

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor der Klinik: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Systemische Expression von Zytokinen bei schmerzhaften und  
schmerzlosen Polyneuropathien**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Vorgelegt von Melissa Langjahr

aus Ludwigsburg.

Würzburg, März 2017



Referentin: Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler

Koreferentin: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

## Abkürzungsverzeichnis (englische Begriffe in kursiv)

Abb.	Abbildung
ADS	Allgemeine Depressionsskala
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
<i>BDNF</i>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<i>cDNA</i>	<i>Copy desoxyribonucleid acid</i>
CIAP	Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie
CIDP	Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CRP	C-reaktives Protein
CRPS	<i>Complex regional pain syndrome</i>
<i>Ct</i>	<i>Threshold cycle</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonucleid acid</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>
ENA	Extrahierbare nukleäre Antigene
Fa.	Firma
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
<i>GCPS</i>	<i>Graded Chronic Pain Scale</i>
IENFD	Intraepidermale Nervenfaserdichte
Inc.	<i>Incorporated</i>
INCAT	<i>Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group</i>
IL	Interleukin
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
LPS	Lipopolysaccharid

MADSAM	<i>Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy</i>
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MDC	<i>Minimal detectable concentration</i>
MMN	Multifokale motorische Neuropathie
MMP	Matrix-Metalloproteasen
<i>mRNA</i>	<i>Messenger ribonucleid acid</i>
miRNA	<i>Micro ribonucleid acid</i>
N.	Nervus
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
<i>NPSI</i>	<i>Neuropathic Pain Symptom Inventory</i>
<i>NRS</i>	<i>Numeric rating scale</i>
NSVN	Nicht-systemische vaskulitische Neuropathie
OD	Optische Dichte
<i>ODSS</i>	<i>Overall Disability Sum Score</i>
OGTT	Oraler Glucosetoleranz-Test
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-Buffered-Saline</i>
<i>PBMC</i>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIAN	Progressive idiopathische axonale Neuropathie
PFA	Paraformaldehyd
PNP	Polyneuropathie
POEMS	Polyneuropathie-Organomegalie-Endokrinopathie- Monoklonales Plasmozytom-Hautveränderungen
<i>qRT-PCR</i>	<i>Quantitative real-time PCR</i>
SFN	Small fiber Neuropathie

SSNRI	Selektiver Serotonin- und Noradrenalin-Reuptake Inhibitor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor alpha
TNFR	Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TTR	Transthyretin
T3	Trijodthyronin
T4	Tetraiodthyronin
UPM	Umdrehungen pro Minute
Vs.	versus

## Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
	Polyneuropathien (PNP) .....	1
	Neuropathischer Schmerz.....	2
	Zytokine und Schmerz .....	4
	Zytokine und PNP .....	5
	Biomarker bei PNP.....	6
	Zielsetzung und Hypothese der Studie .....	8
II.	Patienten, Material und Methoden .....	9
	Patientenkollektiv .....	9
	Kontrollkollektiv .....	13
	Klinische Untersuchungen .....	14
	Anamnese und klinisch-neurologische Untersuchung .....	14
	Standardisierte Untersuchungsscores und Fragebögen.....	14
	Laboruntersuchungen von Blut und Liquor .....	16
	Elektroneurographie .....	17
	N. suralis-Biopsie.....	17
	Hautstanzbiopsie .....	18
	Blutentnahme für Zytokinbestimmungen.....	19
	Isolation von PBMC aus Vollblut.....	19
	RNA-Extraktion aus PBMC .....	20
	Messung der optischen Dichte.....	21
	Reverse Transkriptions-PCR .....	21
	Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR) .....	23
	Messung pro-inflammatorischer Zytokine nach Zellstimulation mittels LPS..	25
	LPS-Stimulation der PBMC.....	25
	Bestimmung von Zytokinproteinen mittels Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA).....	26
	Statistische Auswertung der Daten .....	27
III.	Ergebnisse.....	27
	Klinische Daten .....	27
	Diagnostische Subgruppen.....	28
	Entzündliche PNP .....	29

Neuropathischer Schmerz .....	30
Untersuchungsscores und Fragebögen.....	30
Korrelationen der Fragebögen bzw. Scores.....	34
OGTT und diabetische Stoffwechselstörung.....	35
Elektrophysiologische Messergebnisse .....	36
Therapien der PNP .....	36
Klinischer Verlauf.....	36
Zytokingenexpression in PBMC .....	37
PBMC-Stimulationsversuch .....	40
Korrelationsanalysen.....	41
Korrelation der IL6-Genexpression und der Krankheitsdauer .....	41
IV. Diskussion .....	42
Korrelation der Score- und Fragebogendaten.....	43
Systemische Zytokinexpression .....	43
Zytokinproduktion nach Zellstimulation <i>in vitro</i> .....	45
Korrelation von IL6-Genexpression und Krankheitsdauer.....	45
Schlussfolgerung und Ausblick .....	46
Zusammenfassung.....	48
V. Tabellarische Übersicht der Patienten-/Fragebogendaten .....	49
VI. Anhang.....	53
Geräte, Materialien, Chemikalien .....	53
Tab. 14: Geräte und Laborhilfen .....	54
Tab. 15: Verbrauchsmaterialien .....	55
Tab. 16: Chemikalien, Lösungen und Puffer für die Isolation von PBMC ..	56
Tab. 17: Chemikalien, Lösungen und Puffer für die RNA-Aufreinigung .....	56
Tab. 18: Enzyme, Nukleinsäuren, Puffer und Primer für die Reverse Transkriptions-PCR.....	57
Tab. 19: Enzyme, Nukleinsäuren, Puffer und Primer für die Quantitative real-time-PCR .....	57
Tab. 20: Chemikalien, Lösungen und Puffer für die Stimulation von PBMC .....	58
Tab. 21: Chemikalien, Lösungen und Puffer für den IL6-/IL8-/TNF- ELISA	58
VII. Literaturverzeichnis .....	59



## I. Einleitung

### **Polyneuropathien (PNP)**

Polyneuropathien (PNP) gehören zu den Erkrankungen des peripheren Nervensystems und können motorische, sensible sowie autonome Nervenfasern betreffen. Je nach zugrunde liegendem Schädigungsmuster unterscheidet man zwischen primär axonalen bzw. demyelinisierenden Neuropathien und Mischformen (Heuss, et al. 2012). Eine Sonderform stellt die sogenannte Small fiber Neuropathie (SFN) dar, bei der praktisch ausschließlich die kleinkalibrigen A-delta- und C-Fasern betroffen sind (Devigili, et al. 2008; Lacomis 2002). Neben seltenen hereditären PNP findet sich eine Vielzahl von erworbenen PNP, die entzündlich bzw. nicht-entzündlich bedingt sein können. Zu Ersteren gehören u.a. autoimmun-vermittelte PNP wie z.B. das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und erregerbedingte PNP wie z.B. die Lepra-assoziierte Neuritis oder die PNP bei Neuroborreliose. Zu den häufigsten erworbenen, nicht-entzündlichen PNP zählt die diabetische Neuropathie, die sich bei 20% der Diabetiker innerhalb von zehn Jahren entwickelt (Picon, et al. 2012). Daneben können weitere metabolisch bedingte, paraneoplastische und medikamentös-toxische PNP abgegrenzt werden (England and Asbury 2004). Auch klinisch ergibt sich ein sehr heterogenes Bild, abhängig vom betroffenen Nervenfasertyp. Eine Beteiligung von motorischen Nervenfasern führt zu Paresen und im Verlauf zunehmenden Muskelatrophien, wohingegen eine Beteiligung von autonomen Nervenfasern u.a. zu Störungen der Schweißsekretion, Blasen- und Mastdarmfunktion sowie zu Trophikstörungen der Haut und Hautanhangsgebilde führen kann (England and Asbury 2004). Die sensible Symptomatik wird in Minus- und Plussymptome unterteilt. Taubheits- bzw. Pelzigkeitsgefühle zählen zu den Minussymptomen, wohingegen Kribbelmissempfindungen und neuropathische Schmerzen zu den Plussymptomen gehören (Misra, et al. 2008). Auf den neuropathischen Schmerz soll im Folgenden näher eingegangen werden.

## **Neuropathischer Schmerz**

Neuropathischer Schmerz ist definiert als Schmerz, der durch Schädigung bzw. Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems bedingt ist (Jensen, et al. 2011; Treede, et al. 2008). Beispiele sind neben PNP die Post-Zoster-Neuralgie, Trigeminusneuralgie, Schmerzen bei Radikulopathien oder traumatische Nervenläsionen sowie zentrale Schmerzsyndrome wie Schmerzen nach Schlaganfall, oder Phantomschmerzen nach Amputation (Bouhassira, et al. 2008). Etwa Zweidrittel aller Fälle sind auf diabetische PNP und Nervenverletzungen zurückzuführen (Yalcin, et al. 2014). Von neuropathischen Schmerzen betroffen sind etwa 8% der Bevölkerung (15-25% aller Patienten mit chronischen Schmerzen), hierbei vorwiegend Frauen im Alter zwischen vierzig und sechzig Jahren (Bouhassira, et al. 2008; Smith and Torrance 2012).

Die typische Symptomatik umfasst neben spontanen, attackenartig einschließenden, meist stechenden Schmerzen, einen oft brennenden Dauerschmerz. Weitere spontan auftretende Phänomene können ein Druck- bzw. Engegefühl der Extremitäten, Dysästhesien (schmerzhaftes Missempfindungen) und die nicht-schmerzhaften (Kribbel-) Parästhesien sein, die häufig von PNP-Patienten berichtet werden (Baron, et al. 2010). Abhängig von äußeren Reizen sind die evozierten Schmerzphänomene Allodynie (ein nicht-schmerzhafter Reiz wie z.B. Berührung oder Wärme löst in betroffenen Arealen Schmerzen aus) und Hyperalgesie (ein leicht-schmerzhafter Reiz löst eine inadäquat starke Schmerzreaktion aus) (Maier, et al. 2010).

Der Schmerz beeinflusst neben der allgemeinen Aktivität und Mobilität der Patienten auch Arbeitsfähigkeit, Freizeitaktivitäten, Schlaf, soziale Beziehungen und Stimmung (Schmader 2002). Häufig leiden die Patienten zudem an Konzentrations- und Gedächtnisstörungen (Gustorff, et al. 2008; Legrain, et al. 2009; Radat, et al. 2013). Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung zeigt sich eine erhöhte Lebenszeitprävalenz von affektiven Erkrankungen (47% vs. 14%, Punktprävalenz 30%) sowie von Angststörungen (39% vs. 13,6%, Punktprävalenz 20%) (Radat, et al. 2013); die Häufigkeiten entsprechen derjenigen chronischer Schmerzpatienten mit nicht-neuropathischem Schmerz

(Fishbain, et al. 1986). Dies führt zu einer häufigeren Inanspruchnahme von medizinischer Versorgung (Von Korff, et al. 2005) und ist zudem mit einem schlechteren Therapieansprechen verbunden (Edwards, et al. 2010).

Unabhängig von der Ursache ist die Therapie neuropathischer Schmerzen meist eine Herausforderung (Cohen and Mao 2014; Finnerup, et al. 2015). Eingesetzt werden Antidepressiva (Trizyklika und selektive Serotonin- und Noradrenalin-Reuptake Inhibitoren), Antikonvulsiva (Pregabalin, Gabapentin), topische Medikamente (5%-Lidocain-, 8%-Capsaicin-Pflaster) sowie Opioide (Baron 2006). Die in der Regel mehrfach tägliche Einnahme, eine lange Eindosierungsphase, störende Nebenwirkungen (z.B. Schwindel und Müdigkeit) sowie eine Nicht-Ansprechrates von bis zu 40% je Medikamentengruppe müssen mit den Patienten besprochen werden (Magerl, et al. 2010). Erstes Ziel ist die Schmerzreduktion; Schmerzfreiheit kann nur selten erreicht werden. Dies liegt unter anderem am bislang nur unzureichenden Verständnis der Pathophysiologie des neuropathischen Schmerzes (Cohen and Mao 2014).

Als entscheidende Prozesse bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen gelten die sogenannte zentrale und periphere Sensibilisierung. Hierbei kommt es unter anderem durch eine veränderte neuronale Ionenkanalexpression (insbesondere von Natriumkanälen) zu einer erniedrigten Reizschwelle der nozizeptiven Afferenzen und der zugehörigen Spinalganglien. Dies resultiert in pathologischer Spontanaktivität, die neben den betroffenen auch benachbarte, intakte nozizeptive Fasern betrifft (Campbell and Meyer 2006; Cohen and Mao 2014; Julius and Basbaum 2001; Levinson, et al. 2012). Ausschlaggebend für diese Prozesse ist unter anderem die Stimulation der nozizeptiven Afferenzen sowie der umgebenden Gliazellen durch verschiedene Entzündungsmediatoren, insbesondere durch Zytokine (Walters, 2014). Das Immunsystem spielt hinsichtlich der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen eine entscheidende Rolle: während die pro-inflammatorischen Anteile diese Prozesse begünstigen, wirken die anti-inflammatorischen Anteile protektiv (Austin and Moalem-Taylor 2010; Clark, et al. 2013; Üçeyler and Sommer 2008). Auf die Zytokine, die mit der Entstehung

und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen essentiell verknüpft sind, soll im Weiteren näher eingegangen werden.

### **Zytokine und Schmerz**

Zytokine sind kleine lösliche Peptide und Proteine (5-140 kDa), die hauptsächlich von Immunzellen, aber auch einer Vielzahl anderer Zellen wie Schwann-Zellen, Fibroblasten und Keratinozyten bei immunologischen und entzündlichen Prozessen gebildet und sezerniert werden (Austin and Moalem-Taylor 2010; Clark, et al. 2013). Ihre Wirkung ist auto- und parakrin, d.h. die produzierende Zelle selbst wie auch die benachbarten Zellen werden durch die ausgeschütteten Zytokine stimuliert. Es sind picomolare Konzentrationen ausreichend, um die spezifischen, überwiegend membrangebundenen Rezeptoren zu aktivieren und somit Wachstum, Aktivität und Differenzierung der Zielzelle zu beeinflussen (Dinarello 2007). Je nach biologischem Effekt wird eine pro- und anti-inflammatorische Zytokingruppe unterschieden; allerdings muss bei dieser Klassifikation die zum Teil bestehende Doppelwirksamkeit einiger Zytokine beachtet werden, die je nach Dosis, Wirkungsort und umgebendem Milieu sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte auslösen können. Daher existieren weitere Einteilungen anhand von Struktur oder Rezeptortyp (Liongue, et al. 2016). Generell ist das Zytokinsystem redundant und pleiotrop, d.h. viele Zytokine haben die gleiche Wirkung auf eine Zielzelle bzw. ein Zytokin kann verschiedene Effekte je nach Rezeptor und Zielzelle auslösen (Üçeyler and Sommer 2008). Pro-inflammatorische Zytokine induzieren die eigene Produktion, sowie die Produktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine über positive Rückkopplungsmechanismen (Watkins, et al. 1995). Durch direkte Effekte, wie die Aktivierung bzw. Sensibilisierung von Nozizeptoren (Junger and Sorkin 2000; Sommer and Kress 2004), als auch über indirekte Effekte wie die Bildung von Prostaglandinen (Cunha, et al. 1992) oder Neuropeptiden (Hou, et al. 2003; Inoue, et al. 1999; Oprea and Kress 2000) wirken pro-inflammatorische Zytokine algetisch. Anti-inflammatorische Zytokine dienen dagegen als negative Feedback-Regulatoren,

d.h. sie hemmen die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine und ihrer Rezeptoren und sorgen hiermit für eine ausgeglichene Immunantwort (Strle, et al. 2001). Hinsichtlich der neuropathischen Schmerzen nehmen die anti-inflammatorischen Zytokine somit eine vorwiegend analgetische Rolle ein (Borner, et al. 2004; Clark, et al. 2013; Cunha, et al. 1999; Kanaan, et al. 1997; Yadav, et al. 2007).

### **Zytokine und PNP**

Angestoßen durch die oben genannten Befunde wurden Zytokinprofile bei einer Vielzahl verschiedener PNP-Subgruppen untersucht; hierbei fanden sich unterschiedliche Zytokinprofile. Während sich erhöhte Interleukin (IL) 1 $\beta$ - und Tumor-Nekrosefaktor (TNF)-Proteinspiegel in Vollblut von Patienten mit chronisch-inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP) fanden, wiesen Patienten mit GBS lediglich höhere Proteinspiegel für IL1 $\beta$  auf; auch innerhalb verschiedener CIDP-Subgruppen konnten Expressionsunterschiede der pro-inflammatorischen Zytokine und Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (Beppu, et al. 2015; Gironi, et al. 2010). Im Fall des POEMS-Syndroms (Polyneuropathie-Organomegalie-Endokrinopathie-Monoklonales Plasmozytom-Hautveränderungen [skin]) fanden sich wiederum höhere IL6-Proteinspiegel in Vollblut von Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Koike, et al. 2008). Diese im Rahmen der Neuroinflammation entstehenden Veränderungen sind aber nicht nur bei entzündlichen Neuropathien anzutreffen, sondern spielen auch im Verlauf verschiedener nicht-entzündlicher Neuropathien eine Rolle. So konnte sowohl bei hereditären Neuropathien, als auch bei der diabetischen Neuropathie die pathogenetische Bedeutung des entzündlichen Milieus belegt werden, das zudem mit dem klinisch-elektrophysiologischen Schweregrad zu korrelieren scheint (Ludwig, et al. 2008; Martini and Willison 2016; Vincent, et al. 2011).

Diese lokalen und systemischen Veränderungen liefern zudem Anhaltspunkte dafür, warum PNP identischer Ätiologie schmerzhaft oder schmerzlos verlaufen können. So fand sich in Haut- und Nervenbiopsaten von Patienten mit

schmerzhaften Neuropathien eine höhere Genexpression bzw. erhöhte Immunreaktivität von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL1, IL6 und IL8 im Vergleich zu schmerzlosen PNP bzw. gesunden Kontrollen (Empl, et al. 2001; Lindenlaub and Sommer 2003; Üçeyler, et al. 2010; Üçeyler, et al. 2015b). Systemisch zeigte sich sowohl in Liquor, als auch in Vollblut ein Ungleichgewicht zu Gunsten der pro-inflammatorischen Zytokine bei schmerzhaften Verlaufsformen. So konnte in Studien eine höhere Genexpression von IL2 und TNF in Vollblut-Proben von Patienten mit schmerzhafter PNP bzw. eine höhere Genexpression von IL2 und IL10 in Vollblut-Proben von SFN-Patienten im Vergleich zu Gesunden bzw. Patienten mit schmerzloser PNP nachgewiesen werden (Üçeyler, et al. 2010; Üçeyler, et al. 2007). Nur in wenigen Studien fand sich eine Verminderung von anti-inflammatorischen Zytokinen bei neuropathischen Schmerzen; so konnten Backonja et al. in Vollblut und Liquor von Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen nach Nervenläsion bzw. im Rahmen einer PNP eine niedrigere Proteinexpression von IL10 bei gleichzeitig höherer IL1-Proteinexpression im Blut nachweisen (Backonja, et al. 2008). Schmerzlose Verlaufsformen gingen in einigen Studien mit höheren anti-inflammatorischen Zytokinspiegeln einher; so zeigte sich in einer Studie eine höhere Genexpression von IL4 und IL10 im Vollblut schmerzloser PNP-Patienten im Vergleich zu Gesunden bzw. Patienten mit schmerzhafter PNP (Üçeyler, et al. 2007). Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Bestimmung von Zytokinen im Rahmen der PNP-Diagnostik als sogenannter Biomarker diskutiert.

### **Biomarker bei PNP**

Biomarker sind objektiv messbare, biologische Parameter, die zur Diagnose und Prognoseabschätzung einer Erkrankung bzw. Therapie herangezogen werden können; diese sollten eine möglichst hohe Sensitivität bzw. Spezifität aufweisen (Dancey, et al. 2010).

Da häufig auch nach ausführlicher klinischer Untersuchung, laborchemischer und elektrophysiologischer Diagnostik sowie Nerven-und Hautbiopsie eine

Unterscheidung der verschiedenen PNP-Subgruppen schwierig bleibt, werden möglichst einfach zu bestimmende Biomarker benötigt, um insbesondere gut therapierbare PNP-Subtypen, wie z.B. entzündliche Neuropathien, frühzeitig zu diagnostizieren (Brannagan 2011; Latov, et al. 2011). Auch objektive Verlaufsp Parameter, die die Erkrankungsaktivität bzw. das Ansprechen auf Therapie (insbesondere hinsichtlich der Schmerzen) widerspiegeln, sind für die meisten Subtypen nicht vorhanden (Latov, et al. 2011). Atypische Verläufe, Diagnosekriterien mit noch unzureichender Sensitivität und Spezifität sowie das Vorliegen mehrerer potentiell Neuropathie-auslösender Faktoren stellen eine große Herausforderung dar (Üçeyler, et al. 2015b). Ein Beispiel hierfür ist die CIDP, für die vierzehn verschiedene Diagnosekriterien zur Verfügung stehen (Brannagan 2011); die gebräuchlichsten Kriterien (INCAT-Kriterien (Hughes 2001) bzw. EFNS/PNS-Kriterien 2010 (Joint Task Force of the and the 2010a) umfassen neben der klinischen Präsentation elektrophysiologische und laborchemische Störungen sowie pathologische Befunde in der Nervenbiopsie. Dennoch fallen nicht nur Patienten mit atypischen Verläufen häufig durch diese diagnostischen Raster; in einer Studie von 1998 konnten bei Patienten mit klassischer klinischer Präsentation einer CIDP und Ansprechen auf Immuntherapie in nur einem Drittel die geforderten elektrophysiologischen, laborchemischen und histologischen Diagnosekriterien erfüllt werden (Barohn and Saperstein 1998). Nicht selten liegen bei den Patienten zudem weitere potentiell PNP-auslösende Faktoren, wie z.B. ein Diabetes mellitus vor (Latov 2011). Auch wenn die klassische diabetische PNP elektrophysiologisch axonal und klinisch distal-betont ist, gibt es Phänotypen, die in ihrem Verteilungsmuster und ihren elektrophysiologischen Auffälligkeiten einer CIDP ähneln können (De Sousa, et al. 2009). Gleiches gilt beispielsweise auch für die hereditäre PNP Charcot-Marie-Tooth (CMT) 1. Aufschluss geben kann in manchen dieser Fällen eine Nervenbiopsie; im Falle der CIDP zählen Makrophagen-Cluster um Gefäße sowie Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9)-Ablagerungen in endoneuralen Blutgefäßen zu Biomarkern, die bei Patienten mit diabetischer PNP bzw. CMT1-Patienten seltener zu finden sind (Jann, et al. 2003; Lauria, et al. 2005). In neueren Microarray-Studien konnten zudem veränderte

Expressionsprofile für Inflammations- und Remyelinisierungsmarker in N. suralis-Biopsaten von Patienten mit CIDP, aber auch vaskulitischer PNP nachgewiesen werden (Kinter, et al. 2010; Renaud, et al. 2005; Steck, et al. 2011). Da diese Veränderungen nicht spezifisch für eine diagnostische Subgruppe sind und bei diversen entzündlichen Neuropathien nachgewiesen werden können, sowie zudem nicht jeder Patient einer Nervenbiopsie unterzogen werden kann, bleibt die Bedeutung dieser Marker bislang eingeschränkt (Latov, et al. 2011). Aus diesen Gründen ist die Identifizierung von spezifischen Markern aus einfach zu gewinnendem Material wie Blut wichtig; die Ergebnisse der oben aufgeführten Studien wiederum legen nahe, Zytokine als Biomarker bei PNP einzusetzen.

## **Zielsetzung und Hypothese der Studie**

### **Zielsetzung**

Ziel der Studie war es, systemische Zytokinprofile von PNP-Patienten zu charakterisieren, dabei insbesondere die Zytokinexpression bei Patienten mit schmerzhaften- bzw. schmerzlosen PNP zu determinieren, somit potentielle diagnostische Biomarker zu identifizieren sowie die Zytokinproduktion nach pro-inflammatorischer Stimulation *in vitro* zu untersuchen. Verwendet wurden hierfür periphere mononukleare Zellen (PBMC), die eine relevante Quelle systemischer Zytokine darstellen und für das physiologische Zytokingleichgewicht zuständig sind. Neben der Genexpression der Zytokine IL1, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10 und TNF wurde zudem die Proteinexpression von IL6, IL8 und TNF nach gezielter Zellstimulation mittels Lipopolysaccharid (LPS) *in vitro* untersucht, um eine überschießende Produktion nach Stimulation als mögliche Erklärung für eine höhere Genexpression ausschließen zu können. Auch sollte erstmals eine große Kohorte von PNP-Patienten mit verschiedenen Neuropathieformen hinsichtlich der oben genannten Ansatzpunkte systematisch untersucht werden.

Die Hypothesen lauteten wie folgt:



- Patienten mit PNP unterscheiden sich in ihrem systemischen Zytokinprofil von gesunden Kontrollen
- Patienten mit schmerzhafter PNP weisen ein pro-inflammatorisches, Patienten mit schmerzloser PNP ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil auf
- Es bestehen unterschiedliche Zytokinprofile zwischen den verschiedenen PNP-Subgruppen, die als Biomarker dienen können
- Die Zytokinproduktion nach pro-inflammatorischer Stimulation von PBMC *in vitro* ist bei Patienten mit PNP im Vergleich zu gesunden Kontrollen gesteigert

## II. Patienten, Material und Methoden

### Patientenkollektiv

Zwischen August 2010 und April 2012 wurden 111 volljährige Patienten prospektiv rekrutiert, die sich in stationärer bzw. ambulanter Behandlung zur diagnostischen Abklärung einer PNP unklarer Genese in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg befanden und in diesem Zusammenhang eine Hautstanz- und/ oder N. suralis-Biopsie erhielten. Ausschlusskriterien waren eine bereits begonnene immunsuppressive Therapie sowie ein aktuell bestehender Infekt. Die Studienteilnahme erfolgte auf freiwilliger Basis. Alle Patienten wurden ausführlich mündlich und schriftlich über die Studie aufgeklärt und erteilten im Anschluss ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät befürwortet (AZ 85/06). Die biometrische Fallzahlplanung bezog sich auf die Hauptfragestellung „Unterscheiden sich Patienten mit PNP in ihrer Zytokingenexpression zu gesunden Kontrollen?“. Nachdem sich in unserer Vorarbeit nicht-normal verteilte Ergebnisse zeigten (Üçeyler, et al. 2007), wurde ein analoges Ergebnis erwartet und der nicht-parametrische Fisher's exact Test verwendet. Als signifikant galt ein p-Wert < 0,05, eine statistische Power von 0,95 wurde angestrebt. Da aus unserer Vorarbeit bei etwa 60% der Patienten eine relevant

vermehrte bzw. verminderte Genexpression vorlag, während dies bei gesunden Kontrollen in nur ca. 25% zutraf, und eine erschwerte Rekrutierung von gesunden, seitens Alters und Geschlechts angepassten Kontrollen zu erwarten war (Verhältnis 3:1), konnte mit der Statistiksoftware G\*Power 3.1.7 (<http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/>) eine notwendige Fallzahl von 93 Patienten und von 31 Kontrollen errechnet werden. Da erfahrungsgemäß etwa 10% der Daten aufgrund von technischen Problemen etc. nicht in die Endauswertung aufgenommen werden können, wurden zusätzlich zu den berechneten Fallzahlen mindestens neun weitere Patienten bzw. drei weitere Kontrollen angestrebt. Das Ergebnis der Fallzahlberechnung mit G\*Power 3.1.7 lautete:

**Exact** - Proportions: Inequality, two independent groups (Fisher's exact test)

**Options:** Exact distribution

**Analysis:** A priori: Compute required sample size

<b>Input:</b>	Tail(s)	= One
	Proportion p1	= 0.6
	Proportion p2	= 0.25
	$\alpha$ err prob	= 0.05
	Power (1- $\beta$ err prob)	= 0.95
	Allocation ratio N2/N1	= 3
<b>Output:</b>	Sample size group 1	= 93
	Sample size group 2	= 31
	Total sample size	= 94
	Actual power	= 0.9529534
	Actual $\alpha$	= 0.0315594

Insgesamt konnten 81 Männer (Altersmedian 62 Jahre, Spanne 23 bis 84 Jahre) sowie 30 Frauen (Altersmedian 66 Jahre, Spanne 31 bis 81 Jahre) mit

PNP für die Studie rekrutiert werden, von denen 71 Männern (73%; medianes Alter 62; 23 bis 84 Jahre) und 26 Frauen (27%; medianes Alter 67 Jahre; 31 bis 81 Jahre) Blut entnommen werden konnte.

Folgende Diagnosesubgruppen wurden unterschieden (alphabetisch geordnet):

- Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie (CIAP): Im Falle der CIAP liegt eine schleichend beginnende und langsam progrediente, sensomotorische, axonale PNP ohne Ansprechen auf eine Steroidtherapie vor. Die Liquordiagnostik ist unauffällig, die distale IENFD in der Hautbiopsie ist reduziert, in der Nervenbiopsie können keine Entzündungszeichen nachgewiesen werden (Vrancken, et al. 2004).

- Chronische inflammatorische demyelinisierende Neuropathie (CIDP): Die Diagnose einer CIDP erfolgte gemäß den INCAT-Kriterien (Inflammatory neuropathy cause and treatment), die auf klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Befunden beruhen (Hughes 2001). Zudem wurden zwei Unterformen abgegrenzt:

- „CIDPclin“: Patienten, die hinsichtlich einer CIDP die typische klinische Präsentation, die entsprechenden laborchemischen Veränderungen sowie eine elektrophysiologisch bzw. histologisch demyelinisierende Neuropathie aufwiesen, ohne jedoch die elektrophysiologischen INCAT-Kriterien vollständig zu erfüllen.
- „CIDPsens“: Patienten mit rein sensibler Symptomatik von mind. zwei Monaten Dauer, Ansprechen auf eine Steroidtherapie, erhöhtem Gesamteiweiß in der Liquordiagnostik, elektrophysiologischen Demyelinisierungszeichen, histologischem Nachweis von Entzündung und Demyelinisierung in der Nervenbiopsie und normaler bis allenfalls leicht erniedrigter intraepidermaler Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie (Ayrignac, et al. 2013; Eftimov and van Schaik 2013).

- Diabetische PNP: Eine diabetische Neuropathie wurde bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ I oder Typ II und typischen klinischen, laborchemischen und elektrophysiologischen Befunden diagnostiziert.

- Hereditäre PNP: Im Falle eines positiven genetischen Befundes oder alternativ einer positiven Familienanamnese und einer typischen klinischen bzw. elektrophysiologischen Präsentation wurde die Diagnose einer hereditären PNP gestellt.
- Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy (MADSAM): Die zu den immunvermittelten, demyelinisierenden, chronischen Neuropathien zählende MADSAM wurde anhand von klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Kriterien diagnostiziert (Lewis, et al. 1982; Saperstein, et al. 1999).
- Paraproteinämische PNP: Eine paraproteinämische Neuropathie wurde bei Nachweis von Paraprotein mit oder ohne Anti-MAG-Antikörpern diagnostiziert (Joint Task Force of the and the 2010b).
- Progressive idiopathische axonale Neuropathie (PIAN): Im Falle der PIAN besteht eine akut bis subakut einsetzende, langsam progrediente, sensomotorische, axonale PNP, die ein Ansprechen auf Steroidtherapie zeigt. Histologisch können neben einem axonalen Schädigungsmuster Entzündungszeichen nachgewiesen werden; in der Hautbiopsie zeigt sich eine verminderte IENFD bis hin zu einem vollständigen Verlust der Hautinnervation. Der Proteingehalt des Liquors ist erhöht (Vrancken, et al. 2004).
- Small fiber Neuropathie (SFN): Die Diagnose der rein sensiblen SFN mit im Vordergrund stehenden brennenden Dysästhesien wurde anhand von klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Kriterien gestellt (Devigili, et al. 2008; Lacomis 2002).
- „Sonstige“: Sämtliche PNP-Fälle gesicherter Genese, die aber nicht den hier aufgeführten Diagnosen zuzuordnen waren (z. B. PNP bei Amyloidose oder Niereninsuffizienz) wurden in der Subgruppe „Sonstige“ zusammengefasst.
- „Unklar“: In diese Gruppe wurden alle Patienten eingeteilt, bei denen nach Abschluss der Diagnostik inklusive Nervenbiopsie weiterhin keine eindeutige ätiologische Zuordnung der PNP vorgenommen werden konnte. Anhand des

elektrophysiologischen bzw. histologischen Schädigungsmusters wurde jedoch eine entsprechende Unterteilung in „unklar axonal“, „unklar demyelinisierend“ und „unklar gemischt“ durchgeführt. Zudem wurde im Falle eindeutiger entzündlicher Veränderungen in der Nervenbiopsie (definiert als mind. drei perivaskuläre endo- oder epineurale Infiltrate bestehend aus mind. drei T-Zellen oder Makrophagen oder einer diffusen endoneuralen Zellvermehrung bestehend aus mind. zehn T-Zellen oder Makrophagen in mindestens zwei mittels Immunhistochemie für CD3-/Leu4- bzw. CD-68-angefärbten Schnitten) in einigen Fällen eine Einteilung in die Gruppe der entzündlichen Neuropathien möglich.

- Vaskulitische Neuropathie: Hierbei wurde zwischen einer PNP bei systemischer Vaskulitis und einer nicht-systemischen vaskulitischen Neuropathie (NSVN) unterschieden (Collins, et al. 2003; Üçeyler, et al. 2015a).

### **Kontrollkollektiv**

Die Kontrollgruppe umfasste 38 volljährige Freiwillige (21 Männer und 17 Frauen, Altersmedian jeweils 56 Jahre, Spanne 24 bis 77 Jahre bzw. 27 bis 76 Jahre). Die Gruppe setzte sich aus Patienten der Neurologischen Universitätsklinik bzw. der Universitäts-Augenklinik und Patientenangehörigen zusammen. Folgende Ausschlusskriterien wurden festgesetzt: Vorliegen einer PNP, akute oder chronische Schmerzen, akute oder chronische Entzündung (Infektionen, rheumatische Erkrankungen etc.), eine bestehende immunsuppressive Therapie, ein aktives oder vormals bestehendes Tumorleiden sowie das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Neben einer ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung wurde zum Ausschluss einer subklinischen PNP eine N. suralis-Neurographie durchgeführt, die für den Einschluss in die Studie normwertig sein musste (Reizantwortamplitude  $\geq 10 \mu\text{V}$  bei Patienten  $< 65$  Jahre/  $\geq 5 \mu\text{V}$  bei Patienten  $\geq 65$  Jahre, Nervenleitgeschwindigkeit altersunabhängig  $\geq 40$  m/s).

## **Klinische Untersuchungen**

### **Anamnese und klinisch-neurologische Untersuchung**

Alle Patienten wurden ausführlich anamnestiziert und klinisch-neurologisch untersucht. Um als schmerzhaftes PNP eingestuft zu werden, mussten mindestens zwei der folgenden drei Kriterien erfüllt sein: Angabe von Schmerz, aktuelle Schmerzstärke und/oder Schmerzmaximum der letzten Woche von mindestens 3 auf einer numerischen Rating- Skala (NRS; 0 = „kein Schmerz“ bis 10 = „maximaler Schmerz“). Des Weiteren wurde der klinische Verlauf bzw. das Outcome anhand des klinischen Befundes, der elektrophysiologischen Messergebnisse sowie des subjektiven Empfindens des Patienten bis spätestens sechs Monate nach Rekrutierungsende im Rahmen einer erneuten klinischen Vorstellung oder alternativ eines Telefoninterviews bewertet. Hierbei wurden die Kategorien „verschlechtert“, „stabil“ und „verbessert“ unterschieden, wobei die Beurteilung in mindestens zwei der drei Bereiche (klinische Präsentation, Elektrophysiologie, subjektive Einschätzung des Patienten) übereinstimmen musste.

### **Standardisierte Untersuchungsscores und Fragebögen**

Es wurden ein PNP-Score, zwei standardisierte Schmerzfragebögen und ein Depressionsfragebogen eingesetzt.

Zu den PNP-Scores zählt der Overall Disability Sum Score (ODSS) (Bril and Perkins 2002). Mittels des ODSS kann die PNP-bedingte Einschränkung der Arm-, wie auch der Beinfunktion erfasst werden; der ODSS ist insbesondere bei motorischen Neuropathien ein guter Verlaufsparemeter. Bewertet werden vier Funktionen der oberen Extremitäten (u.a. Öffnen/Schließen von Knöpfen/Reißverschlüssen, Nutzung von Besteck), wobei aus dem Ausmaß an Beeinträchtigung ein Score zwischen 0 = „normal“ bis 5 = „schwere Symptome in einem oder beiden Armen, die alle gezielten Bewegungen unmöglich machen“ abgeleitet wird. Daneben wird in sechs Fragen die Gehfähigkeit (u.a. hinsichtlich des Gebrauchs von Hilfsmitteln) evaluiert; hier kann ein Score von 0 = „Gehen nicht gestört“ bis 7 = „verbringt die meiste Zeit im Rollstuhl oder Bett, kann keine zielgerichteten Bewegungen der Beine durchführen“ erreicht

werden. Durch Addition des Arm- und Beinscores wird ein Gesamtscore gebildet.

Da Depression und chronische Schmerzen oft vergesellschaftet sind wurde zur Erfassung möglicher Symptome einer Depression die Allgemeine Depressionsskala (ADS) angewendet. Hierbei werden anhand von 20 Fragen depressive Denkmuster, klassische somatische Beschwerden im Rahmen einer Depression sowie die Stimmung in den letzten sieben Tage determiniert und ihre Häufigkeit bzw. Dauer anhand einer vierstufigen Skala (0 Punkte = „kaum oder überhaupt nicht (weniger als 1 Tag)“; 1 Punkt = „manchmal (1 bis 2 Tage)“; 2 Punkte = „öfters (3 bis 4 Tage)“; 3 Punkte = „meistens (5 bis 7 Tage)“) angegeben (Hautzinger and Bailer 1993). Die Auswertung erfolgt durch Addition der einzelnen Punkte. Ab einem Score von 16 der maximal möglichen 60 Punkte besteht der Verdacht auf eine klinisch relevante und weiter abklärungsbedürftige depressive Störung.

Um die unterschiedlichen Qualitäten des neuropathischen Schmerzes quantitativ zu erheben wurde die deutsche Version des Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) verwendet. Darin ordnet der Patient verschiedenen, neuropathischen Schmerzqualitäten bzw. Missempfindungen eine Intensität von 0 = „nicht vorhanden“ bis 10 = „maximal vorstellbar“ zu (Bouhassira, et al. 2004; Sommer, et al. 2011). Anhand der Angaben können ein Gesamtscore, sowie Subscores für die jeweiligen Schmerzqualitäten bzw. Missempfindungen (Brennen, Druck, attackenartiger Schmerz, evozierter Schmerz, Par-/Dysästhesien) errechnet werden (Minimum 0 bis Maximum 1).

Mittels der Graded Chronic Pain Scale (GCPS) werden die aktuelle und durchschnittliche Schmerzstärke bzw. das Schmerzmaximum und die schmerzbedingte Einschränkung des Alltagslebens (Alltags- und Freizeitaktivitäten, Arbeitsfähigkeit, Anzahl der Tage mit Einschränkung) innerhalb der letzten vier Wochen mittels einer numerischen Rating-Skala erfasst (0 Punkte = „kein Schmerz/keine Beeinträchtigung“ bis 10 Punkte = „maximaler Schmerz/keine Aktivität mehr möglich“). Aus den Patientenangaben werden ein Schmerzintensitätsscore (Minimum 0, Maximum 100; Mittelwert der

aktuellen, durchschnittlichen und maximalen Schmerzstärke \*10) und ein Behinderungsscore errechnet (Minimum 0, Maximum 6; Mittelwert der Einschränkung der Alltags- bzw. Freizeitaktivitäten sowie der Arbeitsfähigkeit \*10 + Punktwert für die Tage mit Einschränkung), die wiederum die Einteilung in verschiedene Gesamtbetroffenheitsgrade (Grad 0 = „keine Schmerzbedingten Einschränkungen“ bis Grad 4 = „hohe Behinderung, schwer einschränkend“) ermöglichen (Von Korff, et al. 1992).

### **Laboruntersuchungen von Blut und Liquor**

Im Rahmen der Diagnostik bei PNP wurden folgende Blutwerte untersucht: kleines Blutbild und Differentialblutbild, Blutsenkungsgeschwindigkeit und C-reaktives Protein (CRP), Serumelektrolyte, Nüchtern-Glukose und Blutzuckertagesprofil, HbA1c-Wert, Nieren- und Leberwerte, die Schilddrüsenparameter Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH), Trijodthyronin (T3) und Tetrajodthyronin (T4), Serumelektrophorese und Immunfixation, Rheumafaktor, antinukleäre Antikörper (ANA), anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA), Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA), Folsäure und Vitamin B12. Bei niedrig-normalen Vitamin B12-Werten erfolgte zudem die Bestimmung von Methylmalonsäure und Homocystein, deren Spiegel im Rahmen eines Vitamin B12-Mangels erhöht sind und deren Bestimmung eine höhere Sensitivität hinsichtlich der Detektion eines Vitamin B12-Mangels aufweist, als die alleinige Messung des Serum-Vitamin B12-Spiegels (Savage, et al. 1994; Wiersinga, et al. 2005). Bei allen Patienten mit unauffälligem HbA1c-Wert bzw. normwertigem Blutzuckertagesprofil wurde ein oraler Glukosetoleranz-Test (OGTT) zum Ausschluss einer gestörten Glukosetoleranz bzw. eines Diabetes mellitus durchgeführt. Weitere Spezialuntersuchungen wie die Bestimmung von antineuronalen Antikörpern, wurden je nach klinischem Verdacht ergänzt. Urindiagnostik hinsichtlich Bence-Jones-Proteinurie wurde bei entsprechenden Auffälligkeiten in der Serumelektrophorese bzw. Immunfixation veranlasst.



Zudem wurde bei allen Patienten eine Lumbalpunktion durchgeführt, soweit dies nicht bereits im Vorfeld geschehen war. Hinsichtlich des Liquors erfolgten Untersuchungen wie die Bestimmung von Zellzahl und Gesamteiweiß, sowie bei Auffälligkeiten der Standardparameter bzw. bei klinischem Verdacht virologische und mikrobiologische Diagnostik.

### **Elektroneurographie**

Um den betroffenen Nervenfasertyp (sensibel versus motorisch), das Verteilungsmuster (symmetrisch versus asymmetrisch) und die Schädigungsart (demyelinisierend versus axonal) zu erfassen, wurden Elektroneurographien der oberen und unteren Extremitäten durchgeführt. Hierbei wurden neben dem N. suralis beider Seiten der N. tibialis, sowie mindestens zwei weitere motorische Nerven analysiert. Gemäß der laborinternen Normwerte galt eine Nervenleitgeschwindigkeit  $\geq 40$  m/s als unauffällig. Die Reizantwortamplituden der motorischen Nerven sollten bei  $\geq 10$  mV (Ausnahme N. peroneus  $\geq 5$  mV) sowie im Falle des sensiblen N. suralis bei  $\geq 10$   $\mu$ V (ab 65 Jahren  $\geq 5$   $\mu$ V) liegen.

### **N. suralis-Biopsie**

Lies sich die Ätiologie der PNP durch oben genannte Untersuchungen nicht hinreichend klären, erfolgte eine standardisierte und diagnostische Biopsie des N. suralis. Diese diente vorrangig dem Nachweis einer möglichen entzündlichen Genese, zudem konnte das Ausmaß bzw. die Art der Schädigung (axonal vs. demyelinisierend, homogener vs. inhomogener Nervenfaserverlust) näher quantifiziert und ggf. spezifische Pathologien (bspw. Nachweis Amyloidplaques, Tumorzellen, Tomaculae) erhoben werden (Sommer, et al. 2010). Die Nervenbiopsien wurden nach standardisiertem Verfahren in der Neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg durchgeführt (Mellgren and Lindal 2011; Rappaport, et al. 1993; Sommer, et al. 2010). In Lokalanästhesie erfolgt hierbei die Entnahme eines etwa 5 cm großen Nervenstückes sowie

eines Hautstückes oberhalb des Malleolus lateralis. Die Hälfte der jeweiligen Biopsate wurde in flüssigem Stickstoff für weitere Genexpressionsanalysen schockgefroren und bei -80°C gelagert, während das übrige Biopsat für die histologische Routinediagnostik aufgearbeitet wurde. Dies umfasste die Herstellung von Paraffin- und Gefrierschnitten (Hämatoxylin-Eosin-/Elastica-van-Gieson-/Kongo-Rot-Färbung, Immunhistochemie für Makrophagen und T-Zellen), Zupfpräparaten sowie eine Kunstharzeinbettung (Semidünnschnitte).

### **Hautstanzbiopsie**

Zur Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte und ggf. Nachweis von dermalen Entzündungszellen erfolgte in Kombination mit einer N. suralis-Biopsie oder alleinig eine Hautstanzbiopsie des Ober- und Unterschenkels nach einem standardisiertem Verfahren (Lauria, et al. 2010; Lauria, et al. 2009). Die Entnahme erfolgte 10 cm oberhalb des Malleolus lateralis sowie an der Oberschenkelaußenseite 20 cm unterhalb der Spina iliaca anterior superior mittels 5 mm Hautstanzen (Biopsy Punch 5 mm, Fa. Stiefel, Offenbach, Deutschland). Nach Sprühdesinfektion und Lokalanästhesie mittels Scandicain 1% wurde die etwa 3 mm tiefe Biopsie durchgeführt und das Biopsat nach Abtrennung von der Subkutis mittels Skalpell halbiert. Die Biopsiestellen wurden mittels steriler Heftpflaster (Leukostrip, Fa. Smith&Nephew Medical Limited, London, Großbritannien; Leukomed, Fa. BNS medical GmbH, Hamburg, Deutschland) versorgt. Für Genexpressionsanalysen wurde je eine Hälfte der Biopsate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die zweite Biopsiehälfte für die immunhistochemischen Färbungen wurde mittels 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten fixiert und nach dreimaliger Waschung mittels 0,1 M Phosphatpuffer in 10% Saccharose bei 4°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

## **Blutentnahme für Zytokinbestimmungen**

Um Auswirkungen endogener bzw. exogener Faktoren auf die Zytokinspiegel weitestgehend zu kontrollieren, wurde die Blutentnahme standardisiert zwischen sieben und neun Uhr morgens durchgeführt. Die Patienten waren zu diesem Zeitpunkt nüchtern und durften am Vortag weder Alkohol noch Nikotin konsumiert haben. Auch stärkere körperliche Aktivität am Vortag war nicht gestattet (Pedersen and Toft 2000). Zudem wurden die regelmäßig eingenommenen Medikamente sowie bei Frauen das Datum der letzten Menstruationsblutung erfasst (Bleeker, et al. 1997). Insgesamt wurden pro Patient acht Ethyldiamintetraacetat (EDTA)-Monovetten à 9 ml abgenommen und innerhalb von max. vier Stunden weiterverarbeitet.

## **Isolation von PBMC aus Vollblut**

Nach der Entnahme wurde das Blut innerhalb von vier Stunden unter einer Sterilbank weiter verarbeitet. Von den acht entnommenen EDTA-Röhrchen wurden nach erneutem Schwenken je zwei Röhrchen in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Im Anschluss wurde das gleiche Volumen an 1xPBS-Puffer zugeführt und das Falcon-Tube geschwenkt. Dann wurden in vier neue Falcon-Tubes je 15 ml Lymphoprep™ (Fa. AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen) vorgelegt und im Anschluss jeweils der komplette Inhalt eines Falcon-Tubes mit Blut-Puffer-Gemisch langsam auf den Lymphoprep gegeben, ohne dass es zu einer Vermischung kam. Nun erfolgte der erste Zentrifugationsschritt bei 1800 UPM/20°C für 20 Minuten ohne Bremse, wodurch es aufgrund der Dichteunterschiede zu einer Sedimentation der PBMC als ringförmige Schicht zwischen Plasma und Erythrozyten bzw. anderen zellulären Bestandteilen kam. Als nächstes wurde der Zellring mittels einer sterilen Plastikpipette entfernt. Je zwei Zellringe wurden in ein neues 50 ml Falcon-Tube pipettiert, das Falcon-Tube mit 1xPBS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und erneut gemischt. Es folgte die zweite Zentrifugation mit 1400 UPM/4°C für 12 Minuten mit Bremse. Der nun entstandene Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von ca. 5 ml abgesaugt, das Pellet mit dem Restvolumen aufgelöst und mit dem gelösten Pellet eines

zweiten Falcon-Tubes in einem neuen Falcon-Tube gepoolt. Daraufhin wurde dieses Falcon-Tube erneut mit 1xPBS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und geschwenkt. Der dritte Zentrifugationsschritt wurde mit 1400 UPM/4°C für 12 Minuten mit Bremse durchgeführt. Anschließend wurde der komplette Überstand bis auf ca. 200 µl abgesaugt und das Pellet mit 9,8 ml 1xPBS-Puffer gelöst. Nun wurden von der entstandenen 10 ml Zellsuspension 10 µl entnommen und in einem 1,5 ml Safelock-Tube mit 10 µl Trypan-Blau gemischt. Wiederum 10 µl des Zell-Farb-Gemisches wurden in eine Neubauer-improved-Zählkammer gegeben und die PBMC unter einem Mikroskop (Olympus CKX 41, Fa. Olympus, Tokyo, Japan) ausgezählt. Die Zellzahl wurde in  $x \text{ mal } 10^6/\text{ml}$  angegeben. Danach erfolgte der letzte Zentrifugationsschritt bei 1400 UPM/4°C für 10 Minuten mit Bremse. Der entstandene Überstand wurde komplett abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Einfriermedium gelöst. Entsprechend der Zellzahl wurde folgende Menge an zusätzlichem Einfriermedium zugegeben:  $\text{Volumen Einfriermedium} = \text{Zellzahl} \text{ minus } 1 \text{ [ml]}$ . Es folgte ein erneutes Mischen und die Aliquotierung von je 1 ml mit  $10^6$  Zellen in 1,5 ml Safelock-Tubes, die bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden.

### **RNA-Extraktion aus PBMC**

Für die mRNA-Extraktion wurde das RNeasy Mini Kit # 74106 verwendet (Fa. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Die Zellaliquots wurden in einem Wasserbad (WNB 7-45, Fa. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei 37°C aufgetaut und im Anschluss in je ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Es erfolgte die langsame Zugabe von 10 ml RPMI-Medium (ohne L-Glutamin) innerhalb von 2-3 Minuten. Nach einer Zentrifugation bei 1400 UPM/20°C für 10 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die Probe auf Eis gegeben. Im nächsten Schritt wurde der Lysis-Buffer aus 1 ml RLT-Buffer und 10 µl β-Mercaptoethanol hergestellt. 600 µl des Lysis-Buffers wurden zur Resuspendierung der Zellen verwendet und das Suspensat in ein 1,5 ml Safelock-Tube überführt. Im Anschluss wurde die Probe mit dem Homogenisator Polytron PT 1600 E (Kinematica AG, Luzern, Schweiz) für eine

Minute homogenisiert. Dann wurden 600 µl 70%-Ethanol zugegeben, die Probe erneut gemischt und 700 µl der Lösung auf die im Kit enthaltene Säule gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation der Säule bei 12000 UPM/20°C für 15 Sekunden, danach wurde die restliche Probenmenge hinzugegeben und die Zentrifugation ein weiteres Mal wiederholt. Nun erfolgte die Zugabe von 700 µl RW1-Buffer und nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Parametern die Zugabe von 500 µl RPE-Buffer, an die sich wiederum ein Zentrifugationsschritt anschloss. Danach wurden 500 µl RPE-Buffer zugegeben und die Säule für 2 Minuten bei 12000 UPM/20°C zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde ein 1,5 ml Safe lock-Tube an die Säule angebracht und 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säulenmembran (ohne diese selbst zu berühren) pipettiert. Es erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 12000 UPM/20°C für eine Minute, danach wurde die Säule verworfen und das Probentube auf Eis gestellt.

### **Messung der optischen Dichte**

Die Messung der optischen Dichte zur Bestimmung der RNA-Ausbeute in ng/µl erfolgte direkt nach der Aufreinigung mittels eines Nanodrop® Spectrophotometer (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Zuerst wurde das Gerät durch Zugabe von 1 µl Aqua dest. gereinigt, dann wurde 1 µl RNase-freies Wasser zugegeben, um einen Eichwert zu erhalten. Nun konnten die Messungen der Proben erfolgen, wobei nicht nur die Konzentration in ng/µl, sondern auch die 260/280 Ratio sowie die 260/230 Ratio als Maß für die Reinheit der Proben erhoben wurden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben erneut bei -80°C gelagert.

### **Reverse Transkriptions-PCR**

Um die extrahierte RNA in cDNA umzuwandeln erfolgte die reverse Transkriptions-PCR. Für die Transkription der RNA aus humanen Blutproben wurden je 250 ng RNA benötigt. Zusätzlich zu dem entsprechenden Probenvolumen wurde in ein 0,2 ml Soft-Tube Aqua dest. hinzugefügt, so dass

ein Gesamtvolumen von 32,8 µl erreicht wurde. Des Weiteren wurden 5 µl Random Hexamers hinzugefügt, und die Probe daraufhin auf dem Heizblock TS 100 Thermoshaker (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bei 85°C für 3 Minuten inkubiert. Um den Denaturierungsprozess zu beenden wurde die Probe im Anschluss auf Eis gestellt. Nun wurden zu jeder Probe 2 µl Oligo-DT sowie 60,2 µl eines zuvor vorbereiteten Premix hinzugefügt, dessen genaue Zusammensetzung Tab. 1 zeigt:

Reagenz	Volumen
10xBuffer	10 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	22 µl
dNTP	20 µl
RNAse Inhibitor	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	6,2 µl

**Tab. 1:** Benötigte Reagenzien und ihre Einsatzmenge für die reverse Transskriptions-PCR der aus humanen PBMC extrahierten RNA.

Abkürzungen: dNTP 2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate; MgCl<sub>2</sub> Magnesiumchlorid; RNA Ribonucleid acid; PBMC Peripheral blood mononuclear cells; PCR Polymerase chain reaction.

Anschließend wurde der vollständige Reaktionsansatz mittels des GLW- L46 Vortexer gemischt und in den Advanced primus 96- PCR Cycler (Fa. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) für die reverse Transskriptionsreaktion gegeben. Tab. 2 gibt die genauen Cyclereinstellungen wieder:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Annealing	25°C	10 Minuten
Reverse Transskription	48°C	60 Minuten
Enzyminaktivierung	95°C	5 Minuten

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

Abkürzungen: PCR Polymerase chain reaction.

Die transskribierten cDNA-Proben wurden im Anschluss bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

### Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) ermöglicht die relative Quantifizierung der mRNA-Expression in „Echtzeit“. Anhand des sogenannten Ct-Werts (threshold cycle), der die Anzahl an Zyklen angibt, die nötig sind, um ein überschwelliges Fluoreszenzsignal zu erhalten, kann die Menge relativer mRNA Expression bestimmt werden. Je höher der Ct-Wert, desto niedriger die Zielgenexpression in der Probe und umgekehrt. Neben den Studienproben wurde auf jeder PCR-Platte je ein für das jeweilige Zielgen spezifisch ermittelter Calibrator mitgemessen; dieser entsprach der Kontrollprobe, die dem Mittelwert aller Kontrollprobenwerte für das interessierende Zielgen am nächsten kam. Alle Messergebnisse wurden auf den jeweiligen Calibrator bezogen, dessen Ct-Wert zwischen verschiedenen PCR-Platten maximal um den Wert 1 differieren durfte. Dies gewährleistete zudem die Vergleichbarkeit von Proben, die auf verschiedenen PCR-Platten analysiert wurden. Zusätzlich wurde bei jeder Probe neben dem Zielgen ein sogenanntes Haushaltsgen, in unserem Fall 18sRNA, gemessen, das in jeder eukaryoten Zelle konstitutiv exprimiert wird und der internen Normierung der jeweiligen Probe dient.

Untersucht wurde die relative Genexpression folgender Zytokine: IL1- $\beta$ , IL2, IL4, IL6, IL8, IL10 und TNF. Die jeweiligen Assay-IDs finden sich in Tab. 19 im Anhang. Die cDNA-Proben und die Primer wurden auf Eis aufgetaut und vor Gebrauch kurz mittels Vortexer durchmischt. Zunächst erfolgte der Ansatz der verschiedenen Premixe in 2 ml Safe lock-Caps; die genaue Zusammensetzung ist in der nachfolgenden Tab. 3 dargestellt:

Reagenzien	Zielgen	18sRNA
Aqua dest.	1,75 $\mu$ l	4,25 $\mu$ l
Taq Man Master Mix	2,0 $\mu$ l	2,0 $\mu$ l
Primer	0,25 $\mu$ l	0,25 $\mu$ l

**Tab. 3:** Benötigte Reagenzien und ihre Menge für die qRT-PCR pro Well

Abkürzungen: dest. Destilliert; RNA ribonucleid acid; qRT-PCR Quantitative real-time polymerase chain reaction.

Die Primer wie auch der Taq Man Universal Master Mix wurden von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen (siehe Anhang, Tab.19). Es wurden 96-Well-Platten verwendet. Für die Zielgenmessungen wurden die Proben und Calibratoren je als Tripletts gemessen, für die 18sRNA-Bestimmung auf Grund der Stabilität der Werte als Doublettes. Um eine Verunreinigung der Reaktionsansätze ausschließen zu können, wurde zudem je eine Leerprobe mit Aqua dest. als Tripletts bzw. Doublette gemessen. Pro Well wurden für die Zielgenmessung je 4 µl Premix, für die 18sRNA-Messung je 6,5 µl Premix vorgelegt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von je 5 µl cDNA (Zielgen) bzw. 2,5 µl cDNA (18sRNA). Die PCR-Platten wurden mit Verschlussfolien versiegelt und kurz mittels Vortexer durchmischt, bevor sie in den Cycler (StepOnePlus TM, FA Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gegeben wurden. Die folgende Tab. 4 gibt die Cyclereinstellungen für einen 9 µl Reaktionsansatz und 40 Zyklen wieder:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Annealing	50°C	2 Minuten
Denaturierung	95°C	10 Minuten
Denaturierung	95°C	15 Sekunden
Amplifikation	60°C	1 Minute

**Tab. 4:** Cyclereinstellungen für die qRT-PCR

Abkürzungen: qRT-PCR Quantitative real-time polymerase chain reaction.

Mittels der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wurde schließlich die relative mRNA-Expression des Zielgens bestimmt (Fleige, et al. 2006). Sie ermöglicht die Angabe, um wieviel höher bzw. niedriger die Zielgenexpression einer Probe im Vergleich zu einem Calibrator ist. Die Berechnung lässt sich wie folgt darstellen:

$$\Delta Ct (\text{Probe}) = Ct\text{-Wert (Zielgen)} - Ct\text{-Wert (Endogene Kontrolle = 18sRNA)}$$

$$\Delta Ct (\text{Calibrator}) = Ct\text{-Wert (Zielgen)} - Ct\text{-Wert (Endogene Kontrolle = 18sRNA)}$$

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



Hohe  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte entsprechen einer hohen Zielgenexpression einer Probe im Vergleich zu einem Calibrator.

## Messung pro-inflammatorischer Zytokine nach Zellstimulation mittels LPS

### LPS-Stimulation der PBMC

Um die Zytokinproduktion der PBMC in vitro anzuregen, erfolgte die Stimulation mittels LPS. LPS, ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, regt die Zytokinproduktion von u.a. IL6 bei Lymphozyten, aber auch anderen Immunzellen an (Rietschel, et al. 1998). Als erster Schritt erfolgte die Herstellung einer Antibiotika-haltigen RPMI-Medium-Lösung nach folgendem Schema (Tab. 5):

Substanzen
RPMI-1640 mit 25 mM HEPES und 2 mM L-Glutamat
10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
1mM Natrium Pyruvat
Penicillin/ Strep 100 U/ml

**Tab. 5:** Zusammensetzung der RPMI-Medium-Lösung

Abkürzungen: HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; RPMI Roswell Park Memorial Institute.

Im Anschluss wurde die Lösung steril gefiltert und bei 10°C gelagert. Im zweiten Schritt wurde die LPS-Gebrauchslösung hergestellt. Hierfür wurden erst 998  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium-Lösung und 2  $\mu\text{l}$  LPS 100% zu einer Vorverdünnung angesetzt, bevor aus 7250  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium-Lösung und 250  $\mu\text{l}$  LPS-Vorverdünnung die LPS-Gebrauchslösung hergestellt wurde. Dann wurden in 15 ml Falcon-Tubes je Probe 3 ml RPMI-Medium vorgelegt, bevor die Zellen nach einem kurzen Auftauen im Wasserbad bei 37°C in die Falcon-Tubes überführt wurden. Es folgte ein erster Zentrifugationsschritt mit 1000 UPM/20°C ohne Bremse für fünf Minuten. Dann wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet mittels 1 ml RPMI-Medium gelöst. Für die Zellzählung wurde je 10  $\mu\text{l}$  Probe mit 10  $\mu\text{l}$  Trypan-blau in einem Tube gemischt und wiederum 10  $\mu\text{l}$  des Zell-

Farbgemisches in eine Neubauer-improved-Zählkammer gegeben. Danach erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 1000 UPM/20°C ohne Bremse für fünf Minuten. Erneut wurde der entstandene Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml RPMI-Medium-Lösung gelöst. Anhand der erfassten Zellzahl wurde die Menge an Zelllösung bestimmt, die einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$ /ml entsprach. Dieses Zelllösungs-Volumen wurde in Zellkulturschalen pipettiert und mit RPMI-Medium-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1275 µl gebracht. Es folgte der erste Inkubationsschritt im Brutschrank für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Im Anschluss wurden 225 µl LPS-Gebrauchslösung je Probe hinzugegeben und die Zellen für weitere 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine erneute Zellzählung in oben aufgeführter Weise durchgeführt, um das Ausmaß an Zellverlust zu erfassen. Die Proben wurden dann in je 1,5 ml Tubes überführt und bei 1000 UPM/20°C für 15 Minuten zentrifugiert. Von dem gewonnenen Überstand wurden je 400 µl in 1,5 ml Tubes aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

### **Bestimmung von Zytokinproteinen mittels Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA)**

Das Prinzip des ELISA beruht auf einer Enzym-gekoppelten Immunreaktion; das nachzuweisende Protein wird durch einen sogenannten coat antibody an den Boden einer 96-Well-Mikrotiter-Platte gebunden und kann photometrisch quantifiziert werden. Zur Bestimmung der sezernierten IL6-Protein-Konzentration nach LPS-Stimulation der PBMC wurde das Quantikine® ELISA Human IL-6-Immunoassay-Kit der Fa. Biotechne (minimal detectable concentration MDC 0,7pg/ml; Minneapolis, USA), für die IL8-Protein-Konzentration das BioSource™ IL8-ELISA-Kit der Fa. Thermo Fisher Scientific Inc. (MDC 0,7pg/ml; Waltham, USA) und für die Bestimmung der TNF-Protein-Konzentration das Invitrogen™ Human TNF-α-Kit von Thermo Fisher Scientific Inc. (MDC 1,7pg/ml; Waltham, USA) verwendet. Zu Beginn erfolgte jeweils die Herstellung der Waschlösungen, der Substratlösungen sowie der Standard-Verdünnungsreihen aus den Kit-zugehörigen Grundlösungen sowie Aqua dest.

nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurden die Reaktionsplatten zusammengesetzt, wobei die Studienproben bzw. Standardproben jeweils als Doublettes gemessen wurden, der Proben- bzw. Standardeinsatz pro Well lag bei 100 µl. Nach einem ersten Inkubationsschritt und anschließendem Waschschrift wurden die jeweiligen konjugierten Antikörper hinzugegeben und ein weiterer Inkubationsschritt angeschlossen. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift, dann wurden die Chromogen-Lösungen hinzugefügt und eine Inkubation in Dunkelheit durchgeführt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Hinzugabe der Stop-Lösungen beendet; innerhalb von 30 Minuten erfolgte nun eine photometrische Messung bei 450 nm bzw. 540 nm mittels des Microplate Readers Titertek Multiskan Plus (Fa. Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Deutschland).

### **Statistische Auswertung der Daten**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels IBM SPSS 21 Software (Fa. IBM, Ehningen, Deutschland). Aufgrund der fehlenden Normalverteilung der qRT-PCR-Daten bzw. der ELISA-Daten wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zur Analyse herangezogen. Die Korrelationen der PCR-/Fragebogen- bzw. Patientendaten erfolgten nach Spearman-Rank. Als signifikant galten Ergebnisse mit  $p < 0,05$ . Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen und Fragebögen bzw. PNP-Scores sind als Box-Plots dargestellt, die den Median, Maximum und Minimum, sowie den Bereich zwischen 25. und 75. Perzentile wiedergeben.

## **III. Ergebnisse**

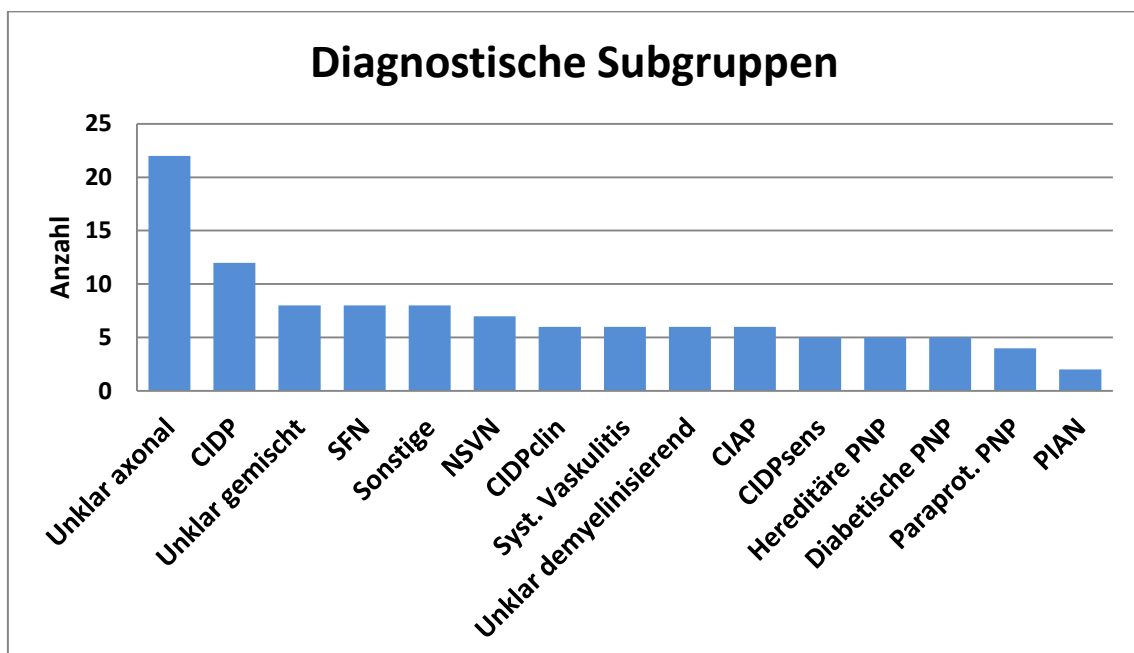
### **Klinische Daten**

Insgesamt konnten 111 Patienten mit PNP unterschiedlicher Genese in die Studie eingeschlossen werden; das mediane Alter betrug 63 Jahre (23 bis 84 Jahre). Der Großteil der rekrutierten Patienten ( $n=81$ , 73%) waren Männer

(medianes Alter 62 Jahre; 23 bis 84 Jahre), die Anzahl an Patientinnen betrug n=30 (27%; medianes Alter 66 Jahre; 31 bis 81 Jahre). Von 97 Patienten konnten Blutproben für die Zytokinbestimmungen gewonnen werden; diese Gruppe bestand aus 71 Männern (73%; medianes Alter 62; 23 bis 84 Jahre) und 26 Frauen (27%; medianes Alter 67 Jahre; 31 bis 81 Jahre). In beiden Gruppen lag die mediane Erkrankungsdauer bis zum Vorstellungszeitpunkt an unserer Klinik bei drei Jahren (0,06 bis 50 Jahre). Für den PBMC-Stimulationsversuch (s. unten) wurden die Proben von 47 der rekrutierten Patienten (34 Männer und 13 Frauen; medianes Alter 61 Jahre bzw. 66 Jahre) verwendet.

### Diagnostische Subgruppen

Nach Abschluss der Diagnostik konnte in 75/111 Fällen (68%) die Ätiologie der PNP geklärt werden, in 36/111 Fällen (32%) blieb die Ursache unklar. Abb. 1 gibt die unterschiedlichen diagnostischen Subgruppen mit den jeweiligen Patientenzahlen wieder.



**Abb. 1: Diagnosesubgruppen der Studienpopulation:**

Das Balkendiagramm zeigt die nach Anzahl geordneten Diagnosesubgruppen.

Abkürzungen: CIAP Chronische idiopathische axonale PNP, CIDP Chronische inflammatorische demyelinisierende PNP, CIDPclin Patienten mit klinisch typischer Präsentation für eine CIDP ohne die INCAT- Kriterien zu erfüllen, CIDPsens Patienten mit rein sensibler Symptomatik und ansonsten klinisch typischer Präsentation einer CIDP ohne die INCAT- Kriterien zu erfüllen, MADSAM Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy, NSVN Nicht-systemische vaskulitische Neuropathie, Paraprot. paraproteinämisch, PIAN Progressive idiopathische axonale PNP, PNP Polyneuropathie; SFN Small fiber Neuropathie, Syst. Vaskulitis Systemische Vaskulitis.

Die Subgruppe „Sonstige“ setzte sich wie folgt zusammen (alphabetisch geordnet; jeweils n=1):

- Adrenomyelopathie
- Amyloidneuropathie bei B-Zell-Lymphom
- Amyloidneuropathie bei familiärer Amyloidose (TTR-Mutation)
- PNP bei Niereninsuffizienz
- PNP im Rahmen eines Syndroms mit heterozygoter Mutation im OPA1-Gen
- Sensible Neuropathie bei Ganglionitis
- Toxisch-bedingte, sensible Neuropathie nach Sulfasalazin-Exposition

### **Entzündliche PNP**

Zu den entzündlichen PNP wurden die Subgruppen CIDP, CIDPclin, CIDPsens, Ganglionitis, MADSAM, paraproteinämische PNP, PIAN und Vaskulitis sowie einige PNP unklarer Genese (n=13), die entzündliche Veränderungen in der Suralisbiopsie aufwiesen, gezählt. Somit bestand in 57/111 (51%) Fällen eine entzündliche PNP, wohingegen in 43/111 (39%) Fällen eine nicht-entzündliche Genese vorlag. Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses hatten sechs Patienten (5%) bereits eine immunsuppressive bzw. immunmodulatorische Therapie (Azathioprin [n=1], Cyclophosphamid [n=1], Intravenöse Immunglobuline (IVIg) [n=2], Methotrexat [n=1], Mycophenolatmofetil [n=1], orale Steroide [n=5]) erhalten.

## **Neuropathischer Schmerz**

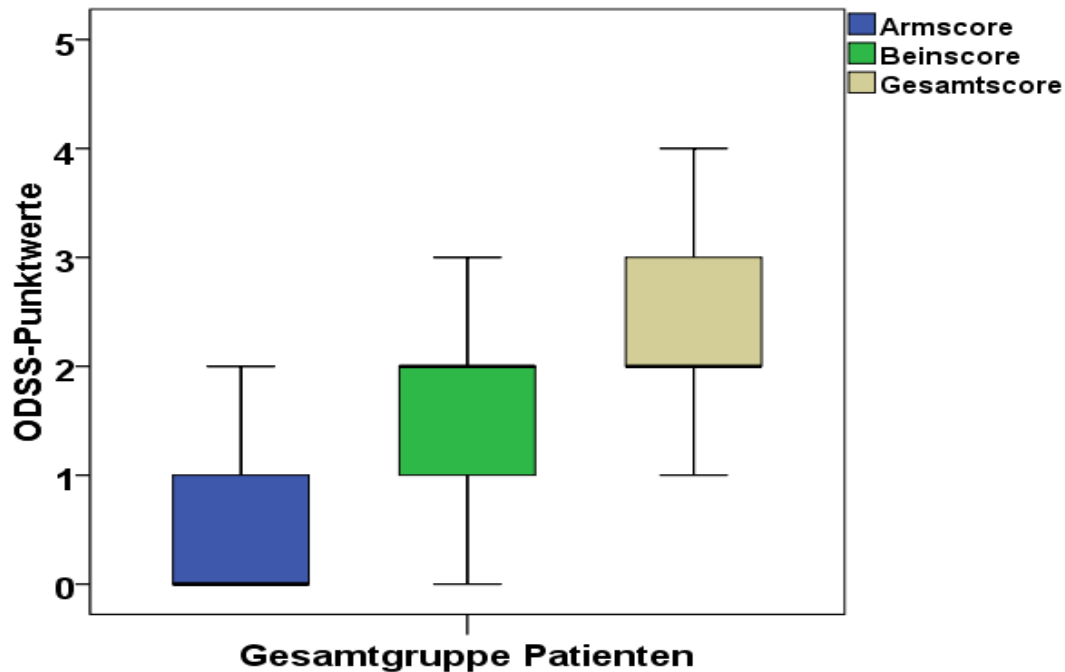
Bei 74/111 Patienten (67%) lag eine schmerzhafte PNP vor. 47 (64%) der Patienten mit schmerzhafter PNP nahmen eine analgetische Medikation ein bzw. wendeten eine solche an (Amitriptylin [n=11], Carbamazepin [n=3], Duloxetin [n=6], Gabapentin [n=20], Lokalanästhetika [n=2], NSAR [n=22], Opiode [n=13], Pregabalin [n=26], Venlafaxin [n=1], Verapamil [n=1]). Der Anteil an Patienten mit schmerzhafter PNP lag bei den entzündlichen Neuropathien bei n=34 (60%), bei den nicht-entzündlichen Neuropathien bei n=34 (79%). Frauen (n=20) und Männer (n=54) waren in je 67% der Fälle von Schmerzen betroffen.

## **Untersuchungsscores und Fragebögen**

Die Ergebnisse aller Untersuchungsscores und Fragebögen finden sich in Tab. 10-13 im Anhang.

## **Overall Disability Sum Score (ODSS)**

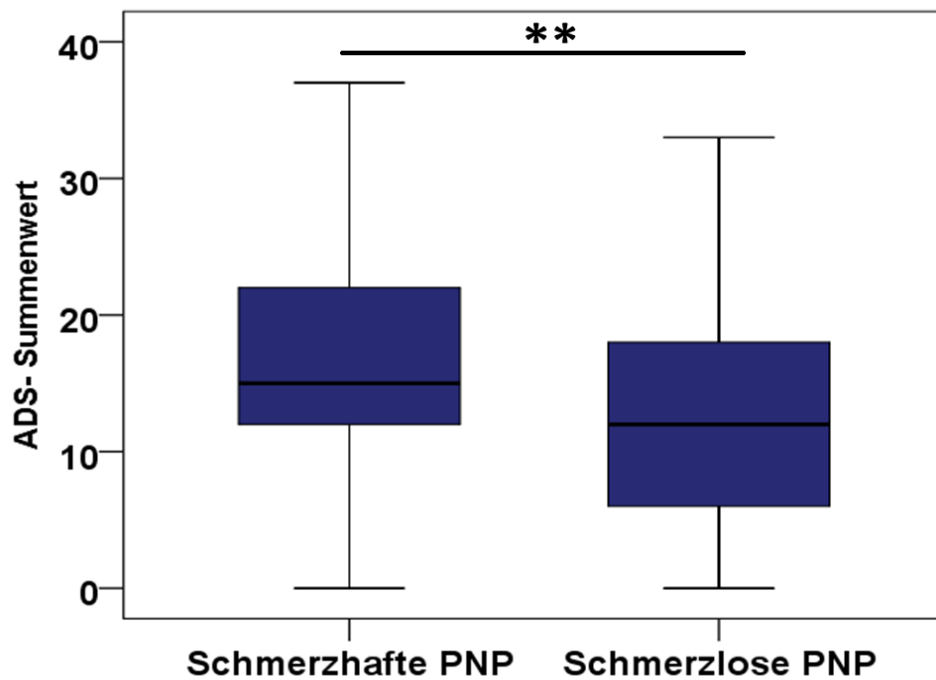
Die Beinfunktion aller Patienten war eingeschränkter als die Armfunktion (Median Beinscore 2 vs. Median Armscore 0; Spanne 0-7 bzw. 0-4); der Median des Gesamtscores lag bei 2 (Spanne 0-11) (Abb.2). Unterschiede im Vergleich der Subgruppen entzündliche PNP vs. nicht-entzündliche PNP, schmerzhafte PNP vs. schmerzlose PNP oder verschiedener diagnostischer Subgruppen (CIDP vs. Vaskulitis, SFN vs. CIDP, Vaskulitis vs. CIAP etc.) ergaben sich nicht.



**Abb. 2 ODSS Ergebnisse:** Übersicht der ODSS-Punktwerte der gesamten PNP-Patientengruppe.  
Abkürzungen: ODSS Overall Disability Sum Score; PNP Polyneuropathie.

### Depressive Symptome - ADS

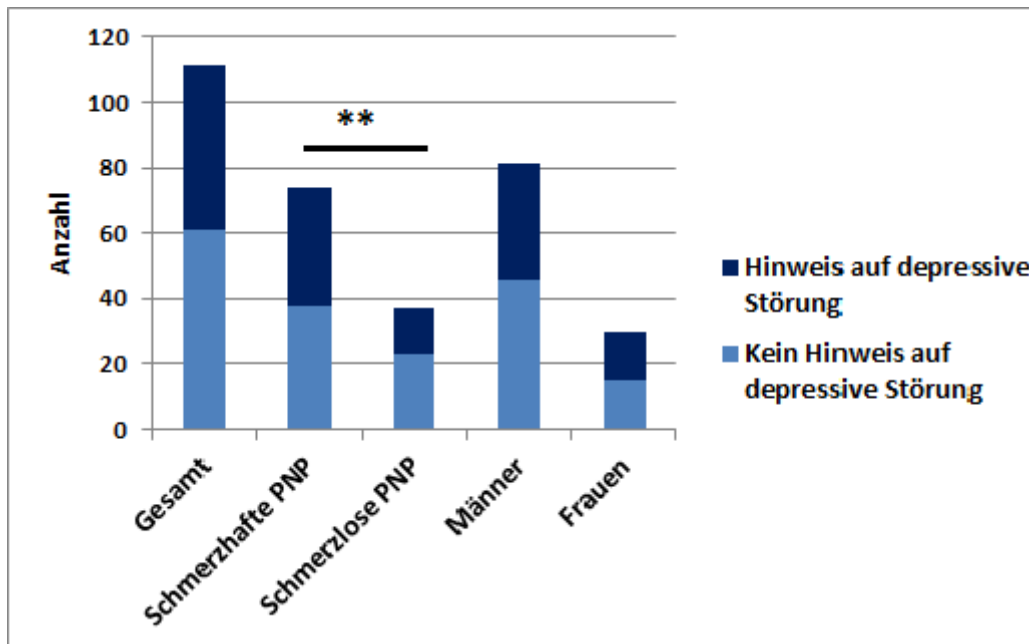
Klinisch relevante und weiter abklärungsbedürftige depressive Symptome konnten bei 50/111 Patienten (45%) mittels der ADS nachgewiesen werden. Der Median der gesamten Patientengruppe lag bei 15 Punkten (Minimum 0 Punkte, Maximum 40 Punkte), der Median der von depressiven Symptomen betroffenen Patienten bei 21 Punkten (Minimum 16 Punkte, Maximum 40 Punkte). In der Gruppe der Patienten mit schmerzhafter PNP lag in 36 Fällen (49%) ein auffälliger Wert vor (Median 15 Punkte, Minimum 0 Punkte, Maximum 40 Punkte), wohingegen in der Gruppe der Patienten mit schmerzloser PNP lediglich in 14 Fällen (38%) der Grenzwert 16 Punkte erreicht bzw. überschritten wurde (Median 12 Punkte, Minimum 0 Punkte, Maximum 33 Punkte). Somit fand sich in der Gruppe der Patienten mit schmerzhafter PNP ein deutlich höherer Anteil an klinisch relevanten depressiven Symptomen als bei den Patienten mit schmerzloser PNP (Abb. 3;  $p < 0,01$ ).



**Abb. 3 ADS-Summenwerte:** Die Boxplots zeigen höhere ADS-Summenwerte bei den Patienten mit schmerzhafter PNP im Vergleich zu den Patienten mit schmerzloser PNP (\*\* $p < 0,01$ ).  
 Abkürzungen: ADS Allgemeine Depressionsskala, PNP Polyneuropathie.

Bei der Gruppe der Patientinnen lag in 15 Fällen (50%) ein erhöhter Punktwert vor (Median 16 Punkte, Minimum 0 Punkte, Maximum 40 Punkte), bei der Gruppe der Patienten (Median 15 Punkte, Minimum 0 Punkte, Maximum 40 Punkte) dagegen nur in 35 Fällen (43%; Abb. 4).





**Abb. 4: ADS-Ergebnisse Gesamtgruppe/Subgruppen:**

ADS-Ergebnisse mit und ohne Hinweis auf relevante depressive Symptome bei der gesamten Patientengruppe bzw. nach Unterteilung hinsichtlich Schmerzhaftigkeit der PNP (\*\* $p < 0,01$ ) und Geschlecht.

Abkürzungen: ADS Allgemeine Depressionsskala, PNP Polyneuropathie.

### Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI)

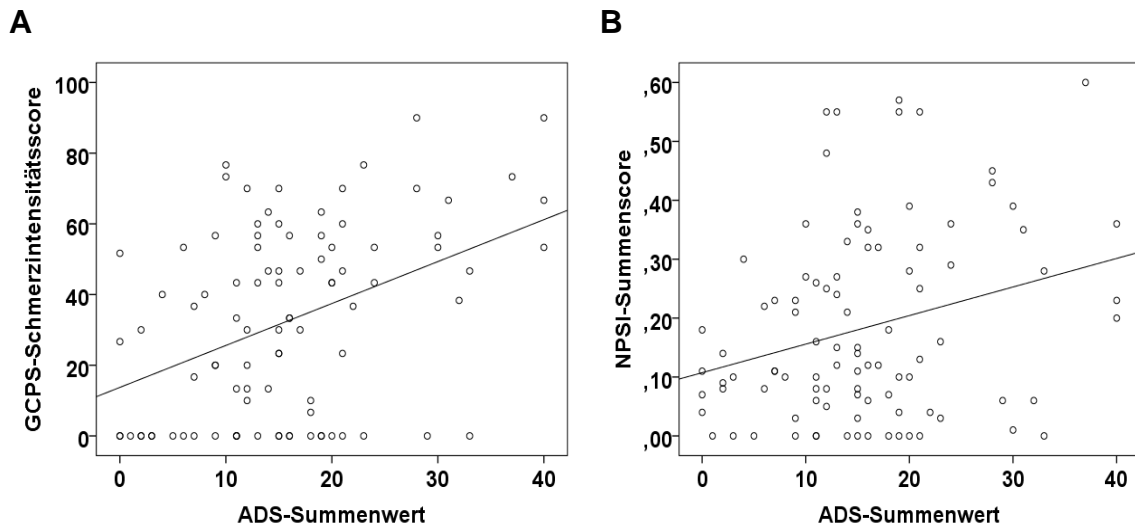
Die Mediane aller Antworten auf die NPSI Fragen (attackenartig-auftretende Schmerzen, Brennen, Druck, evozierte Schmerzen, Par-/Dysästhesien) sowie des NPSI-Summscores lagen bei Patienten mit schmerzhafter PNP deutlich über denen der Patienten ohne Schmerzen ( $p < 0,001$ ; Daten nicht gezeigt). Je nach diagnostischer Subgruppe ergaben sich unterschiedliche Verteilungen der einzelnen Schmerzqualitäten, wobei sich lediglich im Vergleich der CIDP und SFN deutliche Unterschiede fanden. Hierbei lag bei der SFN ein höherer NPSI-Summscore ( $p < 0,05$ ) sowie ein höherer Score für „Brennschmerz“ ( $p < 0,01$ ) vor, d.h. Patienten mit SFN waren stärker von schmerzhaften Missempfindungen, insbesondere Brennschmerz, betroffen als CIDP-Patienten.

### **Graded Chronic Pain Scale (GCPS)**

Die aktuelle Schmerzintensität aller Patienten mit schmerzhaften Neuropathien war mit einem Median von 3/10 NRS (Spanne 0-10) moderat ausgeprägt. Für die durchschnittliche Schmerzintensität ergab sich ein Median von 5/10 NRS (Spanne 1-10), für die maximale Schmerzintensität ein Median von 7/10 NRS (Minimum 0, Maximum 10). Insgesamt lag ein medianer Schmerzintensitätsscore von 51 (Minimum 13,3, Maximum 100) vor. Der Median der Anzahl von Tagen ohne übliche Aktivität innerhalb der letzten vier Wochen aufgrund von Schmerzen lag bei 3, ebenso die Einschränkung bei Alltagsaktivitäten durch Schmerzen (Minimum 0, Maximum 10). Stärker eingeschränkt waren die Freizeitaktivitäten (Median 5, Minimum 0, Maximum 10) sowie die Arbeitsfähigkeit (Median 4, Minimum 0, Maximum 10). Für den Behinderungsscore aufgrund von Schmerzen ergab sich ein Median von 1 (Minimum 0, Maximum 6).

### **Korrelationen der Fragebögen bzw. Scores**

Seitens der Fragebögen bzw. PNP-Scores konnten positive Korrelationen zwischen dem ADS-Punktwert und dreier GCPS-Items (aktueller, durchschnittlicher, maximaler Schmerz) bzw. des GCPS-Behinderungswertes und der Schmerzintensität (\*\* $p < 0,01$ ) sowie des NPSI-Summenscores (\* $p < 0,05$ ) und dreier weiterer NPSI-Items (Brennschmerz, attackenartiger Schmerz, durch Druck provoziertes Schmerz; \*\* $p < 0,01$ ) nachgewiesen werden. Je höher der Schmerz bzw. die durch Schmerzen bedingte Behinderung, umso höher war der ADS-Punktwert (Abb. 12).



**Abb.12: Korrelation ADS-Summenwert und GCPS-Schmerzintensitätsscore (A) bzw. des NPSI-Summenscore (B):** Positive Korrelation des ADS-Summenwerts und des GCPS-Schmerzintensitätsscores (\*\* $p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient 0,366) (A). Positive Korrelation des ADS-Summenwerts und des NPSI-Summenscores (\* $p < 0,05$ , Korrelationskoeffizient 0,224) (B).

Abkürzungen: ADS Allgemeine Depressionsskala; GCPS Graded chronic pain scale; NPSI Neuropathic pain symptom inventory.

### OGTT und diabetische Stoffwechselstörung

Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses war ein Diabetes mellitus Typ I bei einem Patienten (1%) bekannt, ein Diabetes mellitus Typ II bei sechs Patienten (5%). Ein OGTT wurde bei 81 Patienten (73%) im Rahmen der diagnostischen Abklärung veranlasst, hierbei konnte bei zehn Patienten (12,3%) ein Diabetes mellitus Typ II sowie bei 14 Patienten (17,3%) eine gestörte Glukosetoleranz (Nüchtern-Blutzucker 100-110 mg/dl oder 2-Stunden-Wert 140-200 mg/dl) diagnostiziert werden. Sieben Patienten (6%) hatten diese Testung bereits auswärts mit unauffälligem Ergebnis erhalten. Von 16 Patienten (14%) lagen keine Messwerte vor. Insgesamt hatten somit 17 Patienten (15%) einen Diabetes mellitus sowie 14 Patienten (13%) eine gestörte Glukosetoleranz; ein normaler Glukosestoffwechsel konnte bei 64 (58%) Patienten festgestellt werden.

### **Elektrophysiologische Messergebnisse**

Elektrophysiologisch lag in 41 Fällen (37%) eine demyelinisierende PNP vor, in 54 Fällen (49%) eine axonale PNP; bei acht Patienten (7%) mit unklarer Genese der Neuropathie wurde elektrophysiologisch ein Mischbild festgestellt. Normwertige Neurographien zeigten sich bei allen Patienten mit SFN (n=8; 7%).

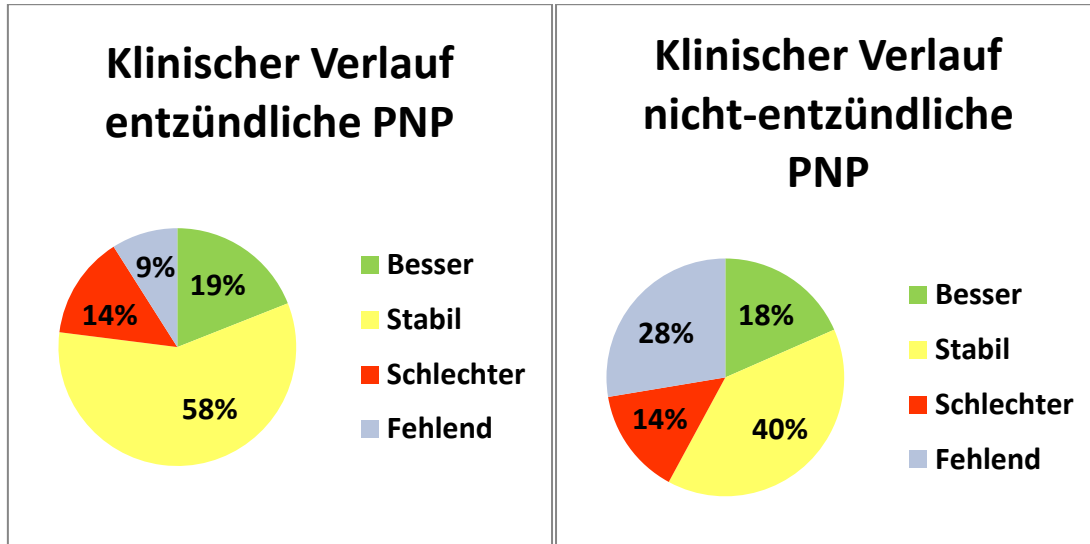
### **Therapien der PNP**

Nach Abschluss der Diagnostik wurde in 35 Fällen (32%) eine symptomatische Therapie begonnen; in 20 Fällen (18%) erhielten die Patienten eine immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Therapie und in 37 Fällen (33%) eine immunmodulatorische bzw. immunsuppressive sowie symptomatische Therapie. 19 Patienten (17%) erhielten keine weitere medikamentöse Therapie. Bei 43 von 57 Patienten (75%) in der Gruppe der entzündlichen Neuropathien wurde nach der diagnostischen Abklärung eine immunmodulatorische Therapie durchgeführt (Steroide [n=36], Azathioprin [n=20], IVIG [n=7], Ciclosporin A [n=4], Cyclophosphamid [n=3], Mycophenolatmofetil [n=1], Rituximab [n=1], Plasmapherese [n=1]). Die am häufigsten eingesetzten Analgetika waren Pregabalin (n=33), Gabapentin (n=15) und Amitriptylin (n=11).

### **Klinischer Verlauf**

Hinsichtlich des klinischen Verlaufs zeigte sich bei 57 Patienten (52%) ein stabiler Zustand, bei 18 Patienten (16%) eine Verbesserung und bei 17 Patienten (15%) eine Verschlechterung der PNP im Vergleich zum Zeitpunkt des Studieneintrittes. Von 19 Patienten (17%) konnten keine Verlaufsdaten erhoben werden. In der Gruppe der Patienten mit entzündlichen Neuropathien kam es bei 11 Patienten (19%) zu einer Verbesserung der PNP, bei 33 Patienten (58%) war der Befund stabil und bei 8 Patienten (14%) kam es zu einer Verschlechterung der PNP; in 5 Fällen (9%) konnten keine Verlaufsdaten erhoben werden. Bei den nicht-entzündlichen Neuropathien lag in acht Fällen

(19%) eine Verbesserung der PNP, in 17 Fällen (40%) ein stabiler Zustand und in 6 Fällen (14%) eine Verschlechterung der PNP vor; in 12 Fällen (28%) konnten wiederum keine Verlaufsdaten erhoben werden (Abb. 6).



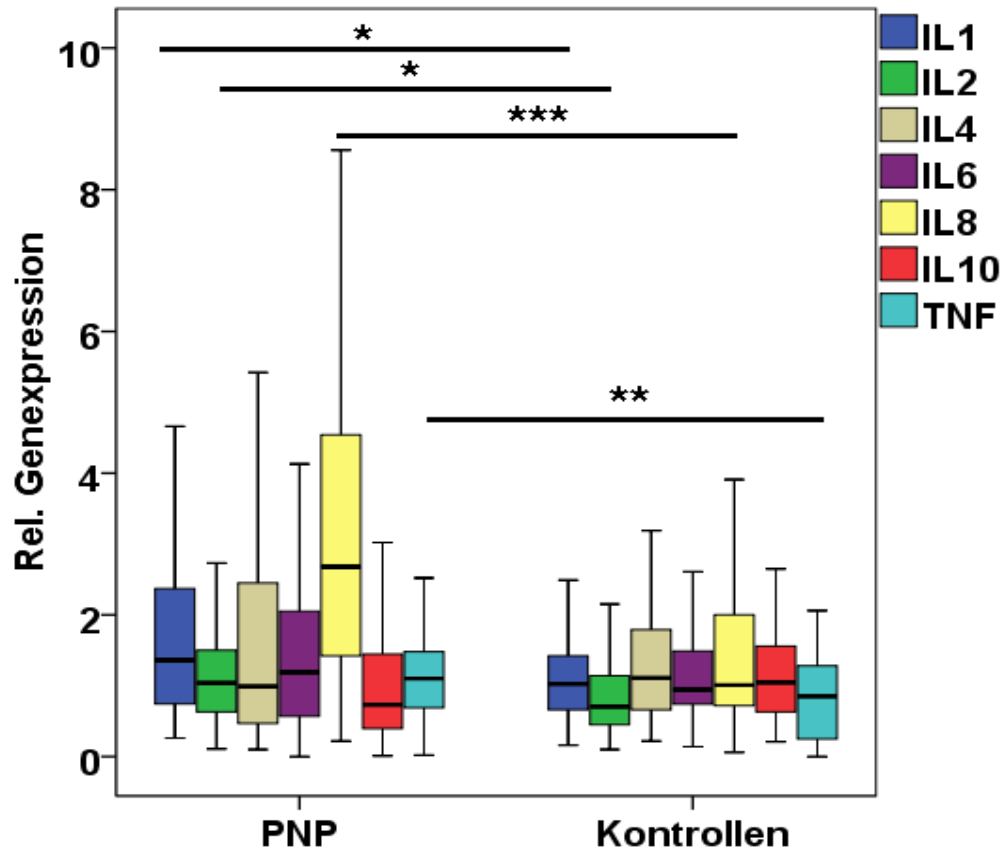
**Abb. 6: Übersicht klinischer Verlauf entzündliche vs. nicht-entzündliche PNP:**

Die Tortendiagramme geben die prozentuale Verteilung des klinischen Verlaufes bei den Subgruppen entzündliche bzw. nicht-entzündliche PNP wieder.

Abkürzungen: PNP Polyneuropathie.

### Zytokingenexpression in PBMC

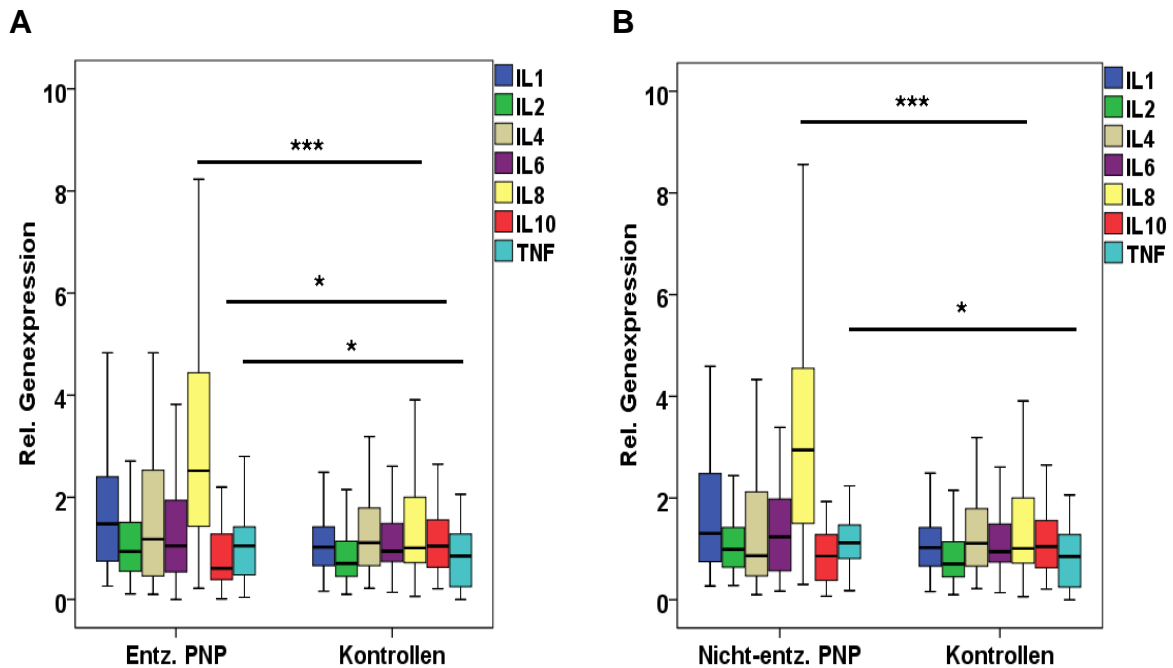
Patienten mit PNP wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollen ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil auf: die relative Genexpression der PBMC für IL1 ( $p < 0,05$ ), IL2 ( $p < 0,05$ ), IL8 ( $p < 0,001$ ) und TNF ( $p < 0,01$ ) war bei Patienten höher als bei gesunden Kontrollen (Abb. 7).



**Abb. 7: Zytokin-Genexpression in PBMC in der Gesamtgruppe:** Höhere Genexpression von IL1, IL2 (\* $p < 0,05$ ), TNF (\*\* $p < 0,01$ ) und IL8 (\*\* $p < 0,001$ ) bei Patienten mit PNP im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Abkürzungen: IL Interleukin, PBMC Peripheral blood mononuclear cells; PNP Polyneuropathie; Rel. Relative, TNF Tumor-Nekrosefaktor alpha.

Bei den Patienten mit entzündlichen Neuropathien war die relative Genexpression von IL8 ( $p < 0,001$ ) und TNF ( $p < 0,05$ ) höher als bei den gesunden Kontrollen, wohingegen die relative Genexpression von IL10 bei den Patienten reduziert war ( $p < 0,05$ ) (Abb. 8 A). Im Fall der nicht-entzündlichen Neuropathien fand sich eine höhere Genexpression von IL8 ( $p < 0,001$ ) und TNF ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Abb. 8 B); zwischen den beiden PNP-Gruppen konnte kein Unterschied nachgewiesen werden.

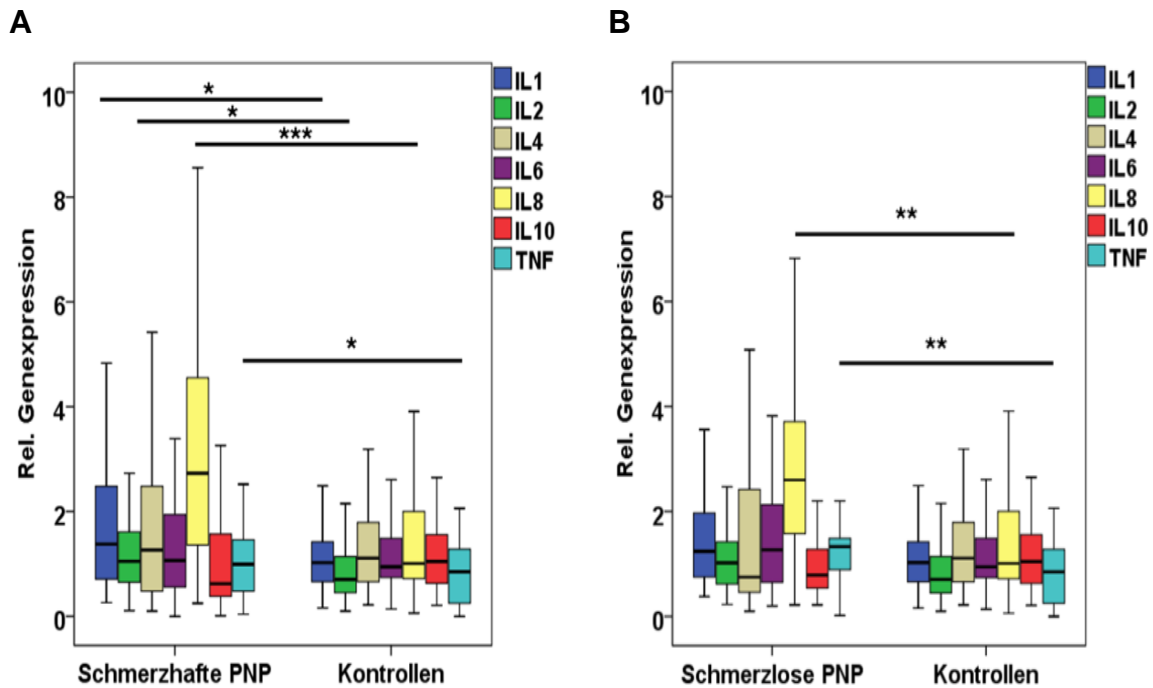


**Abb. 8: Zytokin-Genexpression in PBMC bei entzündlicher PNP (A) bzw. nicht-entzündlicher PNP (B) vs. Kontrollen:** Höhere Genexpression von TNF ( $*p < 0,05$ ), IL8 ( $***p < 0,001$ ) sowie niedrigere Genexpression von IL10 ( $*p < 0,05$ ) im Falle der entzündlichen PNP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Höhere Genexpression von TNF ( $*p < 0,05$ ) und IL8 ( $***p < 0,001$ ) im Falle der nicht-entzündlichen Neuropathien im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Abkürzungen: Entz. Entzündlich, IL Interleukin, PBMC Peripheral blood mononuclear cells; PNP Polyneuropathie, Rel. Relative, TNF Tumor-Nekrosefaktor alpha.

Hinsichtlich der Zytokin-Genexpression bei Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP ergab sich in der Gesamtgruppe kein Unterschied.

Allerdings wies die Gruppe der Patienten mit schmerzhafter PNP ein deutlicheres pro-inflammatorisches Profil im Vergleich zu Gesunden auf: neben IL8 ( $p < 0,001$ ) und TNF ( $p < 0,05$ ) waren auch IL1 ( $p < 0,05$ ) und IL2 ( $p < 0,05$ ) höher exprimiert (Abb. 9 A). In der Gruppe der Patienten mit schmerzlosen PNP fand sich im Vergleich mit gesunden Kontrollen eine höhere Genexpression von IL8 und TNF (jeweils  $p < 0,01$ ; Abb. 9 B).



**Abb. 9: Zytokin-Genexpression in PBMC bei schmerzhafter PNP (A) bzw. schmerzloser PNP (B) vs. Kontrollen:** Höhere Genexpression von IL1, IL2, TNF (\* $p < 0,05$ ) sowie IL8 (\*\* $p < 0,001$ ) im Falle der schmerzhaften PNP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Höhere Genexpression von IL8 und TNF (\*\* $p < 0,01$ ) im Falle der schmerzlosen PNP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Abkürzungen: IL Interleukin, PBMC Peripheral blood mononuclear cells; PNP Polyneuropathie, Rel. Relative, TNF Tumor-Nekrosefaktor alpha.

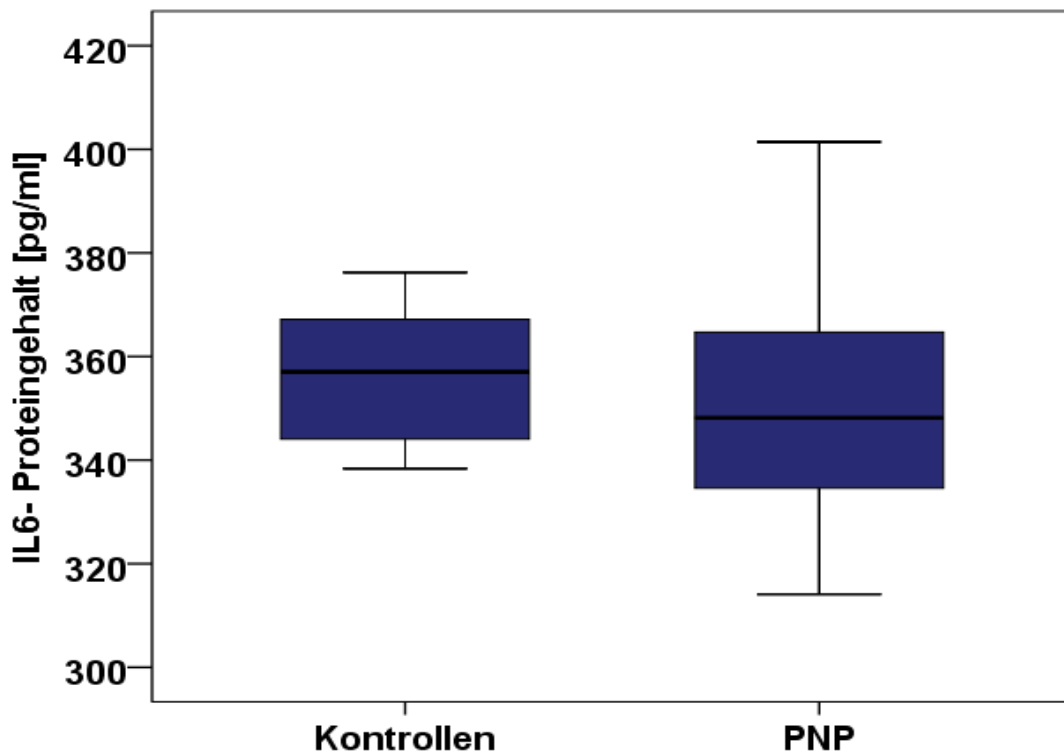
Auch in weiteren Subgruppenvergleichen (beispielsweise axonale Neuropathie vs. demyelinisierende Neuropathie oder CIDP vs. Vaskulitis) konnten keine Unterschiede in der Zytokin-Genexpression zwischen den jeweiligen PNP-Patienten festgestellt werden; zudem war kein Zytokin in nur einer Subgruppe höher bzw. niedriger im Vergleich zu Gesunden exprimiert (Daten nicht gezeigt).

### PBMC-Stimulationsversuch

Für den PBMC-Stimulationsversuch wurden die Proben von 47 der rekrutierten Patienten (34 Männer und 13 Frauen; medianes Alter 61 Jahre bzw. 66 Jahre) sowie von zwölf der gesunden Kontrollen (acht Männern und vier Frauen;



medianes Alter 66 Jahre bzw. 65 Jahre) verwendet. Hinsichtlich der untersuchten Zytokine IL6, IL8 und TNF war die Sekretion nach Zellstimulation mittels LPS zwischen Patienten und gesunden Kontrollen annähernd gleich (beispielhaft für IL6 in Abb. 10 gezeigt). Es fand sich auch kein Unterschied in der Proteinexpression von Patienten mit schmerzhaften und schmerzlosen bzw. entzündlichen und nicht-entzündlichen Neuropathien (Daten nicht gezeigt).



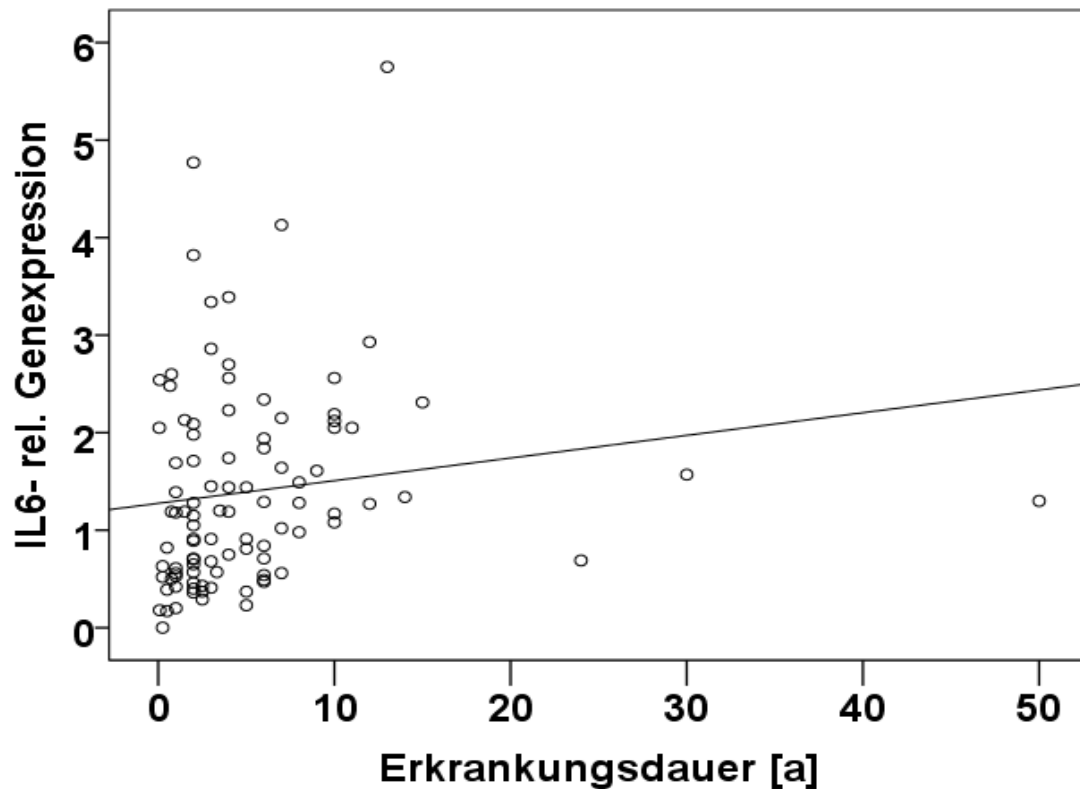
**Abb. 10: PBMC-Stimulationsversuch: IL6-Proteinkonzentration nach LPS-Stimulation.**

Abkürzungen: IL6 Interleukin 6; LPS Lipopolysaccharid; PBMC Peripheral blood mononuclear cells; PNP Polyneuropathie.

## Korrelationsanalysen

### Korrelation der IL6-Genexpression und der Krankheitsdauer

Eine positive Korrelation fand sich zwischen der Erkrankungsdauer und der Genexpression von IL6 bei Betrachtung der gesamten PNP Patientengruppe ( $p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient 0,317) (Abb. 11).



**Abb. 11: Korrelation Genexpression IL6 und Erkrankungsdauer:** Positive Korrelation von IL6-Genexpression und Erkrankungsdauer bei den PNP-Patienten (\*\* $p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient 0,317).

Abkürzungen: IL6 Interleukin 6; PNP Polyneuropathie.

#### IV. Diskussion

In unserer Studie untersuchten wir die Zytokingenexpression in PBMC von Patienten mit schmerzhaften und schmerzlosen PNP unterschiedlicher Ätiologie sowie gesunden Kontrollen, um einen möglichen Einsatz als systemischen Biomarker zu evaluieren. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass bei Patienten mit PNP ein pro-inflammatorisches systemisches Zytokinprofil im Vergleich zu Gesunden vorliegt und bei den verschiedenen PNP-Subgruppen unterschiedliche pro-inflammatorische Zytokine beteiligt sind. Sowohl Patienten mit als auch ohne Schmerz wiesen ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil im Vergleich zu Gesunden auf. Es fand sich keine erniedrigte Stimulusschwelle der Zytokin-produzierenden PBMC von PNP-Patienten als mögliche Erklärung für die höhere Zytokingenexpression im Vergleich zu Gesunden. Zudem lagen bei

Patienten mit schmerzhafter Neuropathie häufiger Hinweise auf eine klinisch-relevante depressive Störung vor, wobei das Schmerzausmaß bzw. die schmerzbedingten Einschränkungen mit dem Ausmaß an depressiven Denkmustern positiv korrelieren.

### **Korrelation der Score- und Fragebogendaten**

Der Anteil an Patienten mit Hinweisen auf eine klinisch-relevante depressive Störung auf der ADS war im Falle der schmerzhaften Neuropathien erhöht. Passend hierzu fand sich eine positive Korrelation zwischen ADS-Punktwert und dreier GCPS-Items (aktueller, durchschnittlicher, maximaler Schmerz), des GCPS-Behinderungswertes, der Schmerzintensität sowie des NPSI-Summscores und dreier weiterer NPSI-Items (Brennschmerz, attackenartiger Schmerz, durch Druck provoziertes Schmerz). Dies steht im Einklang mit bisherigen Daten, die eine erhöhte Prävalenz von affektiven Störungen bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen bestätigen konnten (Radat, et al. 2013).

### **Systemische Zytokinexpression**

Verglichen mit den gesunden Kontrollen zeigte sich bei den PNP-Patienten ein deutlich pro-inflammatorisches Zytokinprofil mit höherer Genexpression von IL1, IL2, IL8 und TNF. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen zahlreicher Studien, die Hinweise auf pro-inflammatorische Veränderungen der systemischen und lokalen Zytokinexpression bei PNP-Patienten im Vergleich zu Gesunden zeigten. So fand sich bei Patienten mit einer diabetischen PNP im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit Diabetes mellitus ohne Neuropathie eine höhere TNF-Proteinexpression im Serum (Doupis, et al. 2009). Auch im Falle der MMN, des GBS sowie der CIDP konnten in Studien im Serum höhere Proteinspiegel pro-inflammatorischer Zytokine wie IL1, IL2 und TNF im Vergleich zu Gesunden bzw. nicht-entzündlich bedingten, neurologischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Beppu, et al. 2015; Furukawa, et al.

2014; Gironi, et al. 2010). Lokale Veränderungen in Haut- und Nervenbiopsaten im Sinne einer höheren Gen- bzw. Proteinexpression pro-inflammatorischer Zytokine fanden sich bei verschiedenen Neuropathien, u.a. der SFN (Empl, et al. 2001; Lindenlaub and Sommer 2003; Üçeyler, et al. 2010). Diese pro-inflammatorischen Veränderungen zeigen sich somit nicht nur bei Neuropathien mit entzündlicher Genese (Martini and Willison 2016; Üçeyler, et al. 2015b).

Hinsichtlich der diagnostischen Subgruppen wie auch verschiedener Untergruppen (entzündlich/nicht-entzündlich, axonal/demyelinisierend) fanden sich unterschiedliche Muster höher exprimierter Zytokine im Vergleich zu Gesunden. So war IL8 im Falle der SFN sowie der vaskulitischen PNP das einzige höher exprimierte Zytokin, während bei der CIDP-Gruppe IL1 und IL8 höher exprimiert waren. Da allerdings keines der beteiligten Zytokine in nur einer einzigen Subgruppe höher bzw. niedriger exprimiert war als bei Kontrollen und zudem im direkten Vergleich der Diagnosesubgruppen untereinander keine Unterschiede vorlagen (z.B. CIDP vs. Vaskulitis), erscheint ein Einsatz als Biomarker aufgrund der somit niedrigen Spezifität für die jeweiligen Subgruppen nicht erfolgversprechend. Eine Ausnahme stellt z.B. die MMN als Unterform der entmarkenden Neuropathien dar und ihre differenzialdiagnostische Abgrenzung zu Motoneuronenerkrankungen. Hier konnten Furukawa et al. höhere TNF-Proteinspiegel im Serum von Patienten mit MMN im Vergleich zu Patienten mit Motoneuronenerkrankung nachweisen (Furukawa, et al. 2014); die Ergebnisse waren allerdings nicht immer reproduzierbar (Vlam, et al. 2015). Trotz der insgesamt großen Patientenkohorte von n=97 PNP Patienten ergaben sich auch in unserer Arbeit nach Unterteilung in die Diagnosesubgruppen z.T. sehr kleine Patientenanzahlen (fünf Diagnosesubgruppen mit  $n \leq 5$ ); somit bleibt die Aussagekraft insbesondere in diesen Untergruppen eingeschränkt.

In unserer Studie fanden wir keine Unterschiede in der Zytokingenexpression zwischen schmerzhaften und schmerzlosen Neuropathien. Im Vergleich zu Gesunden zeigte sich in beiden Gruppen eine höhere Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine, wobei die Anzahl an beteiligten pro-inflammatorischen Zytokinen in der Gruppe der schmerzhaften Neuropathien

größer war und neben TNF und IL8 auch IL1 und IL2 umfasste. Diese Ergebnisse sind unerwartet, nachdem sich in einer Vorarbeit eine höhere Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine bei schmerzhaften bzw. anti-inflammatorischer Zytokine bei schmerzlosen Neuropathien fanden (Üçeyler, et al. 2007). Allerdings sind die Studien nicht direkt vergleichbar: Die Anzahl der damals untersuchten Patienten war geringer (n=32); als Ausgangsmaterial war zudem Vollblut verwendet worden, das neben PBMC auch weitere potentiell Zytokin-produzierende Zellen enthält. Auch die Arbeiten von Doupis et al. und Ludwig et al., die Zytokinkonzentrationen im Serum von Patienten mit diabetischer bzw. nicht-entzündlicher PNP untersuchten und korrespondierend zu unseren Ergebnissen keine Unterschiede zwischen schmerzhaften und schmerzloser PNP nachweisen konnten, sind aufgrund des unterschiedlichen Ausgangsmaterials nicht direkt vergleichbar (Doupis, et al. 2009; Ludwig, et al. 2008).

### **Zytokinproduktion nach Zellstimulation *in vitro***

Um die Frage zu klären, ob die gemessenen höheren Genexpressionswerte auf einer konstitutiv erhöhten Zytokinexpression beruhen oder induzierbar sind, führten wir einen PBMC-Stimulationsversuch *in vitro* durch. Hierbei konnte nach Inkubation mit LPS anders als angenommen keine höhere Proteinexpression von IL6, IL8 und TNF im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden; ebenso zeigte sich kein Unterschied zwischen schmerzhaften und schmerzlosen PNP bzw. entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP. Somit scheint eine erniedrigte Stimulationsschwelle der Zytokin-produzierenden PBMC als mögliche Erklärung für die höheren Genexpressionswerte der PNP-Patienten keine Rolle zu spielen.

### **Korrelation von IL6-Genexpression und Krankheitsdauer**

Es konnte eine Korrelation zwischen der IL6 Genexpression und der Krankheitsdauer nachgewiesen werden. Im Rahmen des Krankheitsprozesses

kommt es bei Neuropathien zu einem steten Verlust an Nervenfasern; während der degenerativen Prozesse werden u.a. durch die untergehenden Schwann-Zellen vermehrt pro- inflammatorische Zytokine wie IL6 freigesetzt (Lindenlaub and Sommer 2003). Das sogenannte Neurozytokin IL6 hat sowohl über eine Hochregulation des brain-derived neurotrophic factors (BDNF), Substanz P sowie Galanin (Murphy, et al. 1999; Sun, et al. 1996) als auch über eine Verbesserung des Blutflusses der Vasa nervorum (Cameron and Cotter 2007) neuroprotektive Effekte. Somit erscheint eine positive Korrelation zwischen Krankheitsdauer und der IL6-Genexpression naheliegend und wird auch durch weitere Arbeiten unterstützt. Koike et al. fanden beispielsweise eine positive Korrelation zwischen IL6-Serumwerten und dem Verlust myelinisierter Nervenfasern bei Patienten mit POEMS, welcher im Krankheitsverlauf zunimmt (Koike, et al. 2008).

### **Schlussfolgerung und Ausblick**

Das Zusammenspiel der Zytokine bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen wie auch in der Pathogenese der Neuropathien ist nicht vollständig geklärt; entscheidend scheint das Zusammenspiel und das Gleichgewicht der exprimierten Zytokine (Maingret, et al. 2008; Martini and Willison 2016; Üçeyler, et al. 2015b). Wann und wie lange diese vorwiegend lokal-wirkenden Botenstoffe nachweisbar systemisch erhöht sind und wie sie sich durch medikamentöse Therapie verändern, bleibt unklar. Auch ihre Sensibilität hinsichtlich verschiedener endo- und exogener Faktoren schränkt ihre Bedeutung als mögliche Biomarker ein. Interessant ist der Befund, dass pro- und anti-inflammatorische Zytokine auch systemisch bei PNP im Vergleich zu Kontrollen vermehrt exprimiert sind, wohingegen sich für Subgruppen kaum Unterschiede zeigen. Dies steht in Analogie zu ähnlichen Befunden zur lokalen Zytokinexpression bei PNP Patienten (Üçeyler, et al. 2015b). Neue vielversprechende Ansatzpunkte bringen die in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gerückten sogenannten microRNA (miRNA), die post-transkriptionell die Expression zahlreicher Gene regulieren (Bartel 2009).

miRNA sind kleine, aus <30 Nukleotiden bestehende, nicht-codierende RNA-Stränge, die in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert sind (Niederberger, et al. 2011), u.a. auch in die Regulierung von Zytokinen (Bali and Kuner 2014; Favereaux, et al. 2011; Li, et al. 2013; Ni, et al. 2013; Park, et al. 2014; Sheedy 2015). Ein Beispiel hierfür ist die miRNA mir-21, die bei zahlreichen entzündlichen Prozessen involviert ist und zu einer vermehrten Bildung von IL10 bzw. verminderten Bildung von TNF führt (Sheedy 2015). Gleichzeitig konnten Sakai et al. zeigen, dass die intrathekale Gabe von IL1 die Bildung von miR-21 in einem Rattenmodell für neuropathischen Schmerz induziert (Sakai and Suzuki 2013). Es bleibt abzuwarten, in wie weit diese Erkenntnisse zum besseren Verständnis der Neuropathie- und Schmerzpathophysiologie genutzt werden können und ob sich daraus diagnostische und prognostische Biomarker ableiten lassen.

## Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der PNP wie auch die Entstehung der oft assoziierten neuropathischen Schmerzen ist unklar. Gleichzeitig gibt es bislang keine geeigneten Biomarker, die die oft komplizierte Differentialdiagnose vereinfachen können. Einige Tiermodelle und klinische Studien lieferten bereits Hinweise auf die entscheidende Rolle pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in diesen Prozessen. Ziel unserer Studie war es, die systemische Genexpression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in einer großen Kohorte von Patienten mit PNP verschiedener Ätiologie zu charakterisieren. Insgesamt konnten 111 PNP-Patienten und 38 gesunde Kontrollpersonen prospektiv rekrutiert werden. Nach Isolation von PBMC aus Blutproben wurde die Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF, IL1, IL2, IL6, IL8 und der anti-inflammatorischen Zytokine IL4 und IL10 mittels qRT-PCR bestimmt. Bei 47 Patienten und 12 Kontrollen wurde zudem die IL6-, IL-8- und TNF-Zytokinproduktion von PBMC *in vitro* nach Stimulation durch LPS mittels ELISA untersucht. Hauptbefund war ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil der PNP-Patienten mit höherer Genexpression von IL1, IL2, IL8 und TNF im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Im Falle der entzündlichen Neuropathien konnte zudem eine niedrigere Genexpression von IL10 im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden. Sowohl schmerzhafte als auch schmerzlose Verlaufsformen wiesen ein pro-inflammatorisches Zytokingenexpressionsprofil im Vergleich zu Gesunden auf, das bei schmerzhaften PNP deutlich mehr beteiligte pro-inflammatorische Zytokine umfasste; relevante Unterschiede zwischen den PNP-Patienten mit und ohne Schmerz sowie der diagnostischen Subgruppen fanden sich nicht. Eine niedrigere Stimulationsschwelle der PBMC lag bei PNP-Patienten im Vergleich zu Gesunden nicht vor. Insgesamt erscheint die Rolle einzelner Zytokine als systemische Biomarker für die Differenzierung verschiedener PNP-Formen bzw. bezüglich neuropathischen Schmerzes aufgrund einer niedrigen Spezifität deutlich eingeschränkt. Dennoch sprechen unsere Ergebnisse für eine mögliche Rolle eines pro-inflammatorischen Milieus bei der Entstehung bzw. des Verlaufes verschiedener entzündlicher und nicht-entzündlicher Neuropathien und neuropathischen Schmerzes.



## V. Tabellarische Übersicht der Patienten-/Fragebogendaten

Item	Anzahl (%-Anteil an der Gesamtgruppe)
M, W (n)	81, 30
Medianes Alter (Spanne)	63 Jahre (23-84)
Mediane Krankheitsdauer (Spanne in Jahren)	3 Jahre (0,06 bis 50)
Schmerzhafte PNP, schmerzlose PNP (n)	74, 37
Diagnostische Subgruppen (n und %-Anteil an der Gesamtgruppe)	
“Unklar”	36 (32%)
- Hinweise auf entzündliche Genese	- 13 (36%)
Vaskulitische Neuropathie	13 (12%)
- NSVN	- 7 (54%)
CIDP (+/- INCAT)	12 (11%)
SFN	8 (7%)
“Sonstige“- nicht-entzündlich bedingt (z.B. Toxisch bedingte PNP)	7 (6%)
CIDPclin	6 (5%)
CIAP	6 (5%)
Hereditäre Neuropathie	5 (5%)
Diabetische Neuropathie	5 (5%)
CIDPsens	5 (5%)
Paraproteinämische Neuropathie	4 (4%)
- Anti-MAG	-1 (25%)
PIAN	2 (2%)
MADSAM	1 (1%)
“Sonstige“- entzündlich bedingt	1 (1%)

(Ganglionitis)	
----------------	--

**Tab. 9: Übersicht klinischer Patientendaten.** Abkürzungen: CIAP Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie; CIDP Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, CIDPclin Patienten mit typischer klinischer Präsentation einer CIDP, die jedoch die INCAT-Kriterien nicht erfüllen; CIDPsens Patienten mit rein sensibler Symptomatik bei ansonsten typischer Präsentation einer CIDP, die nicht die INCAT-Kriterien erfüllen; INCAT Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group; M Männlich; MADSAM Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy; MAG Myelin-assoziiertes Glykoprotein; n Anzahl; NSVN Nicht-systemische vaskulitische Neuropathie; PIAN Progressive idiopathische axonale Polyneuropathie; SFN Small fiber Neuropathie; W Weiblich.

Patientengruppe	Mediane der Summenwerte		
	NPSI	ADS	ODSS
Schmerzhafte PNP	0,25 (Spanne 0-0,81)	15 (Spanne 0-40)	2 (Spanne 0-11)
Schmerzlose PNP	0,03 (Spanne 0-0,18)	12 (Spanne 0-33)	2 (Spanne 0-5)
Entzündliche PNP	0,11 (Spanne 0-0,6)	15 (Spanne 0-40)	2 (Spanne 0-6)
Nicht-entzündliche PNP	0,21 (Spanne 0-0,55)	15 (Spanne 0-40)	2 (Spanne 0-11)
Frauen	-	16 (Spanne 0-40)	-
Männer	-	15 (Spanne 0-40)	-

**Tab. 10: Übersicht der Summenwerte der Fragebögen und Scores.** Abkürzungen: ADS Allgemeine Depressivitätsskala; NPSI Neuropathic Pain Symptom Inventory; ODSS Overall Disability Sum Score; PNP Polyneuropathie.

NPSI-Items	Diagnosesubgruppen							
	CIAP	CIDP gesamt	Diab. PNP	Her. PNP	Par. PNP	PIAN	SFN	Vaskulitis
Summenscore	0,18	0,10	0,14	0,18	0,17	0,21	0,31	0,11

Brennen	0,05	0	0,10	0	0,35	0,20	0,50	0
Durck	0	0	0,05	0,10	0,40	0,05	0,40	0
Attackenartiger Schmerz	0,25	0	0	0,10	0,20	0,25	0,40	0,20
Evozierter Schmerz	0,10	0	0	0	0,15	0,20	0,20	0
Par-/Dysästhesien	0,35	0,25	0,40	0,30	0,05	0,35	0,40	0

**Tab. 11: Übersicht NPSI-Items (Mediane) verschiedener Diagnosesubgruppen.**

Abkürzungen: CIAP Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie; CIDP Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; Diab. PNP Diabetische Polyneuropathie; NPSI Neuropathic Pain Symptom Inventory; Par. PNP Paraproteinämische Polyneuropathie; PIAN Progressive idiopathische axonale Polyneuropathie; SFN Small fiber Neuropathie.

ODSS-Item	Diagnosesubgruppen							
	CIAP	CIDP gesamt	Diab. PNP	Her. PNP	Par. PNP	PIAN	SFN	Vaskulitis
Score Arme	1	1	0	0	0	1	1	0
Score Beine	2	2	0	1	1,5	2	2	2
Gesamtscore	2	2	0	2	2	3	2,5	3

**Tab. 12: Übersicht ODSS-Items (Mediane) verschiedener Diagnosesubgruppen.**

Abkürzungen: CIAP Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie; CIDP Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; Diab. PNP Diabetische Polyneuropathie; ODSS Overall Disability Sum Score; Par. PNP Paraproteinämische Polyneuropathie; PIAN Progressive idiopathische axonale Polyneuropathie; SFN Small fiber Neuropathie.

GCPS-Items Mediane	Diagnosesubgruppen (Sz+)		
	CIDP gesamt	SFN	Vaskulitis
Aktueller Schmerz	0	3	2
Durchschnittlicher Schmerz *	7	7	8
Max. Schmerz *	5	5	6
Anzahl der Tage ohne	0	0	15

übliche Aktivität *			
Einschränkung Alltag *	5	1	5
Einschränkung Freizeit *	5,5	2,5	8
Einschränkung Arbeitsfähigkeit *	4	2,5	7
Schmerzintensität	51,67	50	53,33
Behinderungsgrad	2	0	2

**Tab. 13: Übersicht GCPS-Items der Diagnosesubgruppen CIDP, SFN und Vaskulitis. \***

der letzten vier Wochen; Abkürzungen: CIDP Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; Sz+ Patientengruppen mit Schmerz; SFN Small fiber Neuropathie.

## VI. Anhang

### Geräte, Materialien, Chemikalien

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	ECOM-P 4153	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Thermo Scientific Cell 150	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heizblock	TS-100 Thermo-Shaker	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Homogenisator	Polytron PT 1600 E	Kinematica AG, Luzern, Schweiz
Kühlzentrifuge	Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop	Olympus CKX41	Olympus, Tokyo, Japan
PCR-Cycler für Real-Time-PCR	Step One Plus RealTime PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PCR-Cycler für Reverse Transkription	Advanced primus 96	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Photometer	Nanodrop® Spectrophotometer	
Pipetten	10µl, 100µl, 1000µl Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettiergerät Lymphoprep	Accu-jet®pro	Brand GmbH &Co.KG, Wertheim, Deutschland
Pipettiergerät PCR	Multipipette® Stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettiergerät ELISA	Multipipette® plus	
Vortexer	GLW- L46	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Wasserbad	WNB 7-45	Memmert GmbH &Co. KG,

		Schwabach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved (0,100mm Tiefe, 0,0025mm <sup>2</sup> )	Paul Marienfeld GmbH &Co.KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Aufreinigung	Rotofix 32	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Aufreinigung	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Microplate Reader (TNF, IL8)	Multiskan EX	Thermo/Lab Systems Inc., Beverly, USA
Microplate Reader (IL6)	Titertek Multiskan Plus MKII	Titertek-Berthold, Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Deutschland

**Tab. 14: Geräte und Laborhilfen**

Abkürzungen: ELISA Enzyme linked immunosorbent assay; Inc. Incorporated; IL Interleukin; PCR Polymerase chain reaction; TNF Tumor-Nekrosefaktor; USA United States of America.

<b>Art</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Caps	0,2ml PCR Soft tubes	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
	1,5ml Safe lock tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	2ml Mikroschraubröhre PP	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Pipetten	5ml, 10ml, 25ml Serologische Pipette	Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen, Deutschland
	3,5ml Transferpipette	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
	Glaspasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg,

	ungestopft	Deutschland
PCR-Platten	MicroAmp® Fast 96-Well reaction plate 0,1ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipettenspitzen	10µl, 100µl, 1000µl Biosphere® Filter tips	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
	Combitips® Plus 0,1ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Combitips® Plus 5ml	
Tubes	Cellstar® PP-Test-Tubes 50ml	Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen, Deutschland
	Cellstar® PP-Test-Tubes 15ml	
Verschlussfolien PCR- Platten	Optical Adhesive Covers	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellkulturschalen	Nunclon™ Surface	NUNC A/S, Roskilde, Dänemark

**Tab. 15: Verbrauchsmaterialien**

Abkürzungen: Inc. Incorporated; PCR Polymerase chain reaction; USA United States of America.

<b>Art</b>	<b>Bezeichnung/ Inhalt</b>	<b>Hersteller</b>
Einfriermedium	Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
	RPMI 1640 without L- Glutamine	
	Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Lymphoprep™		AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen
1xPBS-Puffer	Phosphat gepufferte Salzlösung	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
Trypan-Blau Lösung 0,4%		Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München,

		Deutschland
--	--	-------------

**Tab. 16: Chemikalien, Lösungen und Puffer für die Isolation von PBMC**

Abkürzungen: PBS Phosphate-Buffered-Saline; PBMC Peripheral blood mononuclear cells; RPMI Roswell Park Memorial Institute.

Art	Bezeichnung/ Inhalt	Hersteller
Aufreinigungskit: RNeasy Mini Kit # 74106	Rneasy Mini Kit # 74106	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Aqua dest.	Aqua ad iniectabilia Braun	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
$\beta$ – Mercaptoethanol	2- Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
70% Ethanol		
RPMI 1640 without L- Glutamine		PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

**Tab. 17: Chemikalien, Lösungen und Puffer für die RNA-Aufreinigung**

Abkürzungen: Dest. Destilliert; RPMI Roswell Park Memorial Institute; RNA ribonucleid acid.

Art	Bezeichnung	Hersteller
Nukleotide	dNTP	Taq Man®
Primer	Oligo-DT	Reverse Transcription reagents,
	Random-Hexamers	
Puffer	10x RT-Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	25mM MgCl <sub>2</sub>	
Reverse Transkriptase	MultiScribe Reverse Transcriptase	
RNAse Inhibitor		



**Tab. 18: Enzyme, Nukleinsäuren, Puffer und Primer für die Reverse Transkriptions-PCR**

Abkürzungen: dNTP 2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate; Inc. Incorporated; MgCl<sub>2</sub> Magnesiumchlorid; PCR Polymerase chain reaction; RNA ribonucleid acid; USA United States of America.

Primer/Puffer	Bezeichnung	Hersteller
IL1β	Hs00174097_m1	Taq Man® Gene expression assay, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
IL2	Hs00174114_m1	
IL4	Hs00174122_m1	
IL6	Hs00174131_m1	
IL8	Hs00174103_m1	
IL10	Hs00174086_m1	
TNF	Hs00174128_m1	
18S	Hs99999901_s1	
Puffer, Nukleotide, DNA-Polymerase	Taq Man® Universal- PCR-Master Mix	

**Tab. 19: Enzyme, Nukleinsäuren, Puffer und Primer für die Quantitative real-time-PCR**

Abkürzungen: DNA Desoxyribonucleid acid; IL Interleukin; Inc. Incorporated; PCR Polymerase chain reaction; TNF Tumor-Nekrosefaktor.

Art	Bezeichnung/ Inhalt	Hersteller
Fetales Kälberserum		PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
LPS	E. Coli, O55:B5	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	gibco® Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Life technologies™ Corporation, Paisley, Großbritannien
RPMI 1640	Without L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH,

		Cölbe, Deutschland
	gibco® With 25mM HEPES and 2mM L-Glutamine	Life technologies™ Corporation, Paisley, Großbritannien
Sodium- Pyruvat	gibco® 100mM Sodium- Pyruvat	

**Tab. 20: Chemikalien, Lösungen und Puffer für die Stimulation von PBMC**

Abkürzungen: E.coli Escherichia coli; LPS Lipopolysaccharid; PBMC Peripheral blood mononuclear cells; RPMI Roswell Park Memorial Institute

Art	Bezeichnung/ Inhalt	Hersteller
Dest. Wasser	Ultra pure water	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA
ELISA- Kit IL6	Quantikine® ELISA Human IL6-Immunoassay D6050	Biotechne, Minneapolis, USA
ELISA- Kit IL8	BioSource™ IL8-ELISA KAC1301	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ELISA- Kit TNF	Invitrogen™ Human TNF-α ELISA-Kit KHC3011	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

**Tab. 21: Chemikalien, Lösungen und Puffer für den IL6-/IL8-/TNF- ELISA**

Abkürzungen: Dest. Destilliert; ELISA Enzyme-linked immunosorbant assay; IL Interleukin; TNF Tumor-Nekrosefaktor; Inc. Incorporated; USA United States of America.

## VII. Literaturverzeichnis

- Austin, P.J., Moalem-Taylor, G. (2010) The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*, 229:26-50.
- Ayrignac, X., Viala, K., Koutlidis, R.M., Taieb, G., Stojkovic, T., Musset, L., Leger, J.M., Fournier, E., Maissonobe, T., Bouche, P. (2013) Sensory chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an under-recognized entity? *Muscle Nerve*, 48:727-32.
- Backonja, M.M., Coe, C.L., Muller, D.A., Schell, K. (2008) Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients. *J Neuroimmunol*, 195:157-63.
- Bali, K.K., Kuner, R. (2014) Noncoding RNAs: key molecules in understanding and treating pain. *Trends Mol Med*, 20:437-48.
- Barohn, R.J., Saperstein, D.S. (1998) Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Semin Neurol*, 18:49-61.
- Baron, R. (2006) Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol*, 2:95-106.
- Baron, R., Binder, A., Wasner, G. (2010) Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*, 9:807-19.
- Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136:215-33.
- Beppu, M., Sawai, S., Misawa, S., Sogawa, K., Mori, M., Ishige, T., Satoh, M., Nomura, F., Kuwabara, S. (2015) Serum cytokine and chemokine profiles in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol*, 279:7-10.
- Bleeker, M.W., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Van der Ven-Jongekrijg, J., Van der Meer, J.W. (1997) The effects of dexamethasone and chlorpromazine on tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in human volunteers. *Immunology*, 91:548-52.
- Borner, C., Kraus, J., Schroder, H., Ammer, H., Hollt, V. (2004) Transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene by interleukin-6. *Mol Pharmacol*, 66:1719-26.
- Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., Grisart, J., Boureau, F. (2004) Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain*, 108:248-57.
- Bouhassira, D., Lanteri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., Touboul, C. (2008) Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, 136:380-7.
- Brannagan, T.H., 3rd. (2011) Current diagnosis of CIDP: the need for biomarkers. *J Peripher Nerv Syst*, 16 Suppl 1:3-13.
- Bril, V., Perkins, B.A. (2002) Validation of the Toronto Clinical Scoring System for diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*, 25:2048-52.

- Cameron, N.E., Cotter, M.A. (2007) The neurocytokine, interleukin-6, corrects nerve dysfunction in experimental diabetes. *Exp Neurol*, 207:23-9.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A. (2006) Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, 52:77-92.
- Clark, A.K., Old, E.A., Malcangio, M. (2013) Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*, 6:803-14.
- Cohen, S.P., Mao, J. (2014) Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*, 348:f7656.
- Collins, M.P., Periquet, M.I., Mendell, J.R., Sahenk, Z., Nagaraja, H.N., Kissel, J.T. (2003) Nonsystemic vasculitic neuropathy: insights from a clinical cohort. *Neurology*, 61:623-30.
- Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H. (1992) The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 107:660-4.
- Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Veiga, F.H., Ferreira, S.H. (1999) Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *Br J Pharmacol*, 126:45-50.
- Dancey, J.E., Dobbin, K.K., Groshen, S., Jessup, J.M., Hruszkewycz, A.H., Koehler, M., Parchment, R., Ratain, M.J., Shankar, L.K., Stadler, W.M., True, L.D., Gravell, A., Grever, M.R., Biomarkers Task Force of the, N.C.I.I.D.S.C. (2010) Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin Cancer Res*, 16:1745-55.
- De Sousa, E.A., Chin, R.L., Sander, H.W., Latov, N., Brannagan, T.H., 3rd. (2009) Demyelinating findings in typical and atypical chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: sensitivity and specificity. *J Clin Neuromuscul Dis*, 10:163-9.
- Devigili, G., Tugnoli, V., Penza, P., Camozzi, F., Lombardi, R., Melli, G., Broglio, L., Granieri, E., Lauria, G. (2008) The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain*, 131:1912-25.
- Dinarello, C.A. (2007) Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1:S34-45.
- Doupis, J., Lyons, T.E., Wu, S., Gnardellis, C., Dinh, T., Veves, A. (2009) Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 94:2157-63.
- Edwards, R.R., Giles, J., Bingham, C.O., 3rd, Campbell, C., Haythornthwaite, J.A., Bathon, J. (2010) Moderators of the negative effects of catastrophizing in arthritis. *Pain Med*, 11:591-9.
- Eftimov, F., van Schaik, I. (2013) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: update on clinical features, phenotypes and treatment options. *Curr Opin Neurol*, 26:496-502.
- Empl, M., Renaud, S., Erne, B., Fuhr, P., Straube, A., Schaeren-Wiemers, N., Steck, A.J. (2001) TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology*, 56:1371-7.
- England, J.D., Asbury, A.K. (2004) Peripheral neuropathy. *Lancet*, 363:2151-61.
- Favereaux, A., Thoumine, O., Bouali-Benazzouz, R., Roques, V., Papon, M.A., Salam, S.A., Drutel, G., Leger, C., Calas, A., Nagy, F., Landry, M. (2011)

- Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *EMBO J*, 30:3830-41.
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpaa, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Kamerman, P.R., Lund, K., Moore, A., Raja, S.N., Rice, A.S., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B.H., Wallace, M. (2015) Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 14:162-73.
- Fishbain, D.A., Goldberg, M., Meagher, B.R., Steele, R., Rosomoff, H. (1986) Male and female chronic pain patients categorized by DSM-III psychiatric diagnostic criteria. *Pain*, 26:181-97.
- Fleige, S., Walf, V., Huch, S., Prgomet, C., Sehm, J., Pfaffl, M.W. (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*, 28:1601-13.
- Furukawa, T., Matsui, N., Fujita, K., Miyashiro, A., Nodera, H., Izumi, Y., Shimizu, F., Miyamoto, K., Takahashi, Y., Kanda, T., Kusunoki, S., Kaji, R. (2014) Increased proinflammatory cytokines in sera of patients with multifocal motor neuropathy. *J Neurol Sci*, 346:75-9.
- Gironi, M., Saresella, M., Marventano, I., Guerini, F.R., Gatti, A., Antonini, G., Ceresa, L., Morino, S., Beghi, E., Angelici, A., Mariani, E., Nemni, R., Clerici, M. (2010) Distinct cytokine patterns associated with different forms of chronic dysimmune neuropathy. *Muscle Nerve*, 42:864-70.
- Gustorff, B., Dörner, T., Likar, R., Grisold, W., Lawrence, K., Schwarz, F., Rieder, A. (2008) Prevalence of self-reported neuropathic pain and impact on quality of life: a prospective representative survey. *Acta Anaesthesiol Scand*, 52:132-6.
- Hautzinger, M., Bailer, M. (1993) Allgemeine Depressionsskala. Manual Weinheim Beltz Gesellschaft.
- Heuss, D., Haupt, W.F., Kuntzer, T., Löscher, W., Neundörfer, B., Rautenstrauß, B., Renaud, S., Sommer, C. (2012) Diagnostik bei Polyneuropathien. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
- Hou, L., Li, W., Wang, X. (2003) Mechanism of interleukin-1 beta-induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats. *J Neurosci Res*, 73:188-97.
- Hughes, R.A. (2001) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol*, 50:281-2.
- Inoue, A., Ikoma, K., Morioka, N., Kumagai, K., Hashimoto, T., Hide, I., Nakata, Y. (1999) Interleukin-1beta induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. *J Neurochem*, 73:2206-13.
- Jann, S., Brammerio, M.A., Beretta, S., Koch, S., Defanti, C.A., Toyka, K.V., Sommer, C. (2003) Diagnostic value of sural nerve matrix metalloproteinase-9 in diabetic patients with CIDP. *Neurology*, 61:1607-10.

- Jensen, T.S., Baron, R., Haanpaa, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S., Treede, R.D. (2011) A new definition of neuropathic pain. *Pain*, 152:2204-5.
- Joint Task Force of the, E., the, P.N.S. (2010a) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--First Revision. *J Peripher Nerv Syst*, 15:1-9.
- Joint Task Force of the, E., the, P.N.S. (2010b) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of paraproteinemic demyelinating neuropathies. Report of a Joint Task Force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--first revision. *J Peripher Nerv Syst*, 15:185-95.
- Julius, D., Basbaum, A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413:203-10.
- Junger, H., Sorkin, L.S. (2000) Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. *Pain*, 85:145-51.
- Kanaan, S.A., Safieh-Garabedian, B., Haddad, J.J., Atweh, S.F., Abdelnoor, A.M., Jabbur, S.J., Saade, N.E. (1997) Effects of various analgesic and anti-inflammatory drugs on endotoxin-induced hyperalgesia in rats and mice. *Pharmacology*, 54:285-97.
- Kinter, J., Broglio, L., Steck, A.J., Tolnay, M., Fuhr, P., Latov, N., Kalbermatten, D., Sinnreich, M., Schaeren-Wiemers, N., Renaud, S. (2010) Gene expression profiling in nerve biopsy of vasculitic neuropathy. *J Neuroimmunol*, 225:184-9.
- Koike, H., Iijima, M., Mori, K., Yamamoto, M., Hattori, N., Watanabe, H., Tanaka, F., Doyu, M., Sobue, G. (2008) Neuropathic pain correlates with myelinated fibre loss and cytokine profile in POEMS syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79:1171-9.
- Lacomis, D. (2002) Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve*, 26:173-88.
- Latov, N. (2011) Biomarkers of CIDP in patients with diabetes or CMT1. *J Peripher Nerv Syst*, 16 Suppl 1:14-7.
- Latov, N., Dalakas, M., Vallat, J.M., Donofrio, P., Hartung, H.P., Toyka, K.V. (2011) Biomarkers in the diagnosis and therapy of CIDP: Proceedings of the Biomarkers Faculty Meeting; June 8-9, 2010, Athens, Greece. *J Peripher Nerv Syst*, 16 Suppl 1:1-2.
- Lauria, G., Cornblath, D.R., Johansson, O., McArthur, J.C., Mellgren, S.I., Nolano, M., Rosenberg, N., Sommer, C., European Federation of Neurological, S. (2005) EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol*, 12:747-58.
- Lauria, G., Hsieh, S.T., Johansson, O., Kennedy, W.R., Leger, J.M., Mellgren, S.I., Nolano, M., Merkies, I.S., Polydefkis, M., Smith, A.G., Sommer, C., Valls-Sole, J., European Federation of Neurological, S., Peripheral Nerve, S. (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the

- European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol*, 17:903-12, e44-9.
- Lauria, G., Lombardi, R., Camozzi, F., Devigili, G. (2009) Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy. *Histopathology*, 54:273-85.
- Legrain, V., Damme, S.V., Eccleston, C., Davis, K.D., Seminowicz, D.A., Crombez, G. (2009) A neurocognitive model of attention to pain: behavioral and neuroimaging evidence. *Pain*, 144:230-2.
- Levinson, S.R., Luo, S., Henry, M.A. (2012) The role of sodium channels in chronic pain. *Muscle Nerve*, 46:155-65.
- Lewis, R.A., Sumner, A.J., Brown, M.J., Asbury, A.K. (1982) Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology*, 32:958-64.
- Li, H., Shen, L., Ma, C., Huang, Y. (2013) Differential expression of miRNAs in the nervous system of a rat model of bilateral sciatic nerve chronic constriction injury. *Int J Mol Med*, 32:219-26.
- Lindenlaub, T., Sommer, C. (2003) Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol*, 105:593-602.
- Liongue, C., Sertori, R., Ward, A.C. (2016) Evolution of Cytokine Receptor Signaling. *J Immunol*, 197:11-8.
- Ludwig, J., Binder, A., Steinmann, J., Wasner, G., Baron, R. (2008) Cytokine expression in serum and cerebrospinal fluid in non-inflammatory polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79:1268-73.
- Maingret, F., Coste, B., Padilla, F., Clerc, N., Crest, M., Korogod, S.M., Delmas, P. (2008) Inflammatory mediators increase Nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *J Gen Physiol*, 131:211-25.
- Martini, R., Willison, H. (2016) Neuroinflammation in the peripheral nerve: Cause, modulator, or bystander in peripheral neuropathies? *Glia*, 64:475-86.
- Mellgren, S.I., Lindal, S. (2011) Nerve biopsy--some comments on procedures and indications. *Acta Neurol Scand Suppl*:64-70.
- Misra, U.K., Kalita, J., Nair, P.P. (2008) Diagnostic approach to peripheral neuropathy. *Ann Indian Acad Neurol*, 11:89-97.
- Murphy, P.G., Ramer, M.S., Borthwick, L., Gauldie, J., Richardson, P.M., Bisby, M.A. (1999) Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *Eur J Neurosci*, 11:2243-53.
- Ni, J., Gao, Y., Gong, S., Guo, S., Hisamitsu, T., Jiang, X. (2013) Regulation of mu-opioid type 1 receptors by microRNA134 in dorsal root ganglion neurons following peripheral inflammation. *Eur J Pain*, 17:313-23.
- Niederberger, E., Kynast, K., Lotsch, J., Geisslinger, G. (2011) MicroRNAs as new players in the pain game. *Pain*, 152:1455-8.
- Oprea, A., Kress, M. (2000) Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci*, 20:6289-93.

- Park, C.K., Xu, Z.Z., Berta, T., Han, Q., Chen, G., Liu, X.J., Ji, R.R. (2014) Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron*, 82:47-54.
- Pedersen, B.K., Toft, A.D. (2000) Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med*, 34:246-51.
- Picon, A.P., Ortega, N.R., Watari, R., Sartor, C., Sacco, I.C. (2012) Classification of the severity of diabetic neuropathy: a new approach taking uncertainties into account using fuzzy logic. *Clinics (Sao Paulo)*, 67:151-6.
- Radat, F., Margot-Duclot, A., Attal, N. (2013) Psychiatric co-morbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: a multicentre cohort study. *Eur J Pain*, 17:1547-57.
- Rappaport, W.D., Valente, J., Hunter, G.C., Rance, N.E., Lick, S., Lewis, T., Neal, D. (1993) Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. *Am J Surg*, 166:252-6.
- Renaud, S., Hays, A.P., Brannagan, T.H., 3rd, Sander, H.W., Edgar, M., Weimer, L.H., Olarte, M.R., Dalakas, M.C., Xiang, Z., Danon, M.J., Latov, N. (2005) Gene expression profiling in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol*, 159:203-14.
- Rietschel, E.T., Schletter, J., Weidemann, B., El-Samalouti, V., Mattern, T., Zahringer, U., Seydel, U., Brade, H., Flad, H.D., Kusumoto, S., Gupta, D., Dziarski, R., Ulmer, A.J. (1998) Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microb Drug Resist*, 4:37-44.
- Sakai, A., Suzuki, H. (2013) Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 435:176-81.
- Saperstein, D.S., Amato, A.A., Wolfe, G.I., Katz, J.S., Nations, S.P., Jackson, C.E., Bryan, W.W., Burns, D.K., Barohn, R.J. (1999) Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy: the Lewis-Sumner syndrome. *Muscle Nerve*, 22:560-6.
- Savage, D., Gangaidzo, I., Lindenbaum, J., Kiire, C., Mukiibi, J.M., Moyo, A., Gwanzura, C., Mudenge, B., Bennie, A., Sitima, J., et al. (1994) Vitamin B12 deficiency is the primary cause of megaloblastic anaemia in Zimbabwe. *Br J Haematol*, 86:844-50.
- Schmader, K.E. (2002) Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *Clin J Pain*, 18:350-4.
- Sheedy, F.J. (2015) Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol*, 6:19.
- Smith, B.H., Torrance, N. (2012) Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Curr Pain Headache Rep*, 16:191-8.
- Sommer, C., Kress, M. (2004) Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 361:184-7.
- Sommer, C., Richter, H., Rogausch, J.P., Frettlow, J., Lungenhausen, M., Maier, C. (2011) A modified score to identify and discriminate neuropathic pain:



- a study on the German version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI). *BMC Neurol*, 11:104.
- Sommer, C.L., Brandner, S., Dyck, P.J., Harati, Y., LaCroix, C., Lammens, M., Magy, L., Mellgren, S.I., Morbin, M., Navarro, C., Powell, H.C., Schenone, A.E., Tan, E., Urtizberea, A., Weis, J., Peripheral Nerve, S. (2010) Peripheral Nerve Society Guideline on processing and evaluation of nerve biopsies. *J Peripher Nerv Syst*, 15:164-75.
- Steck, A.J., Kinter, J., Renaud, S. (2011) Differential gene expression in nerve biopsies of inflammatory neuropathies. *J Peripher Nerv Syst*, 16 Suppl 1:30-3.
- Strle, K., Zhou, J.H., Shen, W.H., Broussard, S.R., Johnson, R.W., Freund, G.G., Dantzer, R., Kelley, K.W. (2001) Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*, 21:427-49.
- Sun, Y., Landis, S.C., Zigmond, R.E. (1996) Signals triggering the induction of leukemia inhibitory factor in sympathetic superior cervical ganglia and their nerve trunks after axonal injury. *Mol Cell Neurosci*, 7:152-63.
- Treede, R.D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., Serra, J. (2008) Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, 70:1630-5.
- Üçeyler, N., Geng, A., Reiners, K., Toyka, K.V., Sommer, C. (2015a) Non-systemic vasculitic neuropathy: single-center follow-up of 60 patients. *J Neurol*, 262:2092-100.
- Üçeyler, N., Kafke, W., Riediger, N., He, L., Necula, G., Toyka, K.V., Sommer, C. (2010) Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy. *Neurology*, 74:1806-13.
- Üçeyler, N., Riediger, N., Kafke, W., Sommer, C. (2015b) Differential gene expression of cytokines and neurotrophic factors in nerve and skin of patients with peripheral neuropathies. *J Neurol*, 262:203-12.
- Üçeyler, N., Rogausch, J.P., Toyka, K.V., Sommer, C. (2007) Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology*, 69:42-9.
- Üçeyler, N., Sommer, C. (2008) Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases. *Neurosci Lett*, 437:194-8.
- Vincent, A.M., Callaghan, B.C., Smith, A.L., Feldman, E.L. (2011) Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol*, 7:573-83.
- Vlam, L., Stam, M., de Jager, W., Cats, E.A., van den Berg, L.H., van der Pol, W.L. (2015) Cytokine profiles in multifocal motor neuropathy and progressive muscular atrophy. *J Neuroimmunol*, 286:1-4.
- Von Korff, M., Crane, P., Lane, M., Miglioretti, D.L., Simon, G., Saunders, K., Stang, P., Brandenburg, N., Kessler, R. (2005) Chronic spinal pain and physical-mental comorbidity in the United States: results from the national comorbidity survey replication. *Pain*, 113:331-9.
- Von Korff, M., Ormel, J., Keefe, F.J., Dworkin, S.F. (1992) Grading the severity of chronic pain. *Pain*, 50:133-149.

- Vrancken, A.F., Notermans, N.C., Jansen, G.H., Wokke, J.H., Said, G. (2004) Progressive idiopathic axonal neuropathy--a comparative clinical and histopathological study with vasculitic neuropathy. *J Neurol*, 251:269-78.
- Watkins, L.R., Maier, S.F., Goehler, L.E. (1995) Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63:289-302.
- Wiersinga, W.J., de Rooij, S.E., Huijmans, J.G., Fischer, C., Hoekstra, J.B. (2005) [Diagnosis of vitamin B12 deficiency revised]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 149:2789-94.
- Yadav, M.C., Burudi, E.M., Alirezaei, M., Flynn, C.C., Watry, D.D., Lanigan, C.M., Fox, H.S. (2007) IFN-gamma-induced IDO and WRS expression in microglia is differentially regulated by IL-4. *Glia*, 55:1385-96.
- Yalcin, I., Barthas, F., Barrot, M. (2014) Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*, 47:154-64.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Frau Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler und Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer für das entgegengebrachte Vertrauen, das allzeit offene Ohr, die konstruktiven Ratschläge und Motivation in allen Phasen dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. Stefanie Hahner für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, allen voran Sonja Mildner, für die hervorragende Einarbeitung in die laborchemischen Methoden sowie eine allzeit herzliche und konstruktive Zusammenarbeit.

Meiner Kollegin Anna-Lena Schubert für die ausgezeichnete Zusammenarbeit während unserer Rekrutierungsphase und nun im Stationsalltag.

Meiner Familie, die immer für mich da war und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.