.

Gesunde Kontrollen durften keine akuten oder chronischen Schmerzen und/oder keine Entzündungszeichen zeigen und keinerlei Anzeichen für das Vorliegen einer PNP aufweisen.

## **2.3 Gewinnung der Hautbiopsien**

Bei allen Studienteilnehmern wurde eine proximale und eine distale Hautbiopsie entnommen. Die distale Biopsie wurde am lateralen Unterschenkel (US) ca. 10 cm proximal des Malleolus lateralis und die proximale Biopsie am lateralen Oberschenkel (OS), ca. 20 cm distal der Spina iliaca anterior superior entnommen. Die beiden Biopsieorte wurden gewählt, um die Längenabhängigkeit der IENFD und der regenerierenden Fasern beurteilen zu können. Die Hautbiopsie am US erfolgte bei den Patienten bei der N. suralis Biopsie, während die Biopsie am OS mittels einer 5 mm kleinen Hautstanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main) entnommen wurde. Nach viermaliger Desinfektion der Biopsieorte wurde eine Lokalanästhesie mit Scandicain 1% durchgeführt und anschließend die Hautproben entnommen. Die Wunde wurde nach der Biopsieentnahme mit Klammerpflastern versorgt.

## **2.4 Gewebeaufarbeitung**

Das Hautbiopsat wurde direkt nach der Entnahme zur Gewebefixation in einen 4%igen Paraformaldehydpuffer gegeben und in diesem für zwei bis vier Stunden bei +4°C gelagert. Danach wurde es dreimal im Abstand von jeweils 10 Minuten mit einem

0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und anschließend in eine 10%ige Saccharose Lösung (10 g Saccharose in 100 ml Phosphatpuffer) gegeben. Das Gewebe wurde dann für 24 Stunden bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach Ablauf der 24 Stunden wurde die Saccharose Lösung verworfen und die Hautbiopsate in dem Einbettmedium Tissue Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande) eingebettet. Darin kamen die Schnitte dann in einen Behälter, der mit 2-Methylbutan (M: 72,15 g/mol; Dichte 0,62; FA Roth, Karlsruhe) gefüllt war. Dieser Behälter wurde dann für ca. eine halbe Minute in ein Gefäß mit tiefgekühltem Flüssigstickstoff gegeben, wodurch die Biopsate schockgefroren wurden. Anschließend wurden die Biopsate bei -20°C für ca. 10 Min gelagert und danach in bereits vorgekühlte Röhrchen gelegt und bei -80°C bis zur weiteren Prozessierung gelagert.

Das Schneiden der Hautbiopsate in 40 µm Schnitte erfolgte mit einem Cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar). Es wurden jeweils drei Serienschnitte auf einen Super Frost beschichtete Objektträger (R. Langenbrick GmbH, Emmendingen) aufgetragen und zuerst 30 Min luftgetrocknet und danach über Nacht bei -20°C eingefroren.

## **2.5 Immunhistochemische Färbung**

### **2.5.1 GAP 43 Färbung**

Nach Auftauen bei Raumtemperatur wurde jeder der drei Hautschnitte auf dem Objektträger mit einem PAP-Pen umrandet. Dadurch entstand ein hydrophober Kreis um die Gewebeschnitte, in dem sich später die aufgetragenen Lösungen ansammeln konnten, so dass beim Auftragen der Antikörper nicht zu viel Material benötigt wurde. Danach wurde jeder der drei Serienhautschnitte auf dem Objektträger mit einer Lösung von 10% BSA (Rinderserumalbumin; laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen) in PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,4; 0,1 M) eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Durch die Proteinlösung wird verhindert, dass sich der Hintergrund später unspezifisch färbt. Die vor dem ersten Antikörper aufgetragene Proteinlösung besetzt elektrisch geladene Antigene, die sonst den Primärantikörper binden könnten und zu falsch positiver Anfärbung führen könnte.

Dann wurde der erste Antikörper angesetzt. Dazu stellte man erst 1%iges BSA (1 ml 10% BSA + 9 ml PBS) und 0,3% TritonX (1 ml dieses 1% BSA + 3 µl TritonX) her. Danach wurden 1 µl des GAP 43 Antikörpers (Abcam, Cambridge, 1:500) in einer Verdünnung von 1:500 mit 500 µl 1% BSA und 0,3% Triton X vermischt.

Bei dem gesamten Färbeprozess war darauf zu achten, dass der Antikörper möglichst wenig Licht ausgesetzt wurde, daher erfolgte die Aufbewahrung der Schnitte während des Färbeprozesses und bis zur Auswertung in Präparatemappen (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe).

Nach dem Ansetzen des ersten Antikörpers wurde die BSA Lösung vorsichtig von den Objektträgern mit den Hautschnitten entfernt, der Antikörper auf die Gewebsschnitte aufgetragen und über Nacht (ca. 18 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert.

Am zweiten Tag wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Dazu wurden zuerst die über Nacht mit dem Primärantikörper inkubierten Hautschnitten dreimal mit PBS gewaschen um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper angesetzt, indem man Cy3 konjugiertes IgG 1:100 mit 1% BSA in PBS verdünnte. Dies wurde dann auf die Hautschnitte aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Hautschnitte wieder dreimal mit PBS gewaschen und anschließend eingebettet. Als Einbettmedium wurde DABCO (25 ml PBS; 75 ml Glycerol ~87%; 2,5g DABCO = 1,4-Diazabicyclo-[2.2.2.]-octan) verwendet. Danach wurde ein Deckglas über die Schnitte gelegt und die Deckglasränder mit Vitro Clud versiegelt.

So konnten die Hautschnitte bis zur Auswertung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### **2.5.2 PGP 9.5 Färbung**

Die Färbung der Hautschnitte mit dem Antikörper PGP 9.5 (Ultra Clone Limited, Isle of Wight, 1:800) ist mit der GAP 43 Färbung fast identisch. Ein Unterschied besteht darin, dass nach dem Umrändern der Hautschnitte mit dem PAP-Pen und dem Auftragen der

10% BSA in PBS Lösung die Schnitte nicht eine Stunde, sondern nur 30 Min bei Raumtemperatur geblockt werden.

Beim Ansetzen des Primärantikörpers gibt es einen zweiten Unterschied: Man stellt wie bei der GAP 43 Färbung 500 µl 1%iges BSA und 0,3% TritonX her und mischt dies mit 1 µl des PGP 9.5 Antikörpers. Der Unterschied ist, dass der PGP 9.5 Antikörper nicht wie der GAP 43 Antikörper in einer Verdünnung von 1:500, sondern in einer Verdünnung von 1:800 verwendet wird.

Auch an Tag zwei der Färbung ist alles identisch mit der GAP 43 Färbung außer, dass man beim Ansetzen des zweiten Antikörpers Cy3 konjugiertes IgG nicht in einer Verdünnung von 1:100, sondern in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

## **2.6 Histologische Auswertung und Dokumentation**

Da das Schnittmaterial zahlenkodiert war, erfolgte die Auswertung standardisiert unter verblindeten Bedingungen. Dadurch konnten subjektive Beurteilungsfehler vermieden werden. Außerdem wurden alle Auswertungen unter gleichen Bedingungen am gleichen Fluoreszenzmikroskop (Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena) durchgeführt.

Unter folgenden Umständen galt ein Schnitt als nicht auswertbar: keine bzw. sehr schlechte Anfärbung des Hautschnittes, keine Epidermis sichtbar bzw. Epidermis von der Dermis nicht abgrenzbar oder von der Dermis abgerissen.

Die Auszählung der 40 µm dicken Hautschnitte erfolgte an dem Axiophot Mikroskop (Zeiss, Jena) und entsprechende Fotos der Hautschnitte wurden mit der Meta-View Kamera (Diagnostic Instruments Zeiss) und dem Dokumentationsprogramm Spot 32 (Universal Imaging, Pennsylvania, USA) zu Vermessungs- und Dokumentationszwecken gemacht. Sowohl von den Patienten als auch von den Kontrollen wurden alle drei Serienschnitte des Hautbiopsats gemäß der Richtlinien der European Federation of Neurological Societies (Lauria et al. 2005) ausgewertet und die IENFD in der PGP 9.5 Färbung bestimmt. Die GAP 43 Färbung diente zur Bestimmung der Dichte an regenerierenden Fasern. Die Schnitte wurden zuerst in 40-facher Vergrößerung betrachtet. Gezählt wurden nur die Nervenfasern, die ihren Ursprung in der Dermis

hatten und die Grenze zur Epidermis überschritten. Verzweigte sich die Nervenfasern noch in der Dermis in mehrere kleine Nervenäste, die in die Epidermis eindringen, so wurde jeder in die Dermis dringende Ast einzeln gezählt. Verzweigte sich die Nervenfasern erst nachdem sie die Grenze zur Epidermis bereits überschritten hatte, wurde nur der Hauptstamm der Nervenfasern gezählt. Abbildung 1 stellt graphisch dar, wie die Nervenfasern gezählt wurden.

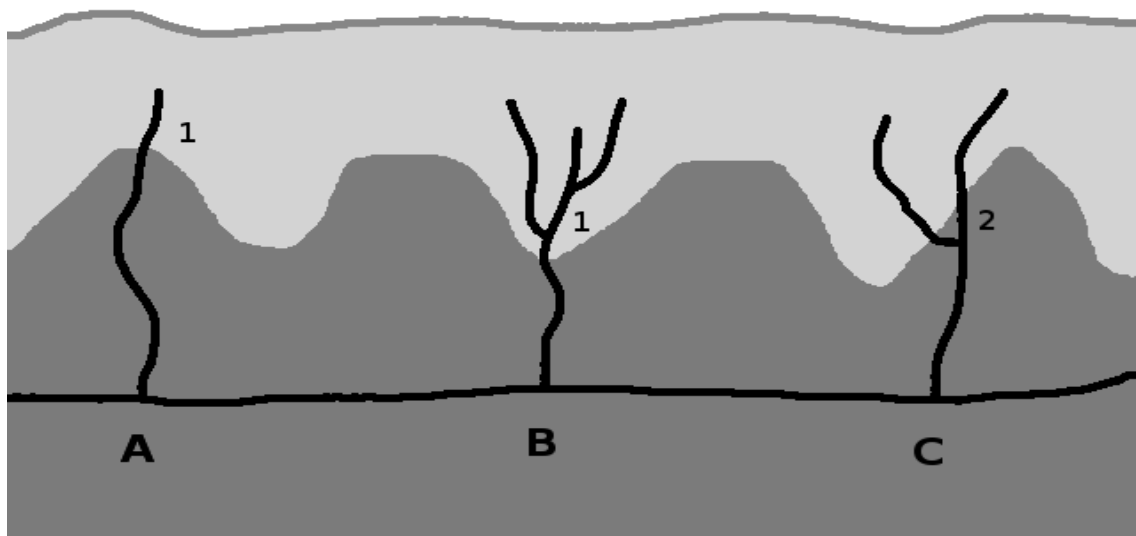


Abbildung 1 (modifiziert nach Lauria et al. 2005) stellt graphisch die Zählregeln der Nervenfasern dar (Lauria et al. 2005): Es werden die Nervenfasern gezählt, die ihren Ursprung in der Dermis (dunkelgrau) haben und die Basalmembran zur Epidermis (hellgrau) überschreiten (siehe in Abbildung Buchstabe A). Zweigt sich die Nervenfasern erst in der Epidermis in ihre Äste auf, so wird nur der Hauptstamm der Nervenfasern gezählt (siehe in Abbildung Buchstabe B). Zweigen sich die Nervenfasern noch in der Dermis auf, wird jeder einzelne in die Epidermis reichende Nervenast gezählt (siehe in Abbildung Buchstabe C).

Die ausgewerteten Hautschnitte wurden jeweils mittels der oben genannten Software fotodokumentiert. Anhand dieser Fotos erfolgte die Vermessung der Epidermislänge entlang des Stratum basale in 2,5-facher Vergrößerung. Die Längenmessung erfolgte an jedem der drei Serienschnitte des Hautbiopsats und anschließend wurde aus den gewonnenen drei Werten der Mittelwert gebildet. Die Nervenfaserdichte des Hautbiopsats ergab sich als Quotient des Nervenfasermittelwert und des Längenmittelwertes und wurde als Fasern/mm angegeben. Die IENFD gibt die Anzahl der Nervenfasern pro mm Haut an. Abbildung 2 zeigt zwei GAP 43 gefärbte Hautschnitte nach Mikroskopie mit dem 40er Objektiv.

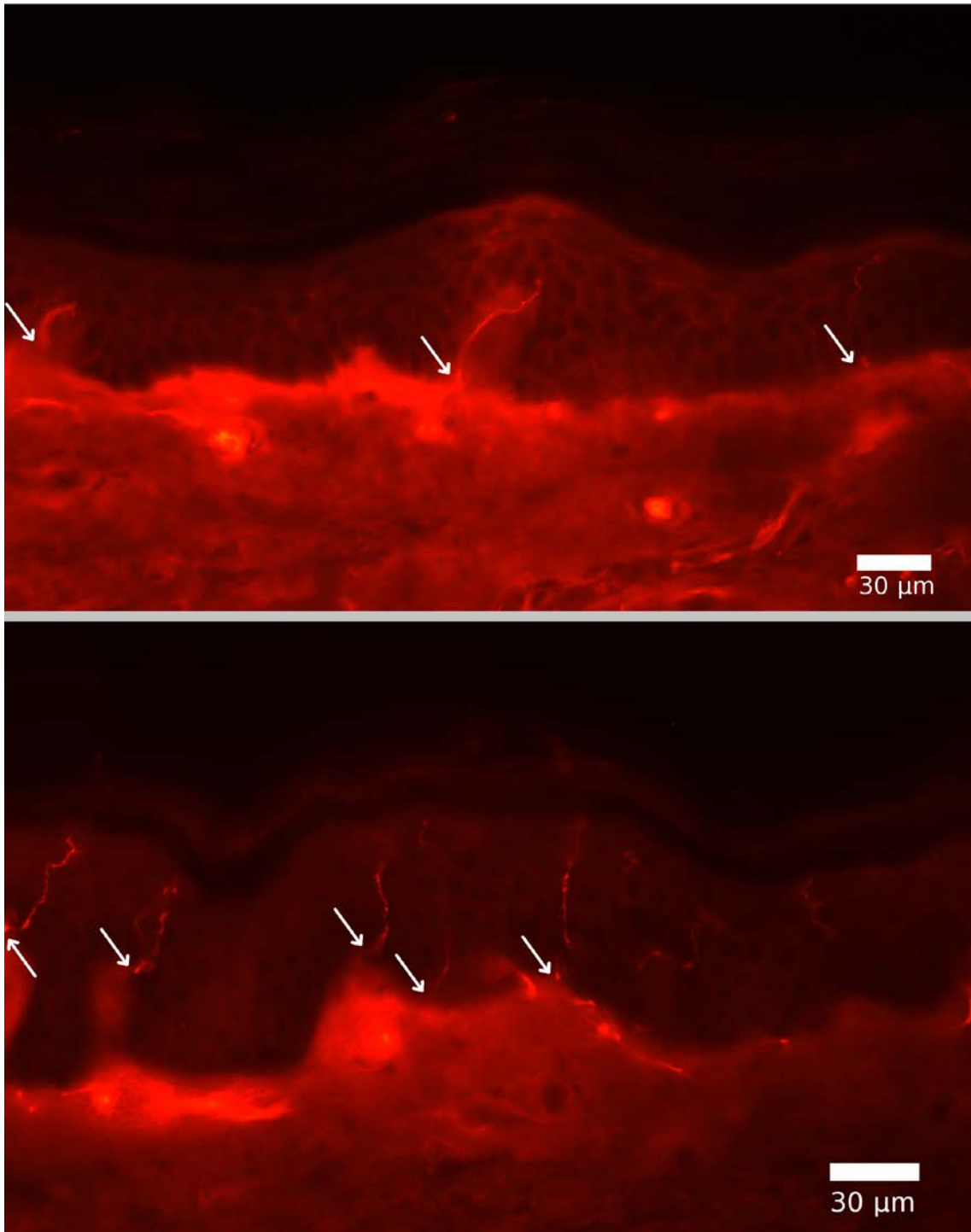


Abbildung 2; zwei GAP 43 gefärbte Hautbiopsate; auf beiden Präparaten sind GAP 43 positive intraepidermale Nervenfasern zu erkennen, die die Basalmembran kreuzen (siehe Pfeile).

## 2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Statistical Package for Social Science (SPSS 19, IBM Ehningen) durchgeführt. Alle Daten werden als Median mit

Spannweite präsentiert. Da die Daten nicht nach dem Gauss'schen Verteilungsmuster normal verteilt waren, wurden Vergleiche zwischen zwei Gruppen mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-U Test berechnet, wenn es sich um unabhängige Stichproben handelte und mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test, wenn es sich um verbundene Stichproben handelte. Bei Berechnungen, die mehr als zwei Variablen einschlossen, wurde die nicht parametrische Varianzanalyse (ANOVA) Kruskal-Wallis-Test unabhängiger Stichproben verwendet. Bei allen drei Tests (Mann-Whitney-U Test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test, Kruskal-Wallis Test) lag das Signifikanzniveau bei  $p < 0,05$ . Als Parameter für den Grad der Korrelation von Variablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Eine Korrelation wurde bei einem p-Wert  $< 0,05$  als signifikant erachtet.

## 2.8 Materialien

Reagenzien	Details	Firma, Katalognummer
BSA	Albumin from bovine serum, Schützt u.a. vor oxidativen Schäden	Sigma Aldrich, CAS Nr. 9048-46-8
Cy3 konjugiertes IgG	Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Nr. 111-165-003
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2.2.2)octane, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> Einbettmedium für Fluoreszenzschnitte	Merck Darmstadt, Deutschland Nr. 803456
GAP 43 Antikörper	Primärer, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	Abcam ab7462
PGP 9.5 Antikörper	Primärere, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	Ultra Clone Limited,

Reagenzien	Details	Firma, Katalognummer
		Isle of Wight, England
Tissue Tek	Tissue – Tek O.C.T Compound für die Histologie. Fixiergel für Biopsien und Gewebeschnitte	Sakura Finetek Europe B.V.  Nr. SAK 4583
Triton X-100	4-(1,1,3,3- Tetramethylbutyl)phenyl- polyethylene glycol, Zur Erholung der Membranbestandteile von Gewebeschnitten	Sigma Aldrich, CAS Nr. 9002-93-1
Vitro Clud	Einschlussmittel	R. Langenbrick GmbH, Emmendingen, Deutschland

Tabelle 1; verwendete Reagenzien

Gerät	Details	Firma, Katalognummer
Cryostat	Kryostat Schneidegerät mit Objektkühlung	Leica Microsystems Nr. CM3050s
PAP Pen	PAP Pen für die Immunhistochemie	Sigma Aldrich Nr. Z377821-1EA
Fluoreszenzmikroskop	Fluoreszenzmikroskop Axi- ophot 2	Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Deckgläser	24x32mm	R. Langenbrick GmbH



Gerät	Details	Firma, Katalognummer
Adhäsions-Objektträger SuperFrost Plus	25 x 75 x 1mm	R. Langenbrick GmbH
Färbezylinder nach Hellendahl	-	Superior Marienfeld, Nr. 4200001
Safe Seal Reagiergefäß	2 und 1,5ml	Sarstedt AG & Co
Präparatemappe	Präparatemappe mit Deckel, einteilig für 20 Objektträger	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 2; verwendete Geräte und Materialien

Lösung	Rezept
1l 0,1 M Phosphatpuffer	405ml di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat + 95ml Natriumdihydrogenphosphat- Dihydrat Mit Aqua dest. auf 900ml auffüllen pH von 7,4 einstellen auf 1l mit Aqua dest. auffüllen
4% PFA (Paraformaldehydlösung)	2 g Paraformaldehyd in 50ml 0,1M Phosphatpuffer bei 60°C lösen und anschließend filtrieren; dann abkühlen lassen und einen pH 7,4 einstellen

Lösung	Rezept
PBS (Phosphate buffered saline)  2l 0,1M	800ml di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (0,2M) + 800ml Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat pH von 7,4 einstellen 60ml 5M NaCl hinzugeben Auf 2l mit Aqua dest. auffüllen

Tabelle 3; verwendete Lösungen

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Auswertung der klinischen Daten des Patientenkollektivs**

#### **3.1.1 Demographische Daten**

Im Zeitraum von Mai 2007 bis April 2010 beteiligten sich insgesamt 130 an einer PNP erkrankte Patienten während ihres Aufenthalts an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg an der Studie. Das mediane Alter der Patienten betrug 64,5 Jahre (29-85). Unter den 130 Patienten befanden sich 98 Männer (75,4%) und 32 Frauen (24,6%). Das mediane Alter von Männern und Frauen unterschied sich nicht.

74 der 130 Patienten (56,9%) litten unter einer schmerzhaften PNP, die übrigen 56 Patienten (43,1%) waren schmerzfrei. Eine PNP wurde als schmerzhaft gewertet, wenn die Betroffenen anamnestisch Schmerzen angaben. Bei den männlichen Patienten war das Verhältnis zwischen schmerzhaften und schmerzfreien Patienten ausgeglichen: 48 der 98 männlichen Patienten (49%) waren schmerzfrei, wohingegen 50 Patienten (51%) angaben, unter Schmerzen zu leiden. Bei den weiblichen Patienten überwog der Anteil der schmerzhaften PNP. 24 der 32 Patientinnen (75%) litten unter Schmerzen und nur acht Patientinnen (25%) waren schmerzfrei.

Die mediane Krankheitsdauer der Patienten bis zur Biopsie lag bei drei Jahren (0,1-25), wobei sich Männer und Frauen kaum voneinander unterschieden. Die mediane Krankheitsdauer bei Frauen betrug zwei Jahre (0,2-20) und bei Männern drei Jahren (0,1-24,9). 59 der 130 Patienten (45%) wurden innerhalb der ersten zwei Jahre nach Symptombeginn biopsiert, nach vier Jahren lag der Anteil bei 65%.

#### **3.1.2 Ätiologien der PNP**

Die Einteilung der PNP nach der Ätiologie erfolgte anhand der finalen, klinischen Diagnose, welche unter Berücksichtigung der kompletten Diagnostik gestellt wurde.

Die CIDP wurde unter Berücksichtigung der diagnostischen Kriterien nach INCAT (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group) in Formen unterteilt, die diese Kriterien erfüllten (INCAT positiv) und solche, die diese nicht erfüllten (INCAT

negativ). Bei den diagnostischen Kriterien nach INCAT handelt es sich um klinische und elektrophysiologische Kriterien, die die Diagnosestellung einer CIDP ermöglichen sollen (Hughes et al. 2001; Sander et al. 2003). Die INCAT negative CIDP wurde weiter unterteilt in die rein sensible CIDP und die CIDP, die trotz typischer klinischer Symptomatik mit motorischer Beteiligung die Kriterien nach INCAT formal nicht erfüllten (siehe Tabelle 12 im Anhang). Anhand der aktuellen Leitlinien wurden die Diagnose vaskulitische PNP (Collins et al. 2010) und SFN (Lauria et al. 2010) gestellt.

Insgesamt war die CIDP mit 45 betroffenen Patienten als Krankheitsursache der PNP am häufigsten vertreten. An zweiter Stelle folgten 21 Patienten mit der Diagnose vaskulitische PNP, wobei acht dieser Patienten (38,1%) eine systemische Vaskulitis hatten und 13 (61,9%) unter einer isolierten Vaskulitis des peripheren Nervensystems (PNS) litten.

Die Verteilung der PNP Ätiologien in der untersuchten Studienkohorte ist in der folgenden Tabelle 4 nach Häufigkeit aufgelistet:

<b>Ätiologie</b>	<b>Anzahl der betroffenen Patienten</b>
CIDP (INCAT positiv)	20
Sensible CIDP	13
Isolierte Vaskulitis des PNS	13
CIDP (INCAT negativ)	12
PNP unklarer Ätiologie	10
Axonale PNP	8
Systemische Vaskulitis	8
SFN	7
Paraproteinämische PNP	6
Diabetische PNP	5
Hereditäre PNP	4
MADSAM	3
GBS	3

Ätiologie	Anzahl der betroffenen Patienten
ALS	3
MMN	2
PNP bei Amyloidose	2
Ganglionitis	1
Axonale Neuritis	1
Autonome PNP bei Hepatitis C	1
PNP bei POEMS-Syndroms	1
PNP bei Neuroborreliose	1
PNP bei Sjögren Syndrom	1
Paraneoplastische PNP	1
Kupfermangel PNP	1
Vitamin B-12 Mangel PNP	1
PNP bei SMA	1
PNP bei Sjögren Syndrom und DM 2	1

**Tabelle 4; Ätiologien der PNP Abkürzungen:** CIDP = chronisch inflammatorische und demyelinisierende PNP; NP = Neuropathie; MADSAM = Multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie; MMN = Multifokale Motorische Neuropathie; SFN = Neuropathie der kleinen Fasern; GBS = Guillain-Barré Syndrom; INCAT = Kriterien der INCAT (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment) – Group, klinische und elektrophysiologische Kriterien, die die Diagnosestellung einer CIDP ermöglichen sollen (Hughes et al. 2001); POEMS-Syndrom = Syndrom mit Polyneuropathie, Organomegalie, monoklonaler Gammopathie und Hautveränderungen (skin); SMA = Spinale Muskelatrophie; DM = Diabetes mellitus

### 3.2 Auswertung der klinischen Daten des Kontrollkollektivs

Das Kontrollkollektiv umfasste 27 gesunde Personen, die weder aktuell noch in der Vergangenheit eine neurologische Erkrankung aufwiesen. Außerdem litten die Kontrollpersonen weder unter akuten, noch chronischen Schmerzen und zeigten keine Entzündungszeichen.

Das mediane Alter der Kontrollpersonen lag bei 46,5 Jahren (23-84). In der Kontrollgruppe befanden sich sechs Männer (22%) und 21 Frauen (78%). Das mediane Alter von Frauen und Männer unterschied sich nicht.

### 3.3 Auswertung der histologischen Daten

Es wurden die Hautbiopsien von 130 Patienten und 27 Kontrollen ausgewertet. Ziel war es von jedem Studienteilnehmer die IENFD (PGP 9.5 Färbung) und die Dichte der regenerierenden Nervenfasern (GAP 43 Färbung) in der Biopsie des US und des OS zu bestimmen. Die Auswertung aller vier Präparate pro Person war nicht immer möglich, da in einigen Fällen der Patient oder Proband der Entnahme von nur einer Hautbiopsie (US) zustimmte oder technische Probleme die korrekte Auswertung eines Präparats verhinderten.

Die nachfolgende Tabelle 5 zeigt die Anzahl der gültigen und fehlenden bzw. nicht auswertbaren Hautschnitte von Patienten und Kontrollen:

		<b>PGP 9.5 des US</b>	<b>PGP 9.5 des OS</b>	<b>GAP 43 des US</b>	<b>GAP 43 des OS</b>
<b>Ausgewertete Hautschnitte</b>	Patienten	126	88	129	76
	Kontrollen	23	14	25	16
<b>fehlende/nicht auswertbare Hautschnitte</b>	Patienten	4	42	1	54
	Kontrollen	4	13	2	11

Tabelle 5; Übersicht über die Anzahl der auswertbaren und nicht auswertbaren Präparate

#### 3.3.1 Quantifizierung der IENFD und der regenerierenden Nervenfasern

Die Quantifizierung der PGP 9.5 positiven Fasern in der Kontrollgruppe ergab am US eine mediane IENFD von 8,5 Fasern/mm (3,9-13,2) und für den OS 10,7 Fasern/mm (5,7-17,2). In der Patientengruppe betrug die mediane IENFD für den US 2,7 Fasern/mm (0-2,4) und für den OS 6,3 Fasern/mm (0-4,9). Die Werte sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Abbildung 3 stellt die Verteilung der IENFD graphisch dar.

		PGP 9.5 des US	PGP 9.5 des OS
<b>Mittelwert (Fasern/mm)</b> <b>+/- Standardabweichung</b>	Patienten	3,5 +/- 3,4	6,9 +/- 5,7
	Kontrollen	9,1 +/- 2,8	10,8 +/- 3,1
<b>Median (Fasern/mm)</b> <b>(Spannbreite)</b>	Patienten	2,7 (0-20,4)	6,3 (0-37,9)
	Kontrollen	8,5 (3,9-13,2)	10,7 (5,7-17,2)

Tabelle 6; Übersicht über die ermittelten Werte der IENFD

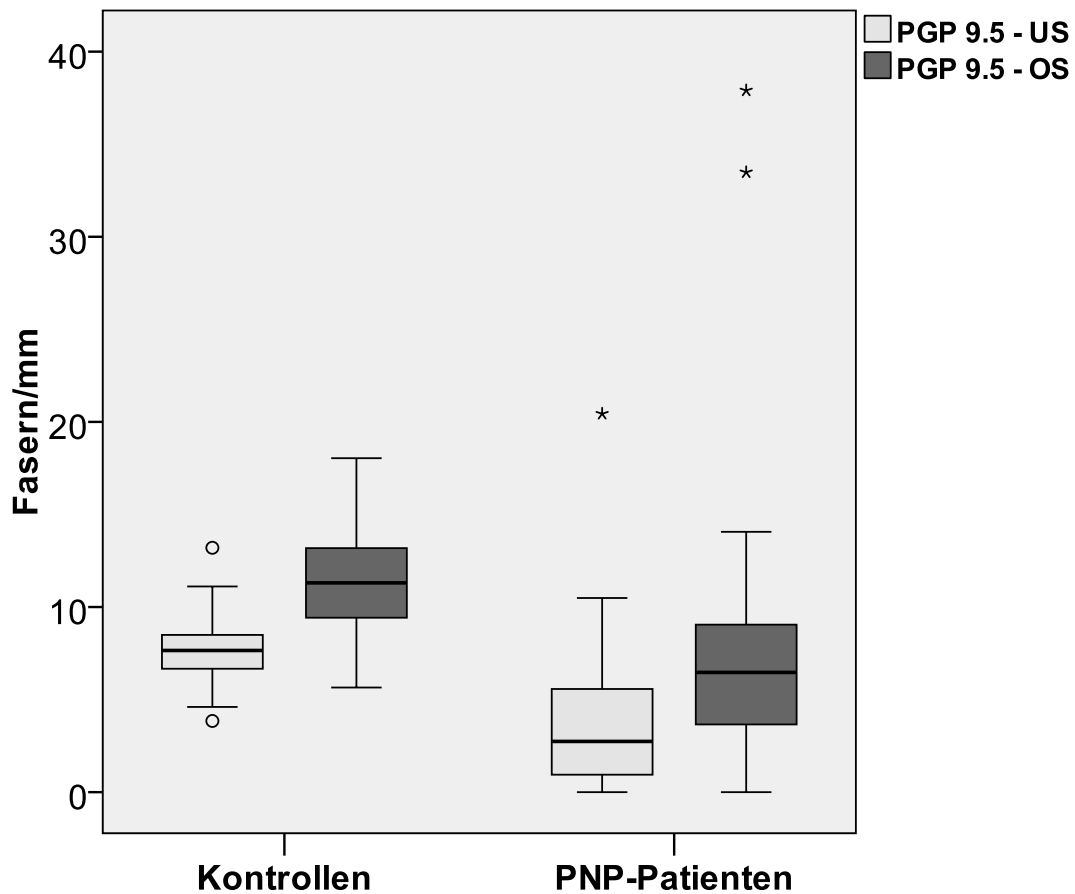


Abbildung 3; Verteilung der IENFD am US und OS bei Patienten und Kontrollen; ° = Ausreißer (Werte, die innerhalb eines Abstandes von +1,5 Interquartilabstand = IQR vom oberen Zaun bzw. -1,5 IQR vom unteren Zaun liegen), \* = extremer Ausreißer (Werte, außerhalb des 7 IQR-Bereiches)

Die Quantifizierung der GAP 43 positiven regenerierenden Fasern ergab in der Kontrollgruppe median 7,4 Fasern/mm am US (4,1-18,7) und 11,6 Fasern/mm am OS

(1,9-17,2). Die mediane Dichte an regenerierenden Fasern der gesamten Patientengruppe lag bei 5,1 Fasern/mm am US (0,1-17,3) und bei 11,6 Fasern/mm am OS (0,3-16,3). Eine Übersicht über die ermittelten Werte ist in Tabelle 7 zu finden. Abbildung 4 stellt die Verteilung der regenerierenden Fasern graphisch dar.

		GAP 43 des US	GAP 43 des OS
<b>Mittelwert (Fasern/mm)</b>	Patienten	5,1 +/- 3,5	7,7 +/- 3,7
	Kontrollen	8,9 +/- 4,5	11,3 +/- 3,5
<b>Median (Fasern/mm)</b>	Patienten	5,1 (0,1-17,3)	7,4 (0,3-16,3)
	Kontrollen	7,4 (4,1-18,7)	11,6 (1,9-17,2)
<b>(Spannbreite)</b>			

Tabelle 7; Übersicht über die Dichtewerte regenerierender Nervenfasern

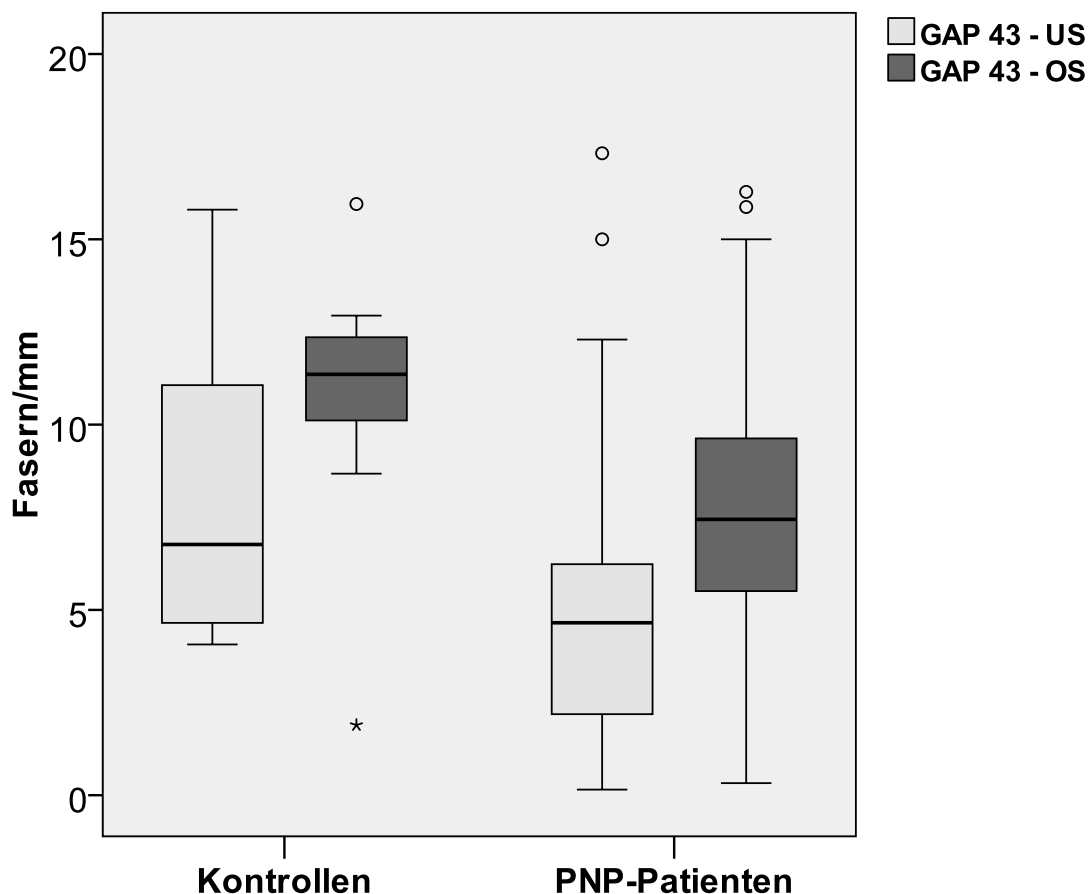


Abbildung 4; Verteilung der Dichte regenerierender Fasern am US und OS bei Patienten und Kontrollen; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer



Der Anteil regenerierender Fasern an der IENFD kann durch den Quotienten GAP 43 positive Fasern/ PGP 9.5 positive Fasern berechnet werden. Er betrug für die Kontrollen am OS und US 1 (OS: 0,3-2,1; US: 0,4-1,7). In der Patientengruppe zeigte sich ein Verhältnis von 1,3 (0,4-6,2) am OS und 1,6 (0,2-34,9) am US.

### **3.3.2 Vergleich zwischen Oberschenkel und Unterschenkel**

Die IENFD und die Dichte regenerierender Nervenfasern zeigten Unterschiede beim Vergleich der Präparate des OS und des US. Zur Berechnung von Gruppenunterschieden wurde in der Kontroll- und Patientengruppe getrennt voneinander der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test verbundener Stichproben für beide Färbungen durchgeführt.

Dabei ergab sich für die Kontrollgruppe in der PGP 9.5 Färbung am OS ein höherer Wert als am US ( $p < 0,05$ ). In der GAP 43 Färbung der Kontrollgruppe war die IENFD des OS im Vergleich zur IENFD des US ebenfalls erhöht ( $p < 0,05$ ).

Auch in der Patientengruppe zeigte sich in der PGP 9.5 Färbung ein deutlicher Unterschied ( $p < 0,01$ ). Die IENFD war am OS höher als am US. In der GAP 43 Färbung der Patientengruppe war die Dichte regenerierender Nervenfasern am OS im Vergleich zum US ebenfalls deutlich höher ( $p < 0,01$ ).

Abbildung 5 stellt die Unterschiede der IENFD und der regenerierenden Fasern am US und OS in den beiden Gruppen graphisch dar.

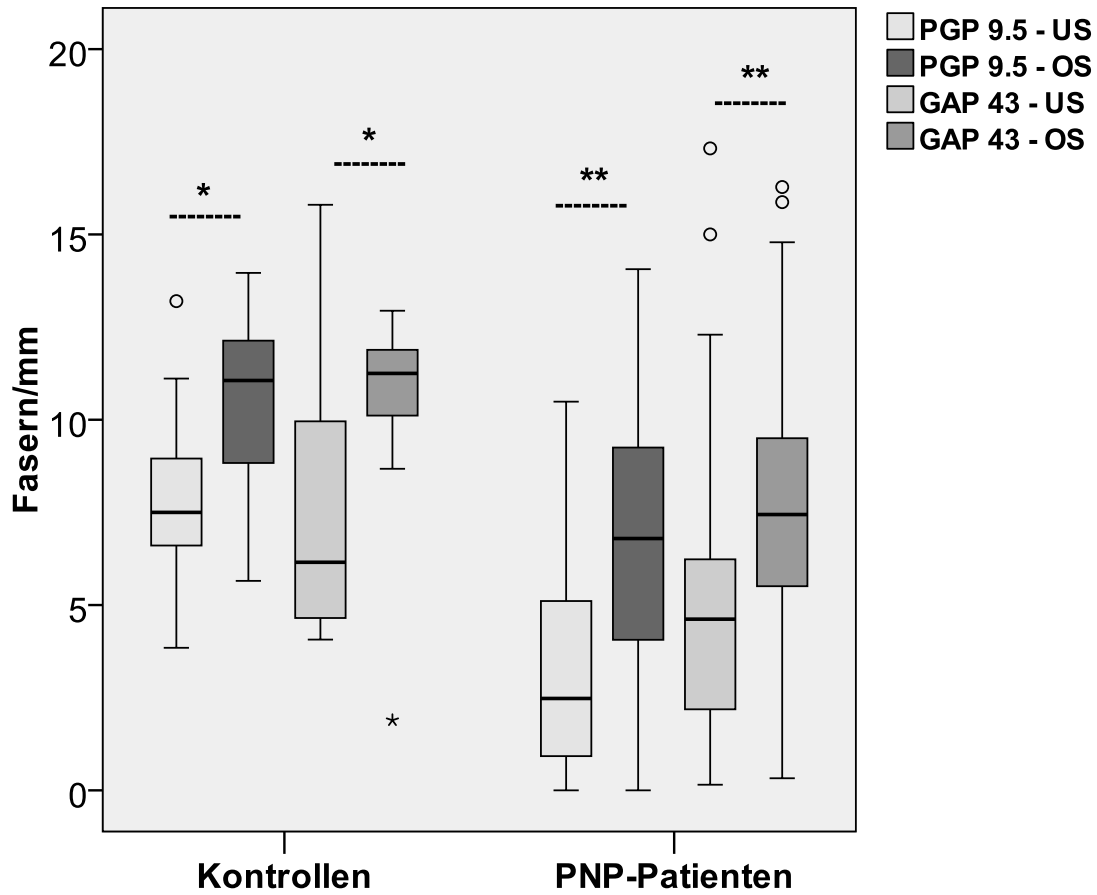


Abbildung 5; Vergleich der IENFD und der Dichte regenerierender Fasern am US und OS bei Patienten und Kontrollen; ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, .....\* = signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$ , .....\*\* = hochsignifikanter Unterschied mit  $p < 0,01$

### 3.3.3 Vergleich der IENFD und der Dichte regenerierender Fasern

Als nächstes wurde die IENFD mit der Dichte regenerierender Nervenfasern verglichen. Dazu wurde sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test verbundener Stichproben angewandt.

In der Kontrollgruppe konnte am US und OS keine Unterschiede zwischen der PGP 9.5 Färbung und der GAP 43 Färbung festgestellt werden ( $p$  in beiden Fällen  $> 0,5$ ).

Die Analyse der Patientengruppe hingegen ergab deutliche Unterschiede beim Vergleich der IENFD mit der Dichte regenerierender Fasern (für OS und US  $p < 0,01$ ). Die Patienten wiesen sowohl am US als auch am OS mehr regenerierende Nervenfasern auf.

Abbildung 6 stellt den Vergleich zwischen IENFD und der Dichte regenerierender Fasern graphisch dar.

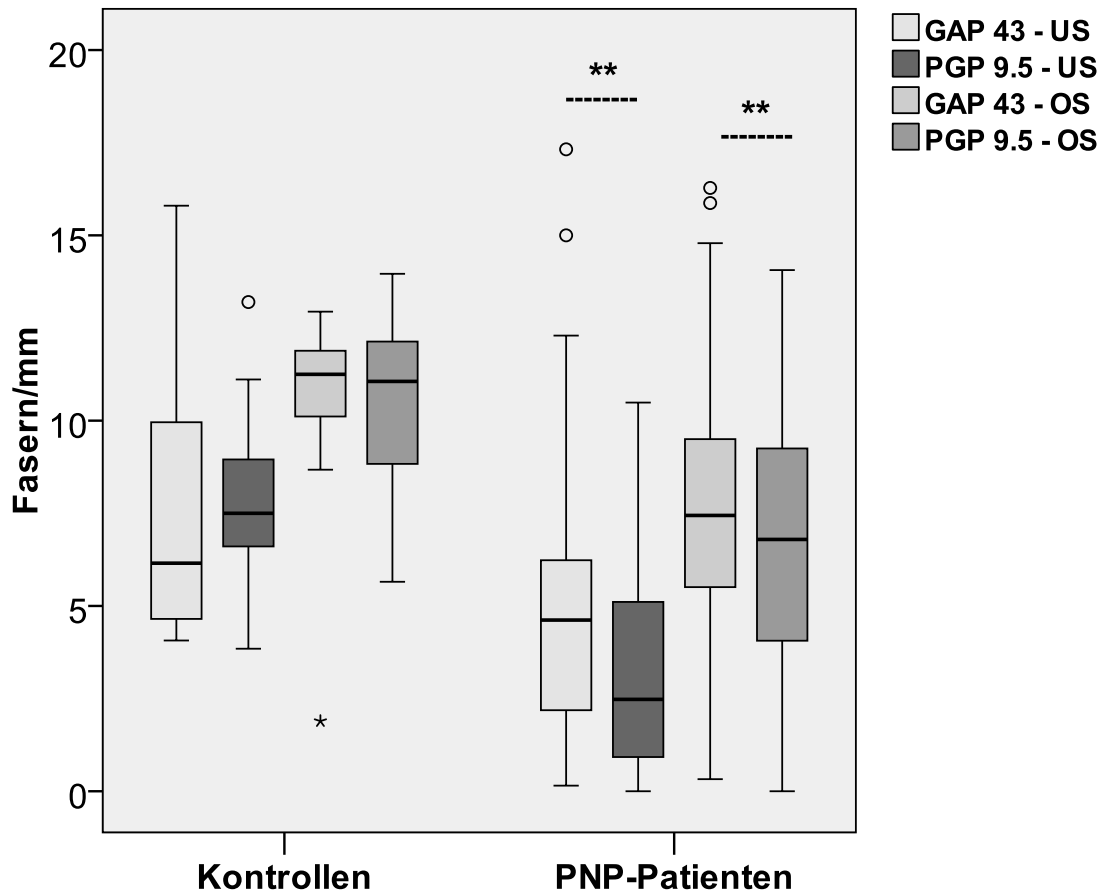


Abbildung 6; Vergleich der IENFD am US und OS mit der Dichte der regenerierenden Fasern in der Kontroll- und Patientengruppe; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer, .....\* = signifikanter Unterschied, .....\*\* = hochsignifikanter Unterschied

### 3.3.4 Vergleich der Faserdichten zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe

Zur Berechnung der Unterschiede wurde der Mann-Whitney-U Test unabhängiger Stichproben angewandt.

Mit  $p < 0,01$  zeigte sich zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe ein deutlicher Unterschied für beide Färbungen (regenerierende Fasern und IENFD) sowohl in den Präparaten des US als auch des OS. Die Kontrollen wiesen am US und OS höhere Werte für die IENFD und die Dichte regenerierender Fasern auf als die Patienten.

Bei der Betrachtung des Quotienten GAP 43 positive Fasern/ PGP 9.5 positive Fasern zeigte sich jedoch, dass die Patienten am US einen deutlich höheren Anteil an regenerierenden Fasern aufwiesen als die Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Bei den Patienten betrug der Quotient am US 1,6 (0,2-34,9), bei den Kontrollpersonen hingegen wurde ein Quotient von 1 (0,4-1,7) ermittelt. Am OS konnte in dieser Beziehung kein Unterschied nachgewiesen werden.

In Abbildung 7 und Abbildung 8 sind die Unterschiede der Nervenfaserdichten zwischen Patienten und Kontrollpersonen graphisch dargestellt.

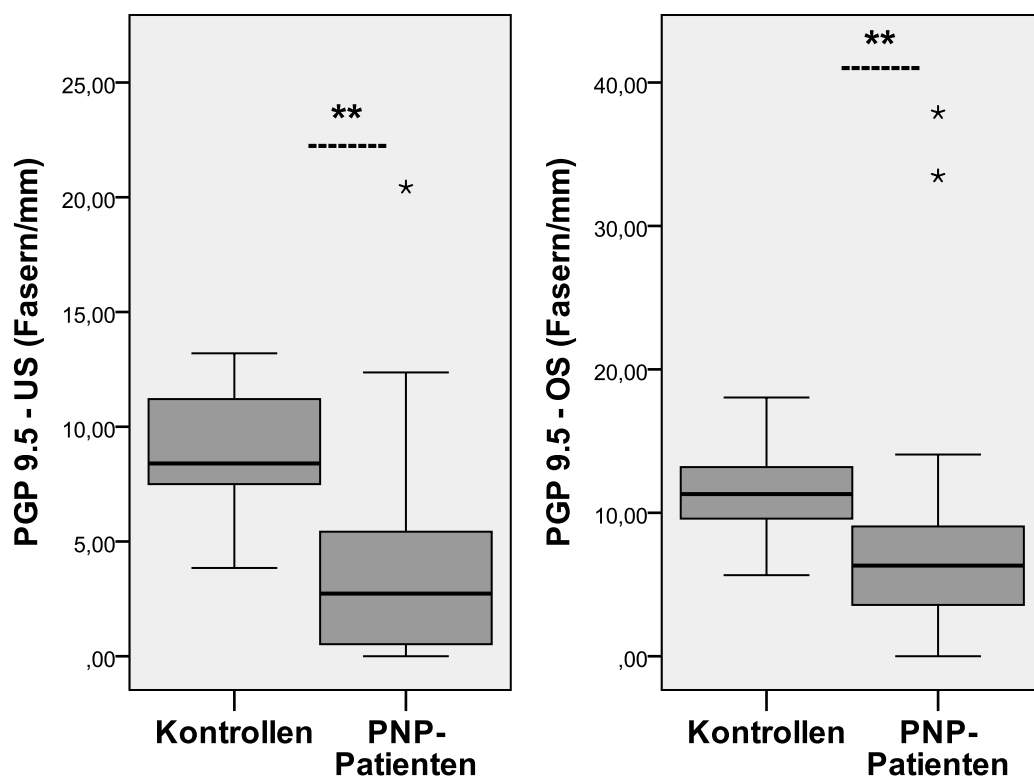


Abbildung 7; Vergleich der IENFD am US und OS zwischen Patienten- und Kontrollgruppe; \* = extreme Ausreißer, \*\* = hochsignifikanter Unterschied

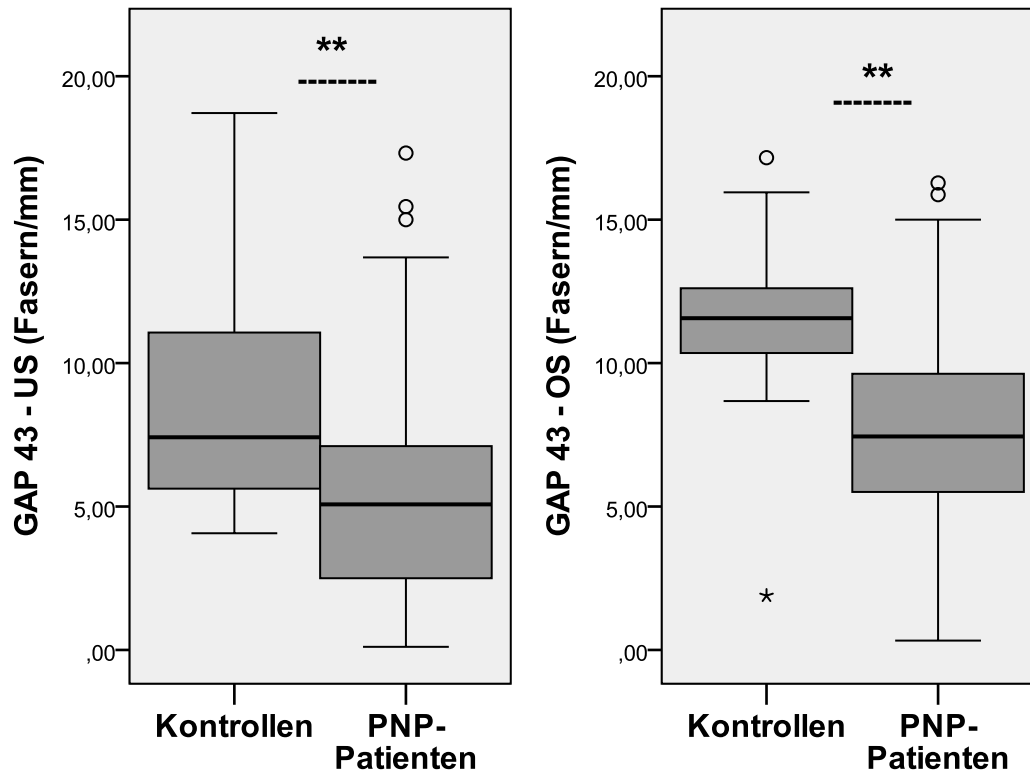


Abbildung 8; Vergleich der Dichte regenerierender Fasern am US und OS zwischen Patienten- und Kontrollgruppe; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer, ..... = hochsignifikanter Unterschied

### 3.3.5 Untersuchung von Einflussfaktoren

Als nächstes wurden verschiedene Faktoren untersucht, die einen Einfluss auf die IENFD und die Dichte regenerierender Nervenfasern haben könnten. Als mögliche Einflussfaktoren wurden Alter, Geschlecht, Schmerz und die ätiologische Einteilung der PNP betrachtet.

#### 1. Alter

Um den Effekt des Alters auf die IENFD und die regenerierenden Fasern zu untersuchen, wurden verschiedene Alterskategorien gebildet. Die Unterteilung begann bei den unter 30jährigen und erfolgte dann ab dem 30. Lebensjahr in Fünf-Jahres-Schritten bis zum Alter von 80+ Jahren. Eine Übersicht über die gebildeten Alterskategorien und die Anzahl der darin enthaltenen Personen ist in Tabelle 8 zu finden.

Alterskategorie (Jahre)	PNP-Patienten	Kontrollen
<= 30	1	7
31-35	1	1
36-40	3	1
41-45	9	2
46-50	7	4
51-55	14	1
56-60	16	1
61-65	16	2
65-70	18	2
71-75	29	0
76-80	13	0
81+	3	2

**Tabelle 8; Übersicht über die Altersverteilung der Studienteilnehmer**

Es wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen Alter und den Biopsie-Ergebnissen bestand (mittels Korrelationskoeffizient nach Spearman) und ob sich Unterschiede über die verschiedenen Alterskategorien ermitteln ließen (mittels Kruskal-Wallis-Test unabhängiger Stichproben).

Hierbei zeigte sich, dass in der Kontrollgruppe am US ein höheres Alter mit einer niedrigeren IENFD (Korrelationskoeffizient nach Spearman = - 0,53 bei  $p < 0,01$ ) und einer geringeren Dichte an regenerierenden Fasern (Korrelationskoeffizient nach Spearman = - 0,59 bei  $p < 0,01$ ) assoziiert war.

In der Patientengruppe hingegen ergaben sich keine Zusammenhänge.

Abbildung 9 stellt die negative Korrelation zwischen Alter und den Biopsie Ergebnissen des US bei gesunden Kontrollen graphisch dar. Abbildung 10 stellt die Beziehung zwischen Alter und Biopsie Ergebnissen des US bei PNP Patienten dar.

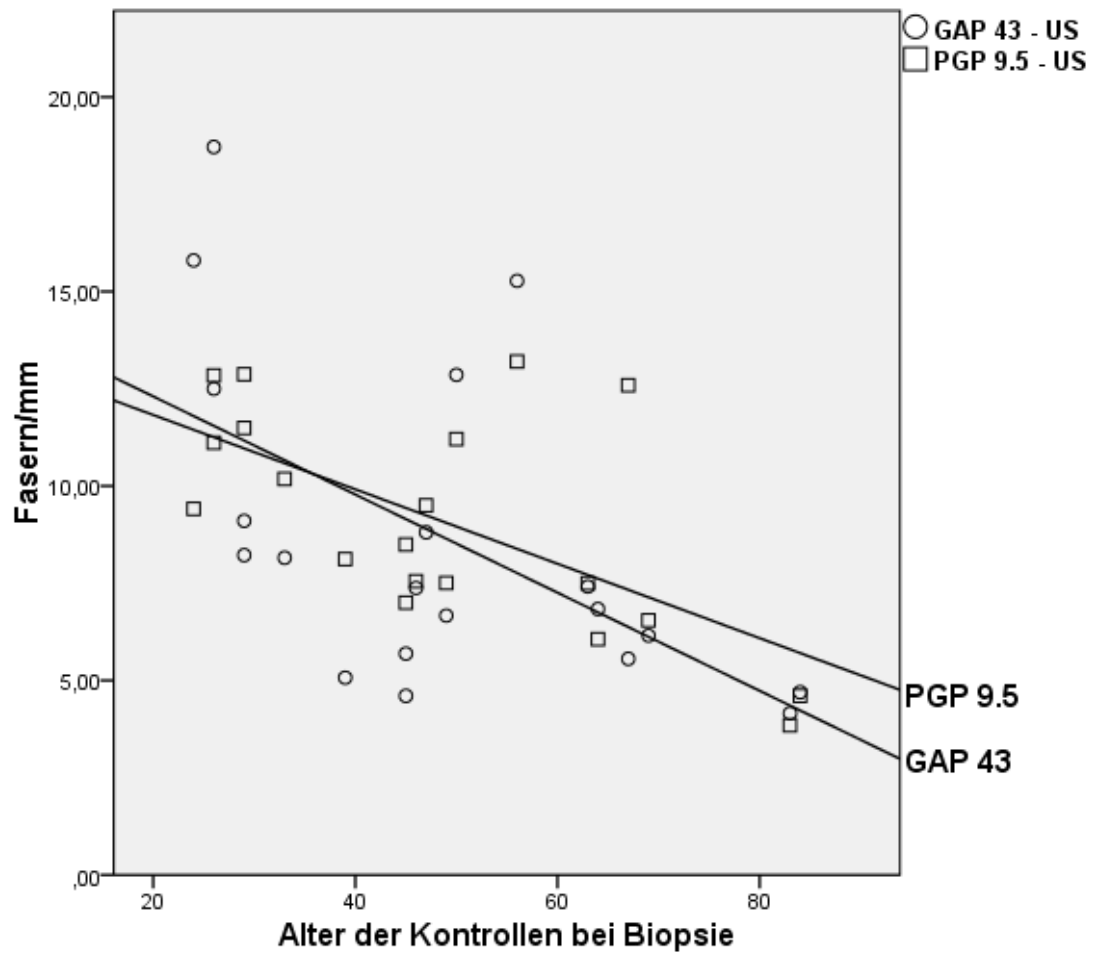


Abbildung 9; Zusammenhang zwischen dem Alter bei gesunden Kontrollpersonen und der IENFD und der Dichte regenerierenden Fasern am US (lineare Anpassungslinien)

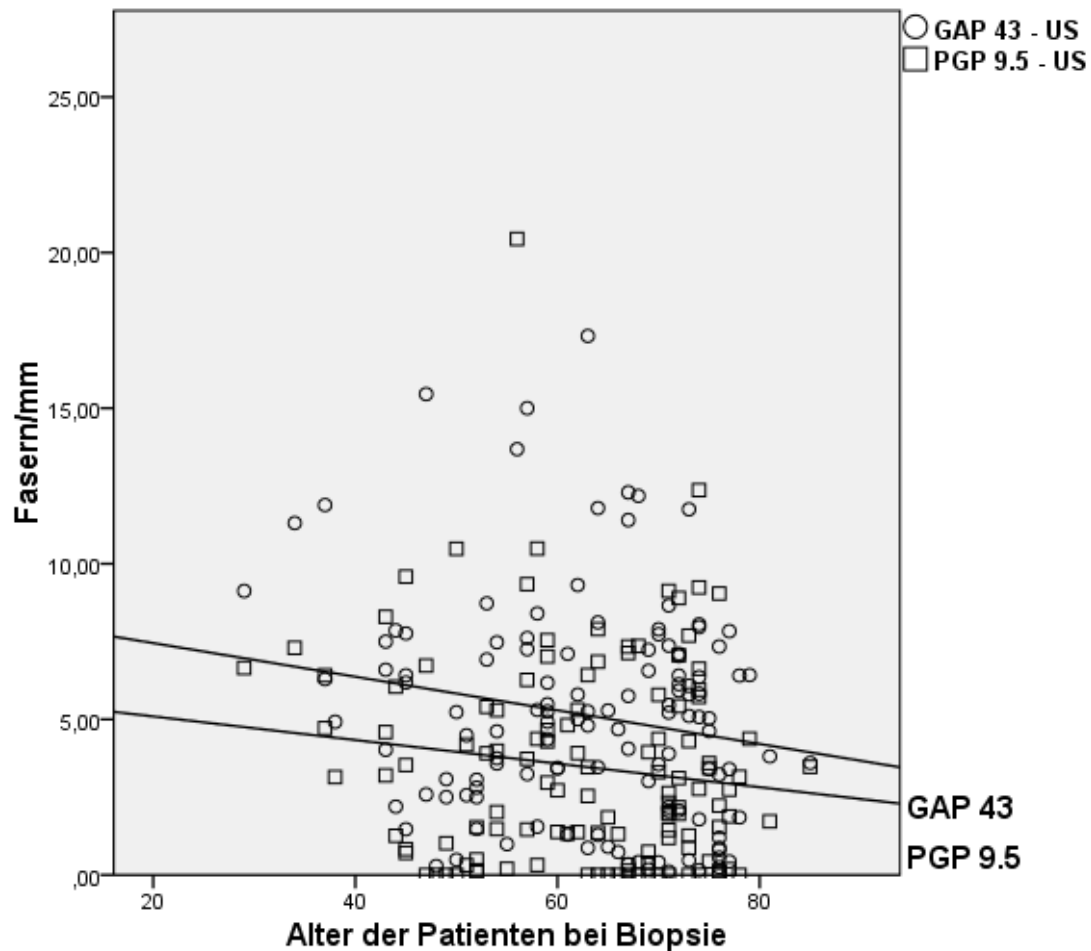


Abbildung 10; Zusammenhang zwischen dem Alter bei PNP Patienten und der IENFD und der Dichte regenerierenden Fasern am US (lineare Anpassungslinien)

## 2. Geschlecht

Als nächster möglicher Einflussfaktor auf die IENFD und die Dichte regenerierender Fasern wurde das Geschlecht betrachtet. Dazu wurde die Patienten- und die Kontrollgruppe getrennt voneinander untersucht. Es ließ sich bezüglich des Geschlechts jedoch weder in der Kontroll- noch in der Patientengruppe ein Unterschied in der IENFD und den regenerierenden Fasern erkennen.

Abbildung 11 stellt die Unterschiede der IENFD zwischen weiblichem und männlichem Geschlecht dar und Abbildung 12 zeigt die Unterschiede bei den regenerierenden Fasern.



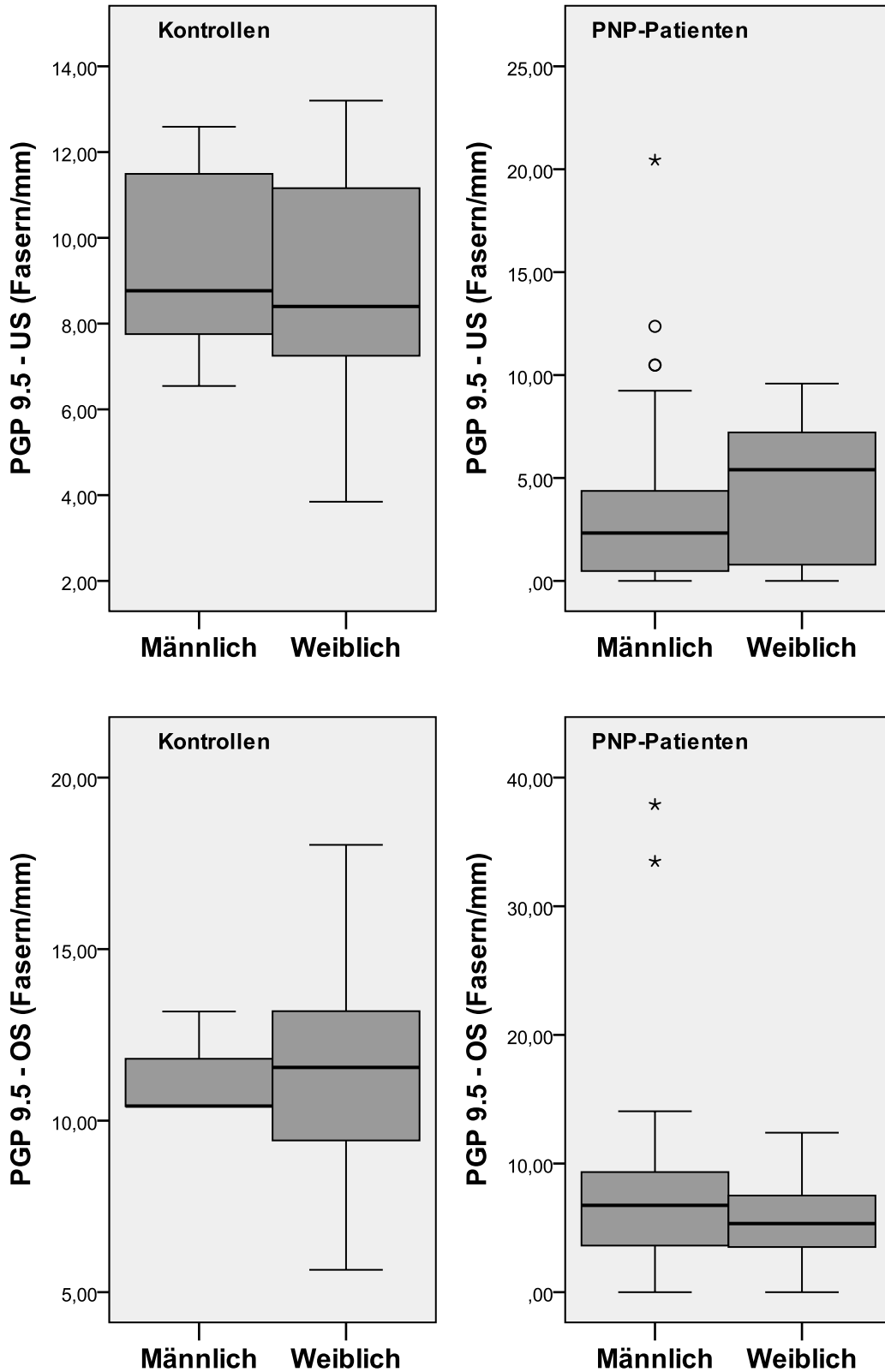


Abbildung 11; Vergleich der IENFD am US und OS zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht in der Patienten- und Kontrollgruppe; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer

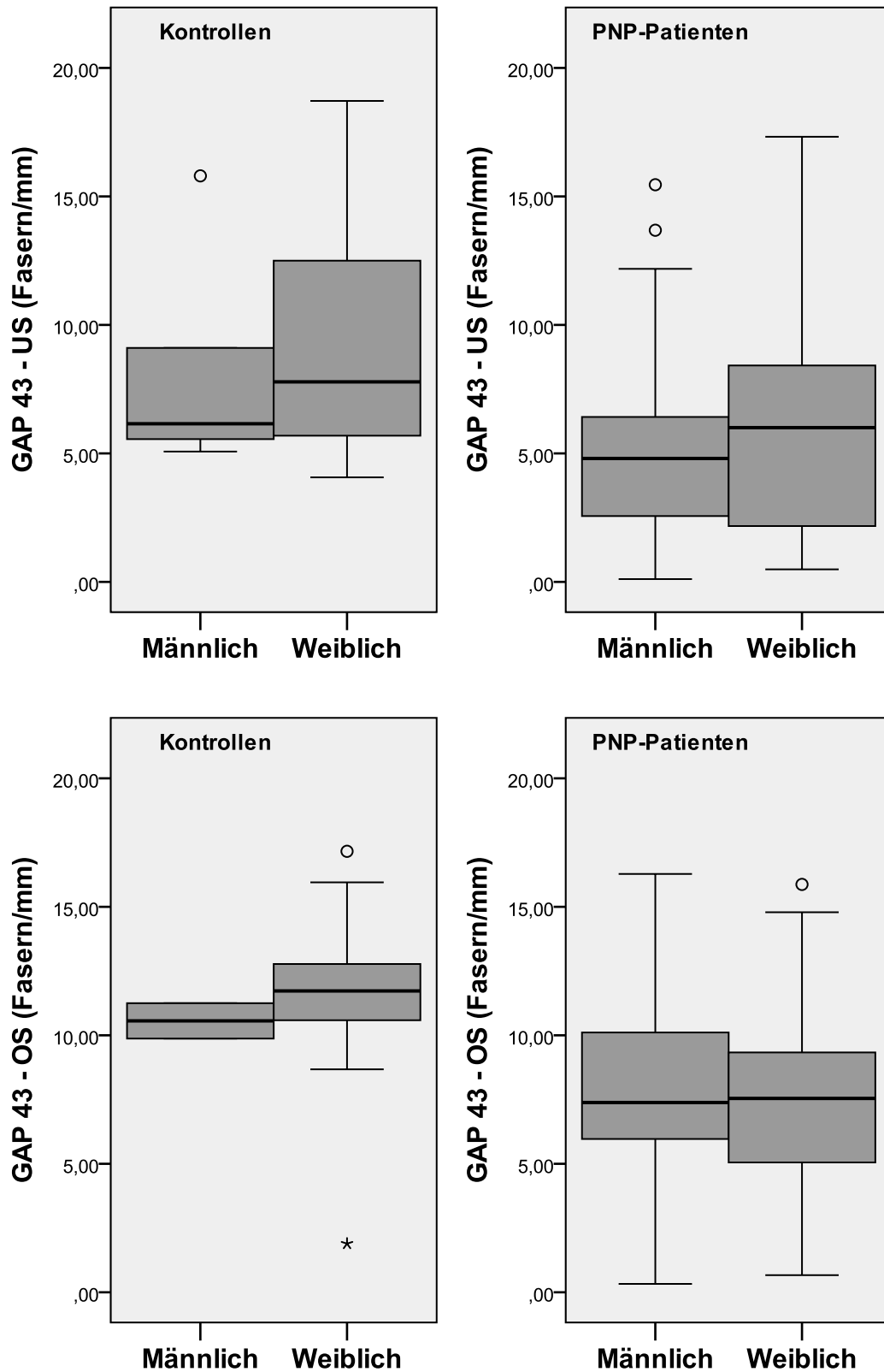


Abbildung 12; Vergleich der Dichte regenerierenden Fasern am US und OS zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht in der Patienten- und Kontrollgruppe; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer

### 3. Schmerz

Mittels des Mann-Whitney-U Tests unabhängiger Stichproben konnte kein Unterschied zwischen den Patienten mit schmerzhafter PNP und den schmerzfreien PNP Patienten ermittelt werden. Auch nach weiterer Unterteilung der an Schmerzen leidenden und schmerzlosen PNP Patienten in männliche und weibliche Patienten ließ sich kein Unterschied in der Nervenfaserdichte erkennen.

Abbildung 13 stellt die IENFD und Abbildung 14 die Dichte regenerierender Fasern der Patienten mit oder ohne Schmerz dar.

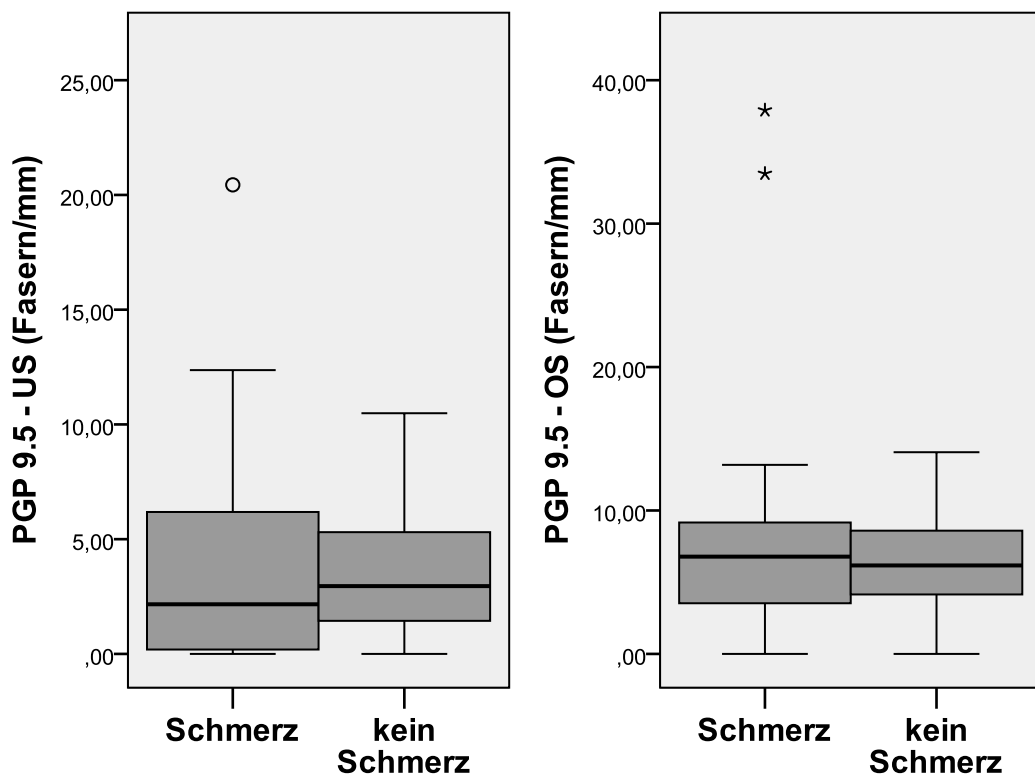


Abbildung 13; Vergleich der IENFD am US und OS zwischen PNP Patienten mit und ohne Schmerzen; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer

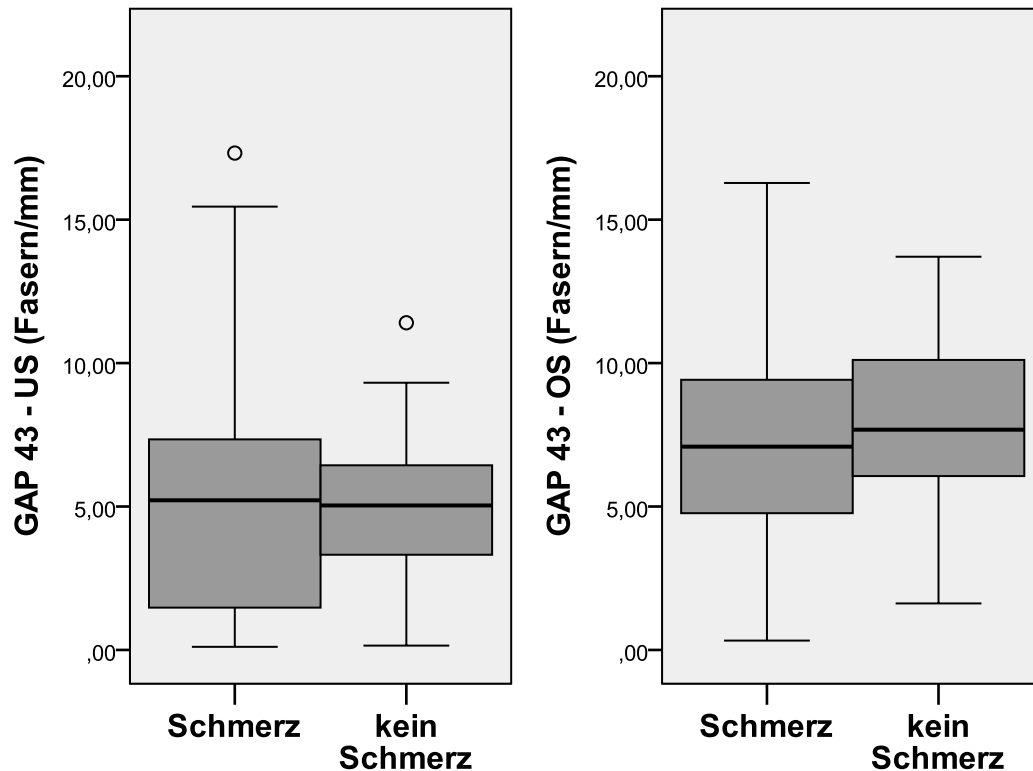


Abbildung 14; Vergleich der Dichte regenerierender Fasern am US und OS zwischen PNP Patienten mit und ohne Schmerzen; ° = Ausreißer

#### 4. Diagnosekategorien

Um einen Vergleich zwischen demyelinisierenden und axonalen PNP Formen zu erhalten, wurde repräsentativ für die demyelinisierende Erkrankung die INCAT-positive CIDP und stellvertretend für die axonale Form die vaskulitische PNP ausgewählt. Die Gruppe der demyelinisierenden PNP umfasste 20 Patienten und die der axonalen PNP 21 Patienten. Beim Vergleich der beiden Gruppen mittels des Mann-Whitney-U Tests zeigte sich, dass die demyelinisierende PNP am US eine höhere IENFD und eine größere Dichte an regenerierenden Nervenfasern aufwies. An den Biopsien des OS ließ sich kein Unterschied feststellen (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

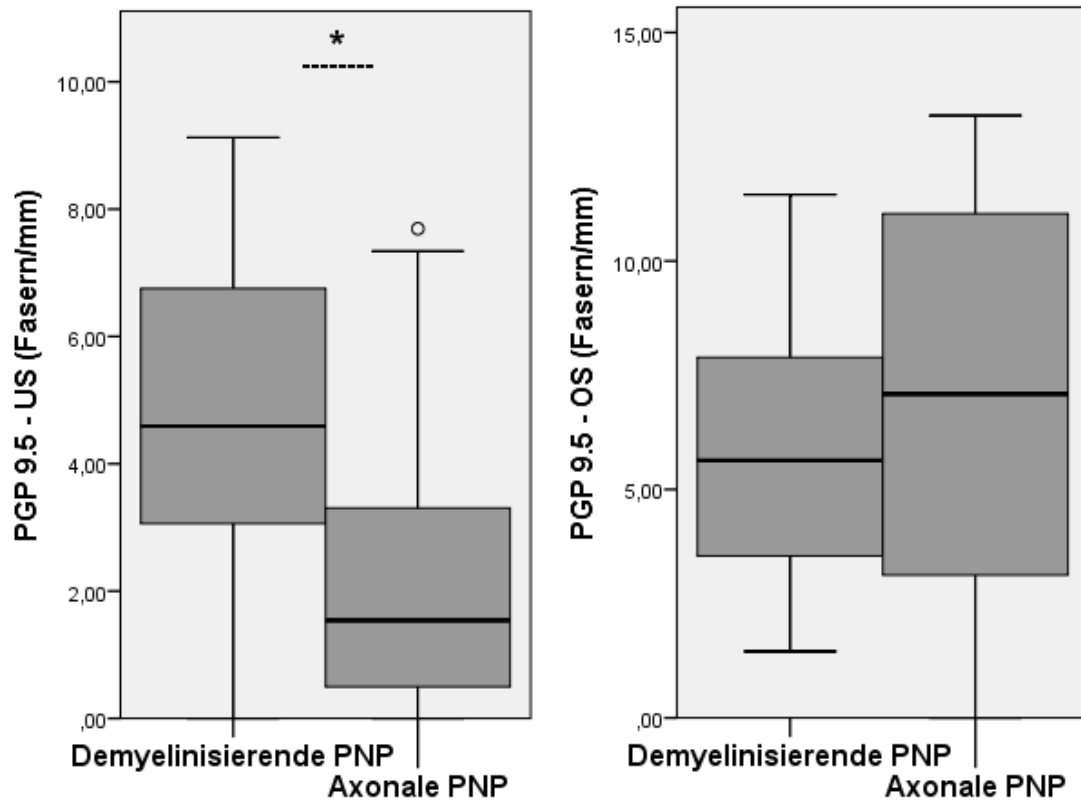


Abbildung 15; Vergleich der IENFD am US und OS zwischen den demyelinisierenden und den axonalen PNP Formen; ° = Ausreißer; \* = extreme Ausreißer; ..... = signifikanter Unterschied

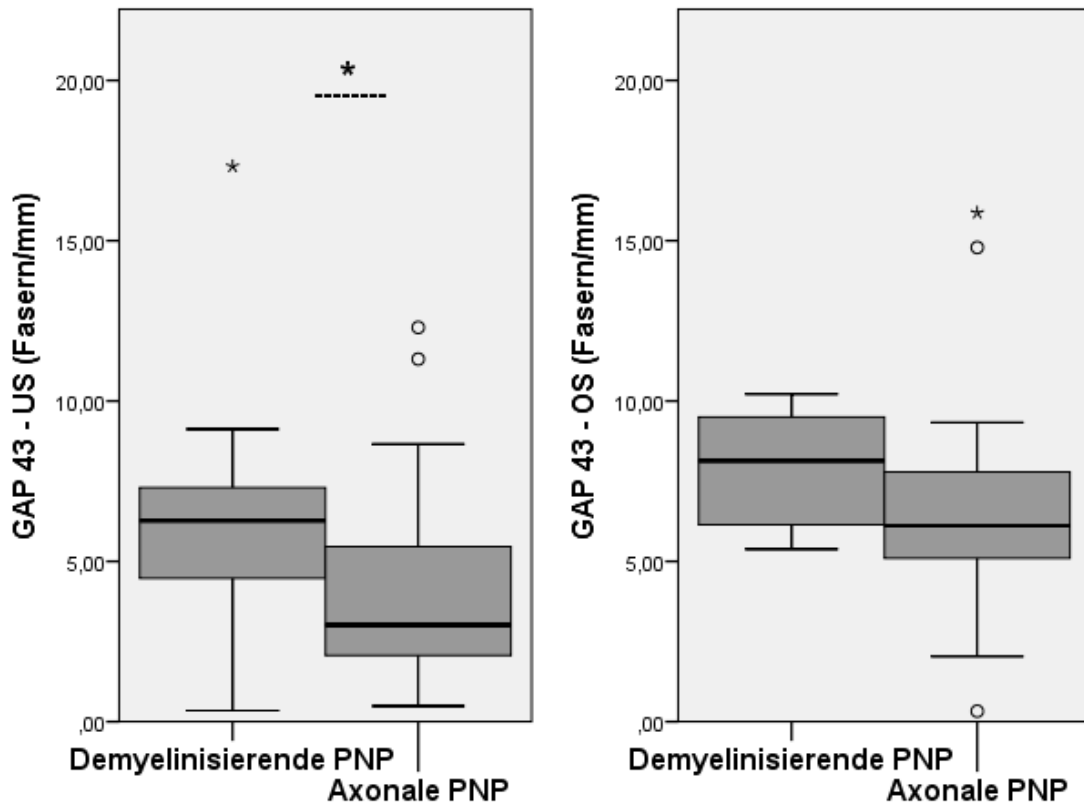


Abbildung 16; Vergleich der Dichte regenerierender Fasern am US und OS zwischen den demyelinisierenden und den axonalen PNP Formen; ° = Ausreißer; \* = extreme Ausreißer; ..... = signifikanter Unterschied

Desweiteren wurden entzündliche und nicht entzündliche PNP Formen miteinander verglichen. Als typische Vertreter der entzündlichen Krankheitsform wurden die CIDP und die vaskulitische PNP ausgewählt. Die nicht entzündliche PNP Gruppe setzte sich aus der SFN, der diabetischen PNP, der axonalen PNP und der hereditären PNP zusammen. Die Gruppe der entzündlichen PNP enthielt 66 Patienten (73%) und die Untergruppe „nicht entzündliche PNP“ enthielt 24 Patienten (27%). Beim Vergleich der beiden PNP Gruppen mittels des Mann-Whitney-U Tests ergaben sich jedoch keine Unterschiede bezüglich der IENFD und der Dichte regenerierender Fasern (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18).

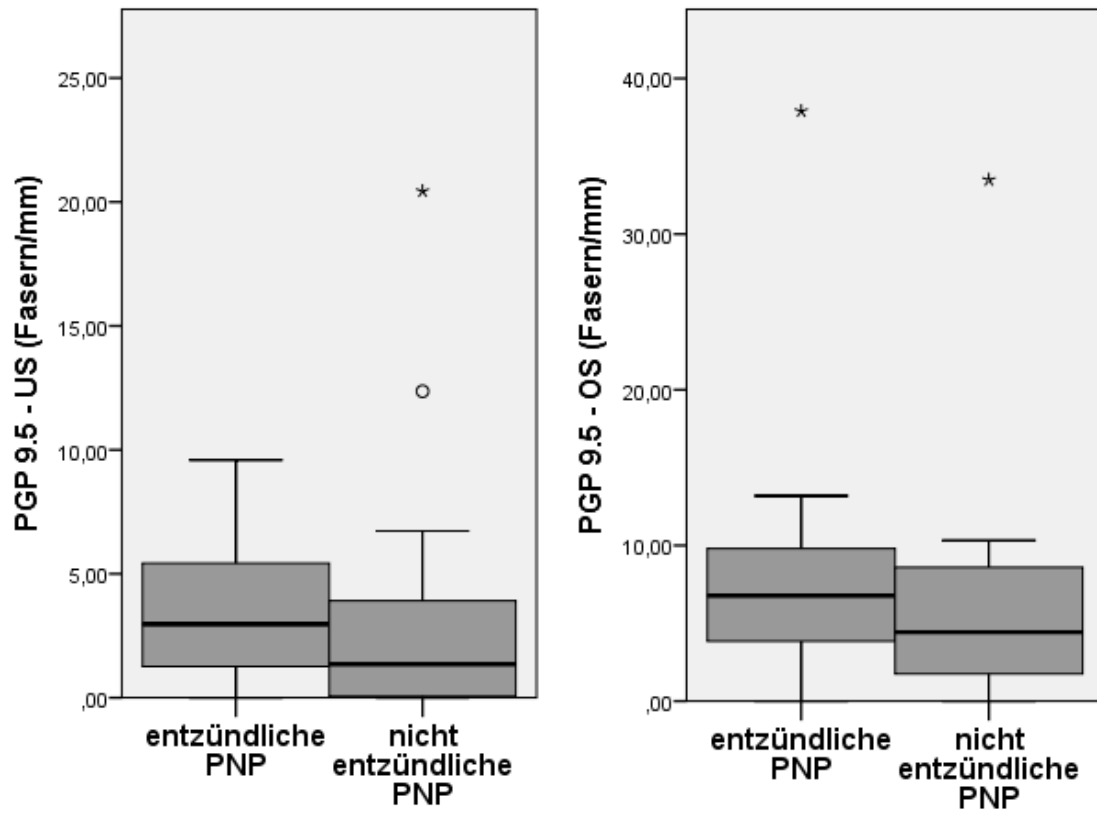


Abbildung 17; Vergleich der IENFD am US und OS zwischen den entzündlichen und den nicht entzündlichen PNP Formen; ° = Ausreißer; \* = extreme Ausreißer

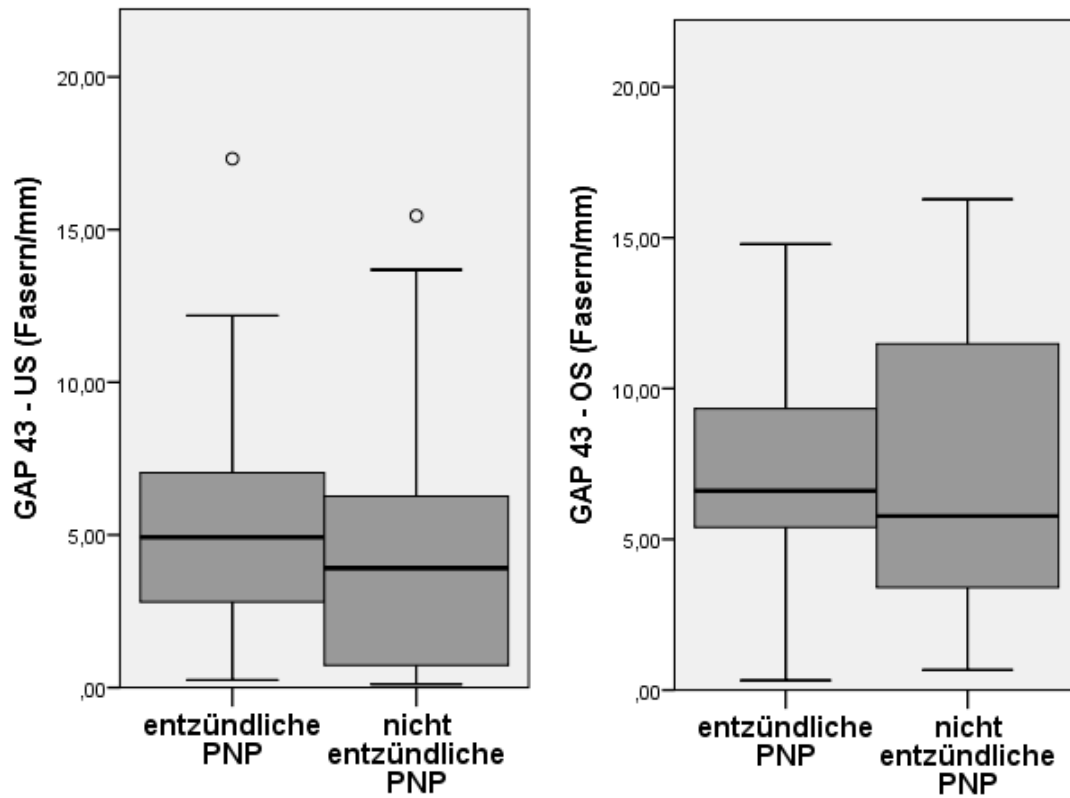


Abbildung 18; Vergleich der Dichte regenerierender Fasern am US und OS zwischen den entzündlichen und den nicht entzündlichen PNP Formen; ° = Ausreißer; \* = extreme Ausreißer

Zuletzt wurde die SFN gesondert betrachtet. Beim Vergleich der sieben Patienten mit SFN mit den restlichen PNP Patienten ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der IENFD oder der Dichte an regenerierenden Fasern (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20)



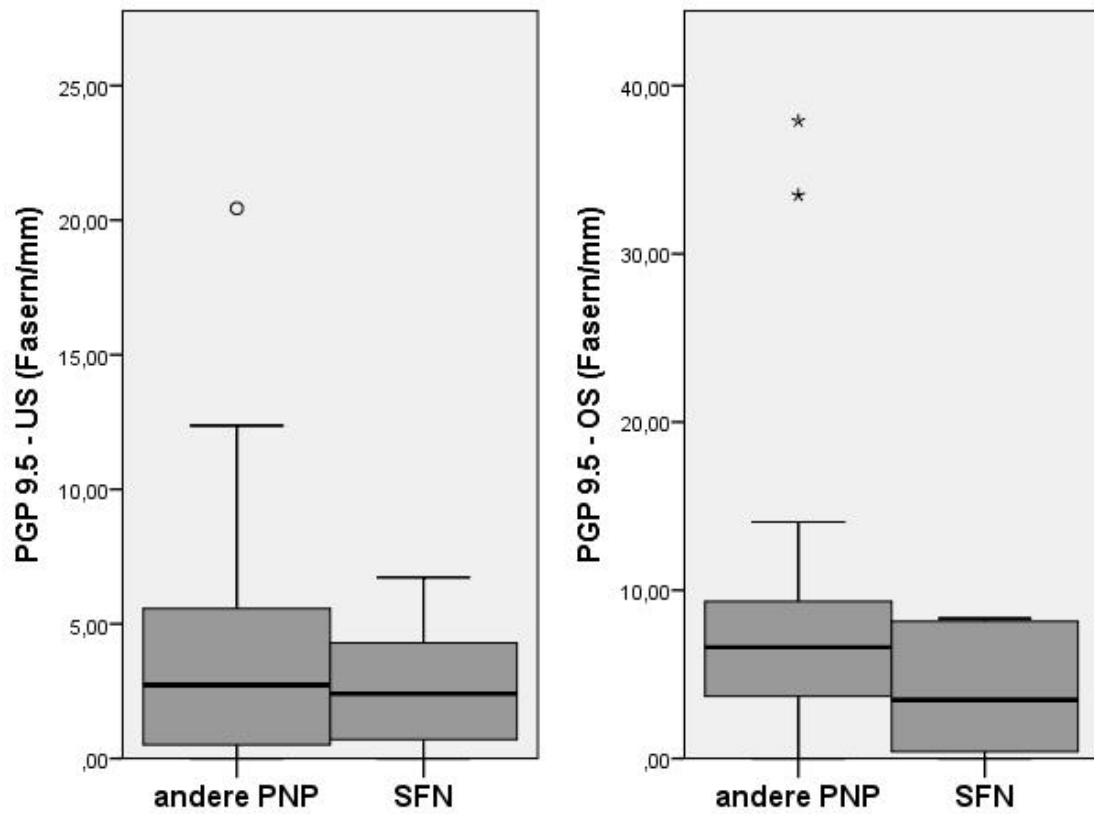


Abbildung 19; Vergleich der IENFD am US und OS zwischen SFN Patienten und anderen PNP Patienten; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer,

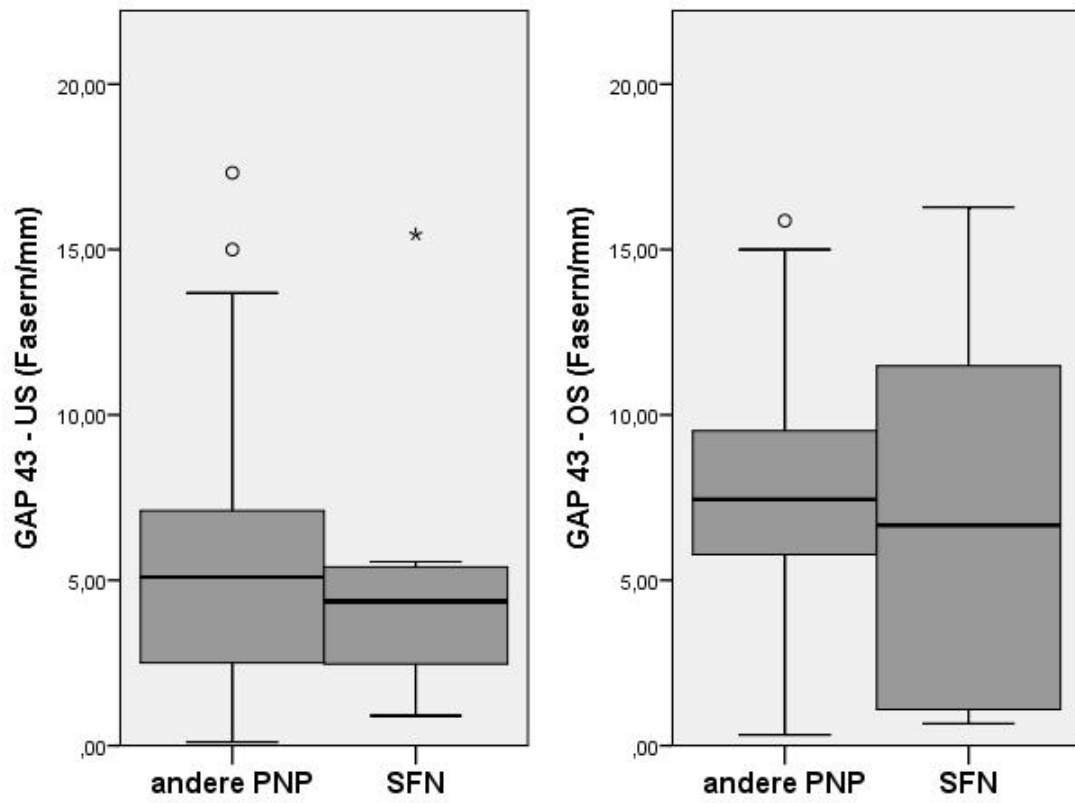


Abbildung 20; Vergleich der Dichte regenerierender Fasern am US und OS zwischen SFN Patienten und anderen PNP Patienten; ° = Ausreißer, \* = extremer Ausreißer

## 4 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Studie zusammengefasst, mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse erläutert, Vergleiche zu den Ergebnissen anderer Arbeiten gezogen und mögliche Schlussfolgerungen erörtert.

### 4.1 Normwerte der IENFD

Bezüglich der IENFD in der PGP 9.5 Färbung ergaben sich in unserer Studie folgende Mediane:

- US: 8,5 Fasern/mm (3,9-13,2)
- OS: 10,7 Fasern/mm (5,7-17,2)

Die für diese Färbung ermittelten Standardabweichungen, Mediane und Spannweiten können Tabelle 6 entnommen werden.

Da die Bestimmung der IENFD einen Bestandteil der PNP-Diagnostik, v.a. der SFN, darstellt (Sommer 2008), wurden in verschiedenen Studien bereits Referenzwerte von gesunden Kontrollpersonen für den distalen lateralen US ermittelt. Die in unterschiedlichen Studien ermittelten Werte sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 zusammengestellt.

Studie		IENFD (Fasern/mm) des US
Laborinterne Normwerte		9 ± 3
Bursova et al. 2012		11,2
Narayanaswamy et al. 2012		ca. 6
Umapathi et al. 2006	Männer	11,7 ± 4,1
	Frauen	15,0 ± 5,0
Gøransson et al. 2004		12,4 ± 4,6
Pan et al. 2001		12,97 ± 5,28
McArthur et al. 1998		13,8 ± 6,7

Tabelle 9 Übersicht über die in verschiedenen Studien ermittelten Referenzwerte für die IENFD am US

Studie		IENFD (Fasern/mm) des OS
Laborinterne Normwerte		12 ± 4
Umapathi et al. 2006	Männer	20,4 ± 6,9
	Frauen	22,8 ± 6,9
McArthur et al. 1998		21,1 ± 10,4

Tabelle 10; Übersicht über die in verschiedenen Studien ermittelten Referenzwerte für die IENFD am OS

Unsere Studie ergab im Vergleich zu den oben genannten Arbeiten tendenziell niedrigere Werte. Diesem Unterschied könnten verschiedene Faktoren zu Grunde liegen, z.B. eine unterschiedliche Zusammensetzung der Kontrollgruppen oder differierende Techniken im Auswertungsprozess.

Ein Vergleich der verschiedenen Kontrollgruppen bezüglich mehrerer Merkmale (u.a. Alter und Geschlecht) brachte keine Erklärung für die niedrigeren IENFD-Werte unserer Studie. Es zeigte sich zwar, dass an der vorliegenden Studie ein höherer Anteil an jüngeren Probanden teilgenommen hat, dies würde aber eher höhere IENFD-Werte erwarten lassen.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Unterschiede durch eine differierende subjektive Beurteilung der Zählregeln zu Stande kommen (siehe Kapitel 4.10.2). Es wurde gezeigt, dass bei der Auswertung der gleichen Präparate, verschiedene Untersucher nicht zu den gleichen Ergebnissen kommen (Gøransson et al. 2004; Wöpking et al. 2009).

## 4.2 Normwerte für die Dichte intraepidermaler regenerierender Nervenfasern

Die Quantifizierung der regenerierenden Nervenfasern in der Epidermis anhand von GAP 43 gefärbten Hautbiopsien von 27 gesunden Probanden ergab folgende mediane Dichterwerte:

- US: 7,4 Fasern/mm (4,1-18,7)
- OS: 11,6 Fasern/mm (1,9-17,2)

Die Standardabweichungen, Spannweiten und Medianwerte können Tabelle 7 entnommen werden.

Es gibt im Gegensatz zur IENFD (PGP 9.5 Färbung) für die Dichtewerte der regenerierenden Nervenfasern (GAP 43 Färbung) nur bedingt vergleichbare Referenzwerte. Eine quantitative Bestimmung GAP 43 positiver Nervenfasern in humanen Hautbiopsaten erfolgte bisher lediglich in zwei Arbeiten (Bursova et al. 2012; Narayanaswamy et al. 2012). Beim Vergleich der Daten ist jedoch zu beachten, dass die Verarbeitung der Biopsien nicht einheitlich erfolgte. So lag die Schnittdicke der Gewebeproben in der Arbeit von Bursova et al. bei 50  $\mu\text{m}$ , bei Narayanaswamy et al. bei 30  $\mu\text{m}$  und in der vorliegenden Studie bei 40  $\mu\text{m}$ . In der Publikation von Bursova et al. wurden die GAP 43 positiven Nervenfasern anhand von Präparaten ermittelt, die nicht einfach, sondern doppelt (GAP 43 und PGP 9.5) immunhistochemisch gefärbt waren. Der Wert für GAP 43 positive Fasern wurde dann als Anteil an den PGP 9.5 positiven Fasern angegeben. Dieser betrug in einer Gruppe von 17 gesunden Personen 96.8%. Bei einer medianen IENFD von 11,2 Fasern/mm in der PGP 9.5 Färbung lässt sich daraus auf eine GAP 43 positive Faserdichte von 10,8 Fasern/mm schließen, ein im Vergleich zu unserer Untersuchung um 3,4 Fasern/mm (46%) höherer Wert. Diese Differenz lässt sich zumindest teilweise auf eine größere Schnittdicke (+25%) der Gewebeproben zurückführen. Narayanaswamy et al. verwendeten neben einer dünneren Schnittdicke (-25%) auch eine andere immunhistochemische Methode. GAP 43 positive Fasern wurden dort mit Hilfe der Avidin-Biotin Peroxidase Methode schwarz angefärbt und am Lichtmikroskop analysiert. Daraus resultierte eine mediane Dichte intraepidermaler regenerierender Nervenfasern von ca. 0,9 Fasern/mm am US von 17 Kontrollpersonen. Dieser Wert ist deutlich niedriger als bei Bursova et al. und unserer Arbeit.

Weitere Studien haben ebenfalls mittels Antikörper gegen GAP 43 gefärbte Hautnerven untersucht, allerdings ohne Quantifizierung. In diesen Arbeiten wurde das Vorhandensein GAP 43 positiver Nervenfasern in der Dermis und Epidermis in

Hautproben von gesunden Kontrollen semiquantitativ angegeben (Fantini et al. 1992; Verzé et al. 2003).

#### **4.3 IENFD und Dichte an regenerierenden Fasern ist am OS höher als am US**

Kontrollpersonen und Patienten hatten in der Hautprobe vom OS sowohl in der PGP 9.5, als auch in der GAP 43 Färbung mehr intraepidermale Nervenfasern als in der jeweiligen Hautprobe vom US. Dies ist ein in der Literatur beschriebener (McArthur et al. 1998; Lauria et al. 1999) und erwarteter Befund, weil sowohl bei Gesunden, als auch bei erkrankten Personen, die Nervenfaserdichte mit steigender Entfernung zum Rückenmark und damit zum Ursprung der peripheren Nerven abnimmt (Lauria et al. 1999). Der Unterschied zeigte sich in der Patientengruppe deutlicher als in der Kontrollgruppe. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem beschriebenen längenabhängigen Verlust der Nervenfaserdichte bei PNP Patienten (McArthur et al. 1998), die dadurch entsteht, dass die Schädigung peripherer Nerven distal meist stärker ausgeprägt ist als proximal (Ropper et al. 2009, Kap. 46).

#### **4.4 PNP Patienten haben mehr GAP 43 positive als PGP 9.5 positive Nervenfasern**

Als nächstes wurde die Dichte regenerierender Fasern mit der IENFD verglichen. In der Kontrollgruppe ergab sich kein bedeutsamer Unterschied zwischen der IENFD und der Dichte intraepidermaler regenerierender Fasern. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bursova et al. und Verzé et al. und legt die Hypothese nahe, dass beide Proteine in gesunder Epidermis in gleichem Maße exprimiert werden (Verzé et al. 2003; Bursova et al. 2012). In drei Studien wurde hingegen eine reduzierte Expression von GAP 43 reaktiven Fasern gefunden (Fantini et al. 1992; Ebenezer et al. 2011; Narayanaswamy et al. 2012). In den genannten Arbeiten wurden jedoch unterschiedliche Methoden, z.B. Doppelfärbung oder anders gewählte Schnittdicke der Präparate etc. angewandt, weshalb die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar sind.

Die Analyse der Patientengruppe (n = 130) der vorliegenden Studie ergab deutliche Unterschiede zwischen der Dichte an regenerierenden Fasern und der IENFD. In der

GAP 43 Färbungen war die Nervenfaserdichte am OS und US im Vergleich zur Nervenfaserdichte in der PGP 9.5 Färbung erhöht (Quotient GAP 43/PGP 9.5 am OS = 1,3; am US = 1,6). Diese Beobachtung lässt sich mit der Rolle von GAP 43 als axonalen Regenerationsmarker vereinbaren. Die Expression von GAP 43 ist in geschädigten Nervenfasern im Vergleich zu PGP 9.5 erhöht. Da die PNP meist von distal nach proximal fortschreitet (Ropper et al. 2009, Kap. 46), sind die Nervenfasern distal stärker geschädigt als die Nervenfasern proximal, was wiederum distal eine stärkere axonale Regeneration erfordert. Diese Tatsache spiegelt sich in einer verstärkten GAP 43 Expression am US wieder. In einer anderen Studie berichten die Autoren dagegen, dass die Analyse der Hautbiopsien von 21 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 einen deutlich erniedrigten Anteil GAP 43 reaktiver Fasern an der IENFD des US ergab (Quotient GAP 43/PGP 9.5 am US = 0,71). Im Vergleich dazu wird der Anteil für gesunde Probanden in dieser Studie mit 0,97 angegeben (Bursova et al. 2012). Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt evtl. wiederum in der uneinheitlichen Methodik und unterschiedlichen Zusammensetzung der Patientengruppe.

#### **4.5 PNP Patienten haben absolut weniger regenerierende Nervenfasern als gesunde Probanden, deren Anteil an der IENFD ist aber erhöht**

Beim Vergleich der Werte von Kontroll- und Patientengruppe konnten wir deutliche Unterschiede feststellen. Sowohl die IENFD als auch die Dichte an regenerierenden Nervenfasern war bei Patienten am OS und US vermindert. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die PNP die peripheren Nerven schädigt und somit zu einer Reduktion der Nervenfaserdichte führt (McArthur et al. 1998; Lauria et al. 2010; Ebenezer et al. 2011). Bemerkenswerterweise stellten wir zudem fest, dass der Quotient aus regenerierenden Fasern durch IENFD bei PNP Patienten erhöht ist. Dies ist ein Hinweis auf die vermehrte Expression des Regenerationsmarkers GAP 43 in geschädigten Nervenfasern. Allerdings ist zu bedenken, dass eine Studie in diesem Punkt zu einem anderen Ergebnis kommt (Bursova et al. 2012)(s. Kapitel 4.4).

#### **4.6 Höheres Alter ist verbunden mit einer reduzierten IENFD und einer geringeren Dichte an regenerierenden Nervenfasern**

Als nächstes wurde der Einfluss des Alters auf die IENFD und die Anzahl an regenerierenden Fasern untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass in der Kontrollgruppe zwischen verschiedenen Alterskategorien ein Unterschied bezüglich der Nervenfaserdichte und der Anzahl an regenerierenden Fasern in den Präparaten des US besteht. Es zeigte sich in beiden Färbungen eine negative Korrelation der Faserdichte mit dem Alter, d.h. mit steigendem Alter nahm sowohl die IENFD als auch die Anzahl an regenerierenden Fasern am US ab. Am OS konnten keine altersbedingten Unterschiede festgestellt werden. Die bisherigen Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen IENFD und Alter stimmen mit dieser Beobachtung überein (Umapathi et al. 2006; Bakkers et al. 2009; Lauria et al. 2010; Ebenezer et al. 2011), wobei einige Studien nur zu einer eingeschränkten Aussage kamen (Erdem et al. 1997; McArthur et al. 1998; Lauria et al. 1999).

Der Einfluss des Alters auf die Anzahl an regenerierenden Fasern wurde bisher lediglich von Verzé et al. untersucht, der im Gegensatz zu dieser Studie keinen Zusammenhang zeigen konnte (Verzé et al. 2003).

Bei gesunden Personen scheint ein negativer Einfluss des Alters auf die Nervenfaserdichte im Sinne einer altersbedingten Degeneration zu bestehen, die sich v.a. an distalen Nerven manifestiert. Das Phänomen der altersbedingten Degeneration wurde bereits anhand anderer Nervenfunktionen demonstriert. So nimmt z.B. das Vibrations- und Temperaturempfinden distal mit steigendem Alter ab und der Achillessehnenreflex wird schwächer (Umapathi et al. 2006; Bakkers et al. 2009). Außerdem werden elektrophysiologische Untersuchungen bei älteren Patienten anders beurteilt als bei jüngeren Patienten (Umapathi et al. 2006). Unsere Arbeit liefert zusätzlich Hinweise, dass eine senile Degeneration auch die regenerierenden Fasern betrifft.

Innerhalb der Patientengruppe konnte kein Zusammenhang zwischen Alter und IENFD oder Dichte an regenerierenden Fasern gefunden werden. Der Grund dafür liegt



vermutlich darin, dass bei den PNP Patienten diese Parameter mehr von der individuellen Krankheitsaktivität und -dauer als vom Lebensalter bestimmt werden.

#### **4.7 Das Geschlecht hat keinen Einfluss auf die IENFD und die Dichte regenerierender Fasern**

In dieser Studie ließ sich kein Unterschied in der IENFD oder der Anzahl an regenerativen Fasern zwischen Frauen und Männern feststellen. Dies steht im Einklang mit zwei weiteren Untersuchungen (Verzé et al. 2003; Ebenezer et al. 2011). Beide Autoren fanden keinen Unterschied in der IENFD, wobei Ebenezer et al. zusätzlich die regenerierenden Fasern untersuchte und ebenfalls keinen Unterschied feststellte.

In drei anderen Arbeiten wurden hingegen Daten präsentiert, die auf eine höhere Nervenfaserdichte bei Frauen hinweisen (Umapathi et al. 2006; Bakkers et al. 2009; Lauria et al. 2010). Lauria et al. beobachtete bei Frauen bis zu einem Alter von 70 Jahren eine höhere Faserdichte als bei Männern gleichen Alters. Erst nach Erreichen des 70. Lebensjahres war zwischen den beiden Geschlechtern kein Unterschied der IENFD mehr feststellbar. Diese Ergebnisse wurden mit den unterschiedlichen Spiegeln gonadaler Hormone der beiden Geschlechter begründet. Insbesondere der höhere Progesteronspiegel bei Frauen wurde als entscheidender Faktor vermutet, da Progesteron die Bildung myelinisierter Nervenfasern stimuliert (Lauria et al. 2010). Auch Umapathi et al. beschreibt distal eine höherer Faserdichte bei Frauen, allerdings führt er dieses Ergebnis auf andere Einflussfaktoren wie Körpergröße und Gewicht zurück (Umapathi et al. 2006).

#### **4.8 Das Auftreten von Schmerzen bei einer PNP steht nicht im Zusammenhang mit einer veränderten IENFD oder Dichte an regenerierenden Fasern**

Beim Vergleich zwischen Patienten mit schmerzloser und schmerzhafter PNP zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der IENFD oder der Dichte regenerierender Fasern. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Arbeit von Sommer et al., in der ebenfalls gezeigt wurde, dass die IENFD nicht mit der Schmerzhaftigkeit einer PNP in Zusammenhang steht (Sommer 2008). In einer anderen Studie wurde eine inverse

Korrelation zwischen Schmerzstärke und IENFD bei Patienten mit einer diabetischen PNP beobachtet (Sorensen et al. 2006). Aufgrund der dargestellten Ergebnisse lässt sich also noch keine eindeutige Aussage zum Einfluss der IENFD auf die Schmerzhaftigkeit einer PNP machen. Zur Rolle von regenerierenden Fasern bei der Schmerzentstehung im Rahmen der PNP ist bisher wenig bekannt, jedoch zeigen unsere Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen der Expression von GAP 43 und Schmerz.

#### **4.9 Die demyelinisierende PNP zeigt am US eine höhere IENFD und mehr regenerierende Fasern**

Der Vergleich zwischen der demyelinisierenden und der axonalen PNP ergab, dass bei Patienten mit demyelinisierender PNP eine höhere IENFD und mehr regenerierende Nervenfasern in der Epidermis des US vorliegen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Epidermis hauptsächlich nicht myelinisierte Nervenfasern enthält (Reilly et al. 1997), welche bei einer demyelinisierenden Erkrankung nicht betroffen sind.

Des Weiteren erfolgte ein Vergleich zwischen entzündlichen und nicht entzündlichen PNP Formen. Hinsichtlich der IENFD und der Dichte an regenerierenden Fasern zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen diesen beiden Kategorien. Beide Erkrankungsformen scheinen also die intraepidermalen Nervenfasern und die regenerierenden Nervenfasern der Epidermis in gleichem Maße zu betreffen. Ein solcher Vergleich ist bisher in keiner anderen Veröffentlichung erwähnt.

Zuletzt wurde die SFN gesondert betrachtet, jedoch fanden sich auch hier keine Unterschiede zu den restlichen PNP Formen.

#### **4.10 Grenzen der Studie**

Im Folgenden werden mögliche Limitierungen der Studie diskutiert, die die Zusammensetzung des Kontroll- und Patientenkollektivs sowie die Interrater Reliabilität der Untersucher betreffen.

#### **4.10.1 Patienten- und Kontrollkollektiv**

Bei der Beurteilung unserer Aussagen sollte berücksichtigt werden, dass die 130 Patienten und 27 Kontrollen in Bezug auf Kategorien wie z.B. Alter und Geschlecht ungleich verteilt waren.

Die Verteilung des Patienten- und Kontrollkollektivs auf die verschiedenen Altersklassen wird in Tabelle 8 dargestellt.

In der Patientengruppe enthielt die Alterskategorie von 71 - 75 Jahre die meisten Personen, gefolgt von der Altersklasse 66 - 70 Jahre. Insgesamt waren nur 0,8% der Patienten jünger als 30 Jahre und nur 16,2% der Patienten waren jünger als 51 Jahre. Mehr als dreiviertel der Patienten (83,8%) war älter als 50 Jahre.

In der Kontrollgruppe dagegen enthielt die Alterskategorie der unter 30jährigen die meisten Studienteilnehmer, gefolgt von der Altersklasse der 46 bis 50jährigen. 60% der Kontrollen waren unter 51 Jahre alt und nur 24% der Kontrollen waren über 61 Jahre alt. In der Alterskategorie von 71 bis 80 Jahre befand sich keine gesunde Kontrollperson.

Die Häufung der Patienten in den höheren Altersklassen kann durch ein häufigeres Auftreten der PNP bei älteren Patienten erklärt werden. Die Gesamtprävalenz der peripheren Neuropathien steigt bei älteren Personen auf bis zu 8% an (Hughes 2002). Aus diesen Zahlen wird ersichtlich, warum nur wenige Patienten in den Altersklassen unter 50 Jahren enthalten sind.

Bei den Kontrollpersonen dagegen handelt es sich um gesunde Klinikmitarbeiter bzw. Freunde und Verwandte von Klinikmitarbeitern, die bestimmte Ein- und Ausschlusskriterien erfüllen mussten (siehe Kap. 2.2). Mit steigendem Alter sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Person als Kontrollperson geeignet ist, da mit steigendem Alter die Prävalenz von Erkrankungen zunimmt, welche ein Ausschlusskriterium der Studie darstellen, wie z.B. Diabetes mellitus.

Die Geschlechterverteilung präsentierte sich wie folgt: In der Patientengruppe befanden sich 98 männliche und 32 weibliche Patienten, wohingegen die

Kontrollgruppe aus 21 Frauen und sechs Männer bestand. Da der Einfluss des Geschlechts auf die IENFD noch nicht hinreichend geklärt ist, sollte die ungleiche Geschlechterverteilung der Gruppen bei allen Aussagen berücksichtigt werden.

#### **4.10.2 Interraterreliabilität der Untersucher**

Beim Vergleich verschiedener Studien sollte die Interraterreliabilität berücksichtigt werden, welche den Grad der Übereinstimmung zwischen verschiedenen Untersuchern bei der Auswertung von Daten beschreibt. Zur Ermittlung der Interraterreliabilität wird die gleiche Untersuchung von verschiedenen Personen durchgeführt und anschließend die Ergebnisse der Untersucher auf Übereinstimmung überprüft (Wöpking et al. 2009).

Zwei Untersuchungen über die Interraterreliabilität bei der Bestimmung der IENFD in Hautbiopsien zeigen, dass die Auswertung gleicher Präparate durch verschiedene Untersucher selbst nach den gleichen Auswertungsregeln unterschiedliche Werte ergeben können (Gøransson et al. 2004; Wöpking et al. 2009). Die Differenz zweier Untersucher lag in der Studie von Gøransson et al. im Mittel bei  $0,4 \pm 1,5$  Fasern/mm. Der Grund dafür ist, dass bei der Auszählung von Nervenfasern v.a. die Aufzweigung der Nervenfasern unterschiedlich beurteilt wird. Ein Untersucher erkennt die Aufzweigung einer Nervenfaser bereits vor ihrem Durchtritt durch die Basalmembran, wohingegen ein anderer Untersucher die gleiche Nerven aufzweigung erst nach dem Durchtritt durch die Basalmembran beobachtet. In diesem Beispiel würde nach den Zählregeln der EFNS (siehe Abbildung 1) vom ersten Untersucher nur eine Nervenfaser gezählt werden, wohingegen der andere Untersucher zwei Nervenfasern zählen würde.

## **5 Zusammenfassung**

Polyneuropathien (PNP) sind mit einer Prävalenz von bis zu 7% in der Gesamtbevölkerung eine häufige Diagnose. Bei der Ursachenabklärung der PNP hat sich in den letzten Jahren die immunhistochemische Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte aus Hautstanzbiopsien mittels einer axonalen PGP 9.5 Färbung etabliert. Ein zusätzlicher Marker ist GAP 43 - ein axonales Protein, das von regenerierenden Nervenfasern exprimiert wird. In der vorliegenden Studie wurde die Dichte von PGP 9.5 und GAP 43 positiven Nervenfasern anhand immunhistochemischer Färbungen an Hautstanzbiopsien vom lateralen Unter- und Oberschenkel von Patienten mit PNP unterschiedlicher Genese und von gesunden Kontrollen quantifiziert. Wir konnten zeigen, dass PNP Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen deutlich weniger GAP 43 positive Nervenfasern in ihren Hautbiopsien aufweisen. Obwohl sich bei PNP Patienten absolut gesehen weniger GAP 43 positive Nervenfasern fanden, war der Anteil an GAP 43 positiven Nervenfasern im Vergleich zur Kontrollgruppe höher, was mit einer gesteigerten regenerativen Aktivität in geschädigten Nervenfasern zusammenhängen kann. In der Patienten- und Kontrollgruppe fanden sich mehr PGP 9.5 und GAP 43 positive Nervenfasern am Ober- als am Unterschenkel, was durch die grundsätzlich dichtere Innervation proximaler Hautareale bedingt ist und bei PNP Patienten durch den im Krankheitsverlauf typischerweise längenabhängigen Verlust der peripheren kutanen Innervation noch verstärkt wird. Die Analyse potentieller Einflussfaktoren ergab beim Unterschenkel für beide Färbungen eine negative Korrelation zwischen Alter und Nervenfaserdichte. Das Geschlecht und das Vorhandensein von Schmerzen hatten keinen Einfluss auf die Hautinnervation. Die Arbeit zeigt anhand des bisher größten Patienten- und Kontrollkollektivs, dass regenerierende intraepidermale Nervenfasern mittels einer Immunhistochemie für GAP 43 zuverlässig quantifizierbar sind. Bei künftigen longitudinalen Studien kann nun ein möglicher Zusammenhang zwischen der Dichte GAP 43 positiver Nervenfasern und der Prognose bzw. dem Ansprechen auf Therapien untersucht werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
dmL	Distal motorische Latenz
GAP	Growth associated protein
IENFD	Intraepidermale Nervenfaserdichte
kDA	Kilo Dalton - Maßeinheit
NLG	Nervenleitungsgeschwindigkeit
NRS	Numerische Rating Skala
PGP	Protein gene product
PNP	Polyneuropathie
POEMS	Syndrom mit <u>P</u> olyneuropathie, <u>O</u> rganomegalie, <u>E</u> ndokrinopathien, <u>M</u> onoklonaler Gammopathie und Haut ( <u>S</u> kin) Veränderungen
QST	Quantitativ sensorische Testung
SD	Standardabweichung
SFN	Small Fiber Neuropathie

Tabelle 11; Abkürzungen

## 6.2 Tabelle

INCAT (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment) Group – diagnostische Kriterien:

<b>Klinisch</b>	
Symptome	Motorische und sensorische Dysfunktionen, die mehr als eine Gliedmaße einschließt; signifikante in der Arm oder Bein Funktion
Symptombdauer	Mindestens zwei Monate andauernde stabile oder schlimmer werdende Symptome
Reflexe	Hypo- oder Areflexie
<b>Elektrophysiologisch</b>	
Die Definitionen für den Leitungsblock, die dmL, die NLG und die F- Wellen Latenz können (Hughes et al. 2001) entnommen werden	
Entweder	Partieller Leitungsblock oder abnormale zeitliche Dispersion in mind. 2 Nerven; zusätzlich signifikant reduzierte NLG oder verlängerte dmL oder fehlende bzw. verlängerte minimale F-Wellen Latenz in mind. einem Nerv
Oder	In Abwesenheit eines Blockes oder einer Dispersion ist eine signifikant reduzierte NLG oder eine signifikant verlängerte dmL oder eine fehlende oder verlängerte minimale F-Wellen Latenz in mind. drei Nerven nötig

Oder	In Anwesenheit signifikanter neurophysiologischer Abnormalitäten in nur 2 Nerven, muss zusätzlich ein eindeutiger histologischer Beweis einer Demyelinisierung oder demyelinisierter Nervenfasern in einer Nervenbiopsie vorhanden sein
<b>Zu messende Nerven</b>	
N. medianus	Handgelenk, Ellbogen, Axilla
N. ulnaris	Handgelenk, Ellbogen, Axilla, Erb'scher Punkt
N. peroneus	Knöchel, unterhalb und oberhalb des Fibulakopfes
N. tibialis	Knöchel, Fossa poplitea

Tabelle 12; INCAT Group diagnostische Kriterien (Hughes et al. 2001; Sander et al. 2003)



## **7 Literaturverzeichnis**

1 **Baets, J. and V. Timmerman** (2011). "Inherited peripheral neuropathies: a myriad of genes and complex phenotypes." *Brain* 134(Pt 6): 1587-1590.

2 **Bakkers, M., I. S. J. Merkies, G. Lauria, G. Devigili, P. Penza, R. Lombardi, M. C. E. Hermans, S. I. van Nes, M. Baets and C. G. Faber** (2009). "Intraepidermal nerve fiber density and its application in sarcoidosis." *Neurology* 73(14): 1142-1148.

3 **Benowitz, L. I. and A. Routtenberg** (1997). "GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity." *Trends Neurosci.* 20(2): 84-91.

4 **Bursova, S., P. Dubovy, E. Vlckova-Moravcova, M. Nemecek, I. Klusakova, J. Belobradkova and J. Bednarik** (2012). "Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus." *J. Neurol. Sci.* 315(1-2): 60-63.

5 **Callaghan, B., R. McCammon, K. Kerber, X. Xu, K. M. Langa and E. Feldman** (2012). "Tests and expenditures in the initial evaluation of peripheral neuropathy." *Arch. Intern. Med.* 172(2): 127-132.

6 **Campbell, L. K., J. R. Thomas, L. W. Lamps, B. R. Smoller and A. L. Folpe** (2003). "Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is not a specific marker of neural and nerve sheath tumors: an immunohistochemical study of 95 mesenchymal neoplasms." *Mod. Pathol.* 16(10): 963-969.

7 **Chopra, K. and V. Tiwari** (2012). "Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities." *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73(3): 348-362.

8 **Christie, K. J. and D. Zochodne** (2013). "Peripheral axon regrowth: New molecular approaches." *Neuroscience.*

9 **Collins, M. P., P. J. Dyck, G. S. Gronseth, L. Guillevin, R. D. Hadden, D. Heuss, J. M. Leger, N. C. Notermans, J. D. Pollard, G. Said, G. Sobue, A. F. Vrancken, J. T. Kissel and S. Peripheral Nerve** (2010). "Peripheral Nerve Society Guideline on the classification, diagnosis, investigation, and immunosuppressive therapy of non-systemic vasculitic neuropathy: executive summary." *J. Peripher. Nerv. Syst.* 15(3): 176-184.

10 **Collins, M. P. and I. Periquet-Collins** (2009). "Nonsystemic vasculitic neuropathy: update on diagnosis, classification, pathogenesis, and treatment." *Front. Neurol. Neurosci.* 26: 26-66.

11 **D'Amour, M. L. and R. F. Butterworth** (1994). "Pathogenesis of alcoholic peripheral neuropathy: direct effect of ethanol or nutritional deficit?" *Metab. Brain Dis.* 9(2): 133-142.

12 **Dalakas, M. C.** (2011). "Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP." *Nature reviews. Neurology* 7(9): 507-517.

13 **Doran, J. F., P. Jackson, P. A. Kynoch and R. J. Thompson** (1983). "Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis." *J. Neurochem.* 40(6): 1542-1547.

14 **Dyck, P. J. and P. K. Thomas** (2005). *Peripheral neuropathy*. Philadelphia, Saunders.

15 **Ebenezer, G. J., R. O'Donnell, P. Hauer, N. P. Cimino, J. C. McArthur and M. Polydefkis** (2011). "Impaired neurovascular repair in subjects with diabetes following experimental intracutaneous axotomy." *Brain* 134(Pt 6): 1853-1863.

16 **Erdem, S., M. I. Periquet, S. M. Nash, D. K.A., M. P. Collins, M. L. Freimer, J. T. Kissel and J. R. Mendell** (1997). "Assessment of epidermal nerve fibers to determine the pathobiology of aging." *Ann. Neurol.*(42): 416.

17 **Fantini, F. and O. Johansson** (1992). "Expression of growth-associated protein 43 and nerve growth factor receptor in human skin: a comparative immunohistochemical investigation." *J. Invest. Dermatol.* 99(6): 734-742.

18 **Gamby, C., M. C. Waage, R. G. Allen and L. Baizer** (1996). "Analysis of the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function." *J. Biol. Chem.* 271(43): 26698-26705.

19 **Gøransson, L. G., S. I. Mellgren, S. Lindal and R. Omdal** (2004). "The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density." *Neurology* 62(5): 774-777.

20 **Heuss, D., M. Auer-Grumbach, W. Haupt, W. Löscher, B. Neundörfer, B. Rautenstrauss, S. Renaud and C. Sommer** (2008). *Diagnostik bei Polyneuropathien*.

Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. H. Diener, N. Putzki and P. Berlit. Stuttgart, Thieme: 486–497.

21 **Holland, N. R., T. O. Crawford, P. Hauer, D. R. Cornblath, J. W. Griffin and J. C. McArthur** (1998). "Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases." *Ann. Neurol.* 44(1): 47-59.

22 **Hughes, R., S. Bensa, H. Willison, P. van den Bergh, G. Comi, I. Illa, E. Nobile-Orazio, P. van Doorn, M. Dalakas, M. Bojar and A. Swan** (2001). "Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." *Ann. Neurol.* 50(2): 195-201.

23 **Hughes, R. A. C.** (2002). "Peripheral neuropathy." *BMJ (Clinical research ed.)* 324(7335): 466-469.

24 **Johnsen, S. H., S. Loseth and S. I. Mellgren** (1997). "[Small fiber neuropathy]." *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 117(10): 1476-1479.

25 **Kernich, C. A.** (2001). "Patient and family fact sheet. Peripheral neuropathy." *The neurologist* 7(5): 315-316.

26 **Köller, H., B. C. Kieseier, S. Jander and H.-P. Hartung** (2005). "Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." *N. Engl. J. Med.* 352(13): 1343-1356.

27 **Koskinen, M., A. Hietaharju, M. Kyläniemi, J. Peltola, I. Rantala, B. Udd and H. Haapasalo** (2005). "A quantitative method for the assessment of intraepidermal nerve fibers in small-fiber neuropathy." *J. Neurol.* 252(7): 789-794.

28 **Lacomis, D.** (2002). "Small-fiber neuropathy." *Muscle Nerve* 26(2): 173-188.

29 **Lauria, G., M. Bakkers, C. Schmitz, R. Lombardi, P. Penza, G. Devigili, A. G. Smith, S.-T. Hsieh, S. I. Mellgren, T. Umapathi, D. Ziegler, C. G. Faber and I. S. J. Merkies** (2010). "Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study." *J. Peripher. Nerv. Syst.* 15(3): 202-207.

30 **Lauria, G., D. R. Cornblath, O. Johansson, J. C. McArthur, S. I. Mellgren, M. Nolano, N. Rosenberg and C. Sommer** (2005). "EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy." *Eur. J. Neurol.* 12(10): 747-758.

31 **Lauria, G., N. Holland, P. Hauer, D. R. Cornblath, J. W. Griffin and J. C. McArthur** (1999). "Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy." *J. Neurol. Sci.* 164(2): 172-178.

32 **Lauria, G., A. Majorana, M. Borgna, R. Lombardi, P. Penza, A. Padovani and P. Sapelli** (2005). "Trigeminal small-fiber sensory neuropathy causes burning mouth syndrome." *Pain* 115(3): 332-337.

33 **McArthur, J. C., E. A. Stocks, P. Hauer, D. R. Cornblath and J. W. Griffin** (1998). "Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency." *Arch. Neurol.* 55(12): 1513-1520.

34 **Meiri, K. F., K. H. Pfenninger and M. B. Willard** (1986). "Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83(10): 3537-3541.

35 **Misra, U. K., J. Kalita and P. P. Nair** (2008). "Epidemiology of peripheral neuropathy." *Ann. Indian Acad. Neurol.* 11(2): 89-97.

36 **Mold, J. W., S. K. Vesely, B. A. Keyl, J. B. Schenk and M. Roberts** (2004). "The prevalence, predictors, and consequences of peripheral sensory neuropathy in older patients." *J. Am. Board Fam. Pract.* 17(5): 309-318.

37 **Narayanaswamy, H., P. Facer, V. P. Misra, M. Timmers, G. Byttebier, T. Meert and P. Anand** (2012). "A longitudinal study of sensory biomarkers of progression in patients with diabetic peripheral neuropathy using skin biopsies." *J. Clin. Neurosci.* 19(11): 1490-1496.

38 **Neundörfer, B., D. F. Heuß and D. Claus** (2007). *Polyneuropathien: 65 Tabellen.* Stuttgart, Thieme.

39 **Oestreicher, A. B., P. N. De Graan, W. H. Gispen, J. Verhaagen and L. H. Schrama** (1997). "B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system." *Prog. Neurobiol.* 53(6): 627-686.

40 **Picon, A. P., N. R. S. Ortega, R. Watari, C. Sartor and I. C. N. Sacco** (2012). "Classification of the severity of diabetic neuropathy: a new approach taking uncertainties into account using fuzzy logic." *Clinics (São Paulo, Brazil)* 67(2): 151-156.

41 **Poliakov, I. and C. Toth** (2011). "The impact of pain in patients with polyneuropathy." *Eur. J. Pain*.

42 **Reilly, D. M., D. Ferdinando, C. Johnston, C. Shaw, K. D. Buchanan and M. R. Green** (1997). "The epidermal nerve fibre network: characterization of nerve fibres in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variations." *Br. J. Dermatol.* 137(2): 163-170.

43 **Reilly, M. M. and M. E. Shy** (2009). "Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies." *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 80(12): 1304-1314.

44 **Rolke, R., R. Baron, C. Maier, T. R. Tölle, R.-D. Treede, A. Beyer, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, I. C. Bötefür, S. Braune, H. Flor, V. Hüge, R. Klug, G. B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihöfner, C. Rolko, C. Schaub, A. Scherens, T. Sprenger, M. Valet and B. Wasserka** (2006). "Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values." *Pain* 123(3): 231-243.

45 **Ropper, A. H. and M. A. Samuels** (2009). *Adams and Victor's principles of neurology*. New York, NY, McGraw-Hill Medical.

46 **Sander, H. W. and N. Latov** (2003). "Research criteria for defining patients with CIDP." *Neurology* 60(8 Suppl 3): S8-15.

47 **Sommer, C.** (2008). "Skin biopsy as a diagnostic tool." *Curr. Opin. Neurol.* 21(5): 563-568.

48 **Sommer, C. L., S. Brandner, P. J. Dyck, Y. Harati, C. LaCroix, M. Lammens, L. Magy, S. I. Mellgren, M. Morbin, C. Navarro, H. C. Powell, A. E. Schenone, E. Tan, A. Urtizberea and J. Weis** (2010). "Peripheral Nerve Society Guideline on processing and evaluation of nerve biopsies." *J. Peripher. Nerv. Syst.* 15(3): 164-175.

49 **Sorensen, L., L. Molyneaux and D. K. Yue** (2006). "The relationship among pain, sensory loss, and small nerve fibers in diabetes." *Diabetes Care* 29(4): 883-887.

50 **Stewart, J. D., P. A. Low and R. D. Fealey** (1992). "Distal small fiber neuropathy: results of tests of sweating and autonomic cardiovascular reflexes." *Muscle Nerve* 15(6): 661-665.

51 **Sulaiman, W. and T. Gordon** (2013). "Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application." *The Ochsner journal* 13(1): 100-108.

52 **Ueda, M. and S. Kusunoki** (2011). "[Autoimmune Neuropathies: Diagnosis, Treatment, and Recent Topics]." *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo* 63(6): 549-555.

53 **Umapathi, T., W. L. Tan, N. C. K. Tan and Y. H. Chan** (2006). "Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals." *Muscle Nerve* 33(6): 742-746.

54 **Verzé, L., C. Viglietti-Panzica, S. Maurizo, M. Sica and G. Panzica** (2003). "Distribution of GAP-43 nerve fibers in the skin of the adult human hand." *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 272(1): 467-473.

55 **Vlcková-Moravcová, E., J. Bednarík, L. Dusek, K. V. Toyka and C. Sommer** (2008). "Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies." *Muscle Nerve* 37(1): 50-60.

56 **Wöpking, S., A. Scherens, I. S. Haussleiter, H. Richter, J. Schüning, S. Klauenberg and C. Maier** (2009). "Significant difference between three observers in the assessment of intraepidermal nerve fiber density in skin biopsy." *BMC neurology* 9: 13.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

- Frau Prof. Dr. med. Sommer für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und ihre hilfreichen, freundlichen und konstruktiven Ratschläge während der gesamten Zeit.
- Frau Priv.-Doz. Dr. med. Nurcan Üçeyler für ihre kontinuierliche Unterstützung und Betreuung bis zum Fertigstellen der Arbeit sowie für das Korrekturlesen der Dissertationsschrift.
- Den Mitarbeitern des histologischen Labors der AG Sommer für die Anleitung und herzliche Zusammenarbeit. Besonders gilt mein Dank Frau Hiltrud Klüpfel, Frau Marlena Piepenschneider und Frau Sonja Mildner.
- Frau Silvia Braunsdorf für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Patienten.
- Meinem Freund Mithun für die Einführung in die Arbeit mit SPSS.
- Meiner Familie für ihre endlose Geduld und Unterstützung.