

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Untersuchung der Schnürringarchitektur in
Hautbiopsien von Patienten mit Polyneuropathien**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Vorgelegt von

Alexander Pina Kilgué

aus Bielefeld.

Würzburg, April 2018



Referent: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.01.2019

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition der Polyneuropathie (PNP)	1
1.2	Aufbau des peripheren und zentralen Nervensystems	1
1.3	Klinisches Erscheinungsbild der PNP	3
1.4	Klassifikationen und Ätiologie der PNP	4
1.5	Diagnostik der PNP	9
1.6	Hautbiopsien als minimal-invasives Instrument der molekularen Analyse von Nervenfasern	10
1.7	Reorganisation nodaler Membranproteine infolge demyelinisierender PNP	13
1.8	Gewebeinfiltration durch Entzündungszellen bei PNP	17
1.9	Zielsetzung und Fragestellung der Studie	18
1.9.1	Zielsetzung	18
1.9.2	Hypothese	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Einschlusskriterien für die Studienteilnahme	19
2.2	Klinisch-diagnostische Testverfahren zur Erfassung des Schweregrades von PNP	21
2.2.1	Medical Research Council Score (MRC)	21
2.2.2	Overall Disability Sum Score (ODSS)	21
2.2.3	Toronto Clinical Neuropathy Score (TCNS)	21
2.3	Durchführung der Hautstanzbiopsien	22
2.4	Gewebeaufbereitung der Hautstanzbiopsien	23
2.5	Immunohistochemische Aufbereitung der Hautstanzbiopsien	24
2.6	Histologische Auswertung der Hautstanzbiopsien	28
2.6.1	Aufstellung der histologischen Auswertung der Hautstanzbiopsien	30
2.6.2	Aufstellung der histologischen Merkmalsausprägungen der Nervus suralis Biopsien	31
2.7	Statistische Auswertung und Fallzahlplanung	31
2.8	Materialien	33
3	Ergebnisse	37
3.1	Analyse der klinischen Daten	37
3.1.1	Demographische Daten	37
3.1.2	Ätiologische Einteilung der Patienten nach PNP-Diagnostik	38
3.2	Auswertung der klinisch-diagnostischen Testverfahren (MRC, ODSS, TCNS)	41
3.3	Analyse der histologischen Daten	43
3.3.1	Übersicht Nervus Suralis Biopsien	43
3.3.2	Pathologische Auffälligkeiten an Ranvier-Schnürringen in Hautbiopsien nach Diagnosegruppen	44
3.3.3	Verlängerte Ranvier-Schnürringe in Hautbiopsien	45
3.3.3.1	Analyse verlängerter Ranvier-Schnürringe nach diagnostischen Subgruppen	45
3.3.3.2	Analyse verlängerter Ranvier-Schnürringe nach Schädigungsmuster axonal/demyelinisierend	45
3.3.3.3	Analyse Patientengruppen „verlängerte Ranvier-Schnürringe“	45
3.3.4	Dispersion Caspr	47
3.3.4.1	Analyse Dispersion Caspr nach diagnostischen Subgruppen	48
3.3.4.2	Analyse Dispersion Caspr nach Schädigungsmuster axonal/demyelinisierend	48
3.3.4.3	Analyse Patientengruppen „Dispersion Caspr“	48
3.3.5	Dispersion Neurofascin	50
3.3.5.1	Analyse Dispersion Neurofascin nach diagnostischen Subgruppen	50

3.3.5.2	Analyse Dispersion Neurofascin nach Schädigungsmuster axonal/ demyelinisierend	50
3.3.5.3	Analyse Patientengruppen „Dispersion Neurofascin“	51
3.3.6	Entzündungszellen in Haut- und Nervenbiopsien	52
3.3.6.1	Analyse Kolokalisation von Entzündungszellen in Hautbiopsien nach diagnostischen Subgruppen	52
3.3.6.2	Analyse Vermehrung von Entzündungszellen in Suralisbiopsien nach diagnostischen Subgruppen	53
3.3.6.3	Analyse Korrelation von Entzündungszellen in Haut- und Nervenbiopsien	54
3.3.7	Doppelte Anfärbarkeit von Natrium-Kanälen an Ranvierschen Schnürringen	54
3.3.8	myelinisierte/ nicht-myelinisierte Nervenfaserdichte in Hautbiopsien	55
3.3.8.1	Analyse Nervenfaserdichte SFN- und PNP-Patienten	55
3.3.8.2	Analyse der Nervenfaserdichte nach Schädigungsmuster	57
3.3.8.3	Analyse der Nervenfaserdichte nach Biopsielokalisation	57
3.3.8.4	Analyse klinisch-diagnostische Testverfahren und Nervenfaserdichte	59
3.3.8.5	Analyse Krankheitsdauer und Nervenfaserdichte	59
3.3.8.6	Analyse histologische Merkmalsausprägungen N. suralis und Nervenfaserdichte	60
3.3.8.7	Analyse Faserverlust in Suralisbiopsien und Nervenfaserdichte	60
3.3.8.8	Entzündliche/ nicht-entzündliche PNP und Nervenfaserdichte	60
3.3.9	Faserverlust in Hautbiopsien	62
4	Diskussion	67
4.1	Zu den histopathologischen Auffälligkeiten an Ranvier-Schnürringen	67
4.1.1	Verlängerte Ranviersche Schnürringe	67
4.1.2	Dispersion von Caspr und Neurofascin	68
4.2	Zu den kolokalisierten Entzündungszellen in Haut- und in Nervenbiopsaten	69
4.3	Zur Dichte der myelinisierten Nervenfasern in Hautbiopsien	71
4.4	Zu den Faserverlusten in Hautbiopsien	73
4.5	Zu den histologischen Merkmalsausprägungen in Haut- und Nervenbiopsien	74
4.6	Zu den Unterschieden in den klinisch-diagnostischen Tests	75
4.7	Zu den Unterschieden der Krankheitsdauer im Gruppenvergleich	77
4.8	Kritikpunkte der vorliegenden Studie und Ausblick	79
5	Zusammenfassung	81
6	Anhang	84
6.1	diagnostische INCAT Kriterien zur Diagnose einer CIDP	84
6.2	Abbildungsverzeichnis	85
6.3	Tabellenverzeichnis	86
7	Literaturverzeichnis	87

1 Einleitung

1.1 Definition der Polyneuropathie (PNP)

Der Begriff Polyneuropathie (PNP) beschreibt die Erkrankung mehrerer peripherer Nerven unterschiedlicher Ätiologie und Pathophysiologie, die mit einer Funktionseinschränkung einhergeht.

PNP zählen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Die Prävalenz der PNP variiert zwischen 2 und 4 %, in der Altersgruppe der über 55-jährigen steigt die Prävalenz auf bis zu 8% (Beghi & Monticelli, 1998; Martyn & Hughes, 1997).

PNP treten oftmals als Begleiterkrankung auf. Im Rahmen polytooper, systemischer Erkrankungen kommt es zur primär axonalen Degeneration oder zu primär entmarkenden, demyelinisierenden segmentalen Prozessen peripherer Nervenwurzeln, Nervenstämme und/oder Nervenäste.

Als generalisierte Erkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS) können PNP entsprechend der Funktionsweisen des PNS zu sensiblen, motorischen und/oder autonomen Ausfall- oder Reizerscheinungen führen (Heuss et al., 2012).

1.2 Aufbau des peripheren und zentralen Nervensystems

Das Nervensystem wird anatomisch in das zentrale und das periphere Nervensystem unterteilt.

Zum zentralen Nervensystem (ZNS) zählen Gehirn (ohne Hirnnervenkerne) und Rückenmark (ohne Vorderhornganglienzellen). Das periphere Nervensystem (PNS) umfasst neben Hirnnervenkernen und Rückenmark die motorischen, sensiblen und autonomen Nervenfasern samt Schwann-Zellen und ganglionä-

ren Satellitenzellen, Blut- und Lymphgefäße sowie Bindegewebszellen des Peri- und Epineuriums (Feldman et al., 2005; Heuss et al., 2012).

Je nach Grad der Myelinisierung und Geschwindigkeit der Übertragung von Aktionspotentialen afferenter Nervenfasern werden A β -, A δ - und C-Fasern unterschieden, die entsprechend ihrer sensiblen Modalitäten weiter differenziert werden können. A β -Fasern innervieren als sensible Nervenendigungen die Mechano- bzw. Druckrezeptoren (Merkel-Zellen) im Stratum basale der Epidermis. Als berührungsempfindliche Sensoren reagieren sie auf Druck, Dehnung oder Bewegung von Haarfollikeln. A δ - und C-Fasern beinhalten Thermo- und Nozizeptoren. Thermosensoren reagieren auf Wärme- und Kältereize der Haut, die oftmals polymodalen Neurone der Nozizeptoren werden durch eine Vielzahl sensorischer Stimuli aktiviert (Lumpkin & Caterina, 2007; Provitiera et al., 2007).

1.3 Klinisches Erscheinungsbild der PNP

Das klinische Erscheinungsbild einer PNP ist vielfältig. Je nach beteiligtem Nervenfasertyp und Schädigungsmuster kommt es zu einer Vielzahl an Symptomen.

PNP beginnen meist distal symmetrisch mit mehrheitlich sensibler Symptomatik. Je nach Ätiologie sind ein proximaler oder asymmetrischer Befall oder auch eine überwiegend motorische Beteiligung möglich. Das distal symmetrische Verteilungsmuster mit überwiegend sensomotorischer Komponente gehört zu den häufigsten Formen der PNP. Motorische Nervenfasern sind seltener bzw. erst im fortschreitenden Verlauf der Krankheit betroffen (Heuss et al., 2012).

Initiale Symptome führen zumeist zu sensiblen Reiz- und Ausfallerscheinungen, die zu Kribbeln, Jucken, Pelzigkeit, Brennen, Schmerzen, Taubheitsgefühl der Zehen bzw. Füße, Kälte- oder Wärmeempfinden u.a. führen (*Positiv-Symptomatik*). Diese Parästhesien sind überwiegend „sockenförmig“ an den unteren Extremitäten sowie „handschuhförmig“ an den oberen Extremitäten lokalisiert.

Daneben kommt es aufgrund von Schädigungen afferenter Nervenfasern zu sensiblen *Negativsymptomen*, die vornehmlich distal zu einer Abnahme des Vibrationsempfindens oder zu einer Beeinträchtigung der epikritischen Qualitäten an Zehen, Fußsohlen und Fingerkuppen führen. Koordinierte Bewegungsabläufe in Stand und Gang sind gestört (Benatar, 2006; England & Asbury, 2004; Wasner, 2012; Watson & Dyck, 2015).

Ein typisches Charakteristikum der PNP ist der Ausfall der Muskeleigenreflexe. Ein beidseitig fehlender Achillessehnenreflex (ASR) tritt meist zuerst in Erscheinung. Reflexausfälle an Patellarsehne (PSR) oder an den oberen Extremitäten treten erst bei fortschreitender Erkrankung auf, wohingegen pathologische Reflexe für eine PNP nicht typisch sind.

Die Beteiligung autonomer Nervenfasern führt u.a. zu efferenten Ausfallerscheinungen wie Hypo-/Anhydrosis, kardiovaskulären Störungen (Tachykardie), urogenitalen Dysfunktionen (u.a. Blasenentleerungsstörungen) sowie zu Beeinträchtigungen der

Afferenzen in Form einer fehlenden Reaktion des Organismus auf Schmerz (z.B. bei einer Koronarischämie) oder metabolische Störungen (Hypoglykämie) (Gehlen & Delank, 2010).

1.4 Klassifikationen und Ätiologie der PNP

PNP können mit Hilfe folgender Kriterien eingeordnet werden (Heuss et al., 2012):

- zeitlicher Verlauf und Dauer der Symptomatik
akut (≤ 4 Wochen)
subakut (4-8 Wochen)
chronisch (> 8 Wochen)
- beteiligte Nervenfaserklassen
motorisch – sensibel – autonom – sensomotorisch
- Verteilung der Symptome
symmetrisch – asymmetrisch
distal – proximal
- Schädigungsmuster
axonal – demyelinisierend
- Ätiologie
erworben - hereditär

Die Ätiologie von PNP ist vielfältig. Generell wird zwischen den erworbenen, d.h. als Folge einer Erkrankung aufgetretenen PNP, und den selteneren hereditären Neuropathien unterschieden.

Die neurotoxischen Eigenschaften der metabolischen Störungen des Diabetes mellitus stellen mit einer Prävalenz 10-50% die häufigste Ursache für erworbene PNP in Industriestaaten dar (Beghi & Monticelli, 1998; Hughes, 2002; Partanen et al., 1995; Watson & Dyck, 2015; Young et al., 1993). Daneben finden sich u.a. PNP exogen-toxischer, infektiöser, immunologischer, vaskulärer, paraneoplastischer sowie hereditärer Genese. Bei bis zu 20% der PNP bleibt die Ätiologie unklar (Cifuentes-Diaz et al., 2011; Heuss et al., 2012; Mold et al., 2004).

Die toxische Schädigung durch Medikamente, Genussmittel, industrielle Schadstoffe und andere Noxen führt überwiegend zu einer primär axonalen Schädigung mit gemischt sensiblen und motorischen PNP.

Chronischer Alkoholabusus kann aufgrund der damit einhergehenden Toxizität zu axonalen, langsam progredienten, distal betonten PNP führen. In Kombination mit dem bei Alkoholkranken häufig vorkommenden Thiaminmangel, bildet sich eine vornehmlich axonale PNP heraus, die oftmals von motorischen Ausfallerscheinungen begleitet wird und zunehmend progredient verlaufen kann (Blackstock et al., 1972; Dyck et al., 1968; Tredici & Minazzi, 1975) .

Eine medikamenteninduzierte PNP kann bei einer Vielzahl von Arzneimitteln auftreten. Immunmodulierende Medikamente (z.B. Thalidomid, Tacrolimus) können mitunter zu sensiblen, polyneuropathischen Symptomen führen (England & Asbury, 2004; Plasmati et al., 2007). Die neuroonkologischen Substanzen Vincristin und Cisplatin können ebenfalls eine PNP hervorrufen (England & Asbury, 2004; Herrlinger et al., 2010).

Autoimmun bedingte PNP wie das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN), akute motorische und sensible Neuropathie (AMSAN), die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP), die multifokale motorische Neuropathie (MMN) sowie die multifokal erworbene, demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie (MADSAM) resultieren in einer entzündlichen Autoimmunreaktion gegen Komponenten des peripheren Myelins.

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) führt mit einer jährlichen Inzidenz von 0,5-2 Fällen pro 100000 Einwohnern zu einer akuten, inflammatorischen und demyelinisierenden PNP. Der Erkrankung gehen häufig virale oder bakterielle Infekte der oberen Atemwege bzw. des Gastrointestinaltraktes voraus (Hughes et al., 2007; Loffel et al., 1977). Die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) sowie die akute motorische und sensorische Neuropathie (AMSAN) sind weitere, wenn auch seltene Verlaufs- und Sonderformen des Guillain-Barré-Syndroms. Ihnen liegt oftmals eine ebenso immunvermittelte Nervenaffektion zugrunde, die zu einer relativ schnellen aufsteigenden Parese führen kann. Je nach Schwere des Befalls von Axonen als auch Vorder- und Hinterwurzeln variiert der Grad der Wiederherstellung (Hiraga et al., 2003; Hiraga et al., 2005)

Die CIDP tritt mit einer Prävalenz von 0,5 - 1 pro 100000 Einwohnern auf. Zwar ist von einem Autoimmunprozess auszugehen, die genaue Pathogenese ist jedoch noch weitgehend unklar (Ho et al., 1999; Vallat et al., 2010).

Die multifokale motorische Neuropathie (MMN) stellt eine rein motorische Form der entzündlichen Neuropathien dar. Die Klinik umfasst neben progredienten, asymmetrischen Paresen mit Atrophien (Bein- und Armschwäche, asymmetrische Paresen der Arme) gelegentlich auch Faszikulationen. Atrophe Paresen und Faszikulationen als Frühzeichen der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) erschweren mitunter eine differentialdiagnostische Unterscheidung zur MMN (Van Asseldonk et al., 2005).

Die multifokale erworbene, demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie (MADSAM) ist eine weitere Variante der immunvermittelten Neuropathien. Klinisch zeigt sie sich als asymmetrische sensible und motorische Neuropathie an Armen und Beinen. Zunehmend progredient, führt die Erkrankung innerhalb von Monaten oder Jahren oft zu erheblichen Einschränkungen. Als Differentialdiagnosen sind spinale Muskelatrophie und amyotrophe Lateralsklerose abzugrenzen, welche jedoch rein motorische Erkrankungen darstellen.

Die Gruppe der autoimmunbedingten Kollagenosen manifestiert sich in erster Linie an Haut, Gelenken und inneren Organen, ein Befall des Nervensystems ist jedoch nicht selten. Peripher können sowohl isolierte Mononeuropathien, eine Mononeuro-

pathia multiplex als auch symmetrische PNP in Erscheinung treten. Auch die primär chronische Arthritis kann durch begleitende Arteriitiden zu PNP führen (Florica et al., 2011; Hietaharju et al., 1993).

Das Sjögren-Syndrom, eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung mit primärer Affektion von Speichel- und Tränendrüsen sowie rheumatischen Gelenksbeschwerden, zeigt neben zentralnervösen Komplikationen z.T. auch Symptome einer PNP (Gemignani et al., 1994).

Die ätiologisch und morphologisch heterogene Gruppe der Vaskulitiden manifestiert sich histologisch mit Entzündungen und Nekrosen von Blutgefäßen. Zentralnervöse sowie extrazerebrale Beteiligung in Form von Poly- und Mononeuropathien können das Organ der ersten fokalen Manifestation sein (Weyand & Goronzy, 2003). Das Churg-Strauss-Syndrom, eine granulomatöse, nekrotisierende Vaskulitis mit Eosinophilie, weist neben dem Leitsymptom der pulmonalen Manifestation häufig auch eine periphere Beteiligung in Form einer Mononeuritis multiplex auf (Rosenbaum, 2001). Neben PNP bei systemischen Vaskulitiden gibt es nicht-systemische Vaskulitiden, die nur das periphere Nervensystem betreffen.

Mangel- und Fehlernährung stellt in westlichen Ländern eine seltene Ursache für PNP dar, mit Ausnahme des Vitamin-B12-Mangels, welcher vor allem bei älteren Menschen häufig ist. In Industrieländern ist ein Vitaminmangel meist auf Alkoholabusus zurückzuführen, die neurotoxische Wirkung ist unter anderem Folge einer Mangelernährung. Ein Mangel an Thiamin (Vitamin-B1), Niacin, Vitamin-B12 und Vitamin-E führt mit einer Prävalenz von 2-8% zu PNP (Saperstein et al., 2003; Smith & Singleton, 2004).

Paraproteinämien finden sich bei circa 10% der demyelinisierenden PNP. Mehr als die Hälfte der Betroffenen hat eine monoklonale Gammopathie ungeklärter Signifikanz (MGUS), ein Drittel der Patienten hat eine diagnostizierte hämatologische Grunderkrankung (Ropper & Gorson, 1998; Van den Bergh et al., 2010).

Bei den hereditären PNP sind mehr als 40 verschiedenen Genmutationen beschrieben. Die außerordentliche Heterogenität der genetisch bedingten PNP erfordert zwecks

ätiologischer Diagnostik eine eingehende Familienanamnese sowie neben Elektrophysiologie gelegentlich auch nervenbiopsische, stoffwechselchemische und genetische Untersuchungen. Die hereditäre motorische und sensible Neuropathie (HMSN) ist die häufigste Form der hereditären Neuropathien mit einer Prävalenz von 1:2500. HMSN unterteilt sich aufgrund unterschiedlicher Charakteristika u.a. hinsichtlich Erbgang, Krankheitsbeginn, Symptomatik, Ergebnisse aus Elektrophysiologie und Haut- und Nervenbiopsie. CMT 1A ist der am häufigste vertretene HSMN-Typ gefolgt von CMT X1, HNPP, CMT 1B sowie CMT 2A (Reilly & Shy, 2009; Saporta et al., 2011).

1.5 Diagnostik der PNP

Anamnese, Schilderung der Beschwerdesymptomatik und klinische Untersuchung bilden die Basis der klinischen (Differential-) Diagnostik einer PNP sowie zu deren Einteilung in unterschiedliche Manifestationstypen (England & Asbury, 2004; Heuss et al., 2012; Watson & Dyck, 2015).

Die Anamnese bei Verdacht auf PNP beinhaltet eine Familienanamnese, Abklärung internistischer Vorerkrankungen, Hinweise auf exogen-toxische Einflüsse (Alkohol, Drogen, Medikamente) sowie Exploration möglicher schädlicher Expositionen am Arbeitsplatz. Die Erfassung des neurologischen Ausfallmusters wie Sensibilitäts- und Reflexstörungen, Gleichgewichts- und Koordinationsstörungen oder motorische Defizite gibt erste Hinweise auf charakteristische polyneuropathische Muster.

Laboratorische Basisuntersuchungen sollten zunächst primär häufige Ursachen von PNP erfassen. Dazu zählt die Erhebung folgender Parameter: BSG, CRP, Differentialblutbild, Elektrolyte, Nieren-/Leberwerte, TSH, Serumelektrophorese mit Immunfixation, Bence-Jones-Proteinurie. Stets sollte mittels Nüchternblutzucker, oralem Glukosetoleranztest sowie HbA1c ein Diabetes mellitus ausgeschlossen werden. Pathologische Werte für Transaminasen und MCV können den Verdacht auf eine alkoholinduzierte PNP lenken. Ein Vitamin B 12-Mangel könnte den Verdacht auf eine funikuläre Myelose begründen. Je nach Untersuchungsergebnis und klinischem Verdacht, kann die laboratorische Basisdiagnostik erweitert werden (Rheumafaktor, (Auto-) Antikörper, Immunkomplexe, Liquoranalyse u.a.).

Elektrophysiologische Untersuchungen (Elektromyographie, Elektroneurographie) ermöglichen die Klassifikation der PNP nach Schädigungsmuster (axonal oder demyelinisierend), beteiligten Nervenfaserklassen (motorisch, sensibel, sensomotorisch), sowie Verteilungsmuster (symmetrisch, asymmetrisch).

Ergänzend kann mit quantitativen sensorischen Tests (QST) an Händen und Füßen die Reizschwelle dünn-myelinisierter A-Delta Fasern und unmyelinisierter C-Fasern erfasst werden (Magerl et al., 2010; Rolke et al., 2006). Die Funktion groß- und klein-kalibriger Nervenfasern in der Haut sowie die Weiterleitung und -verarbeitung von

Stimuli in Rückenmark und Gehirn wird untersucht. Individuell unterschiedliche thermische und mechanische Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen in der Haut weisen auf Symptome hin, die auf pathologischen neurobiologischen Mechanismen in Folge von Neuropathien basieren (mechanische/thermische Hyperalgesie, mechanische Allodynie u.a.). Die Testung der Sensibilität der Haut gegenüber Wärme- und Kältereizen, Berührungen, mechanischen Reizen (mittels spitzen und stumpfen Nadeln) und Vibration liefert ein individuelles diagnostisches Profil, das wichtige Informationen über neurologische Ausfallmuster im Rahmen von Nervenschädigungen unterschiedlicher Genese liefert.

Hautstanzbiopsien können je nach Verteilungsmuster an ausgewählten Stellen des Körpers erfolgen und ermöglichen die quantitative bzw. semi-quantitative Analyse der dermalen Innervation (Lauria, 2010). Kann bei progredienter PNP oder Verdacht auf inflammatorische PNP mit weniger invasiven Methoden keine Diagnose gestellt werden, bietet die Biopsie des rein sensiblen Nervus suralis eine weitere diagnostische Möglichkeit (Collins et al., 2000; Sommer et al., 2010).

Genetische Untersuchungen sind bei positiver Familienanamnese und Anzeichen hereditärer PNP indiziert (Reilly & Shy, 2009; Saporta et al., 2011).

1.6 Hautbiopsien als minimal-invasives Instrument der molekularen Analyse von Nervenfasern

Die klinisch-neurologische PNP-Basisdiagnostik wird je nach Fragestellung um elektrophysiologische Untersuchungen (Neurographie, Elektromyogramm) ergänzt. Mit der konventionellen Neurographie werden allerdings lediglich myelinisierte Nervenfasern größeren Durchmessers erfasst. Nervenfasern kleineren Kalibers und freie Nervenendigungen, die sich in der Peripherie befinden, werden nicht erfasst (Heuss et al., 2012; Provitera et al., 2007; Sommer, 2001).

Sofern bei progredienter PNP mit weniger invasiven Methoden keine Diagnose gestellt werden kann, erfolgt oftmals die invasive, chirurgische Biopsie des Nervus suralis (England et al., 2009; Heuss et al., 2012; Sommer et al., 2010).

Hautbiopsien haben sich als weniger invasive Ergänzung zur Suralisbiopsie mit einem geringen Nebenwirkungsrisiko entwickelt. Die Analyse unmyelinisierter Nervenfasern in Hautproben wurde erstmals durch Antikörper gegen das zytoplasmatische, neuronale Protein PGP 9.5 (protein gene product) ermöglicht (Dalsgaard et al., 1989; Lauria et al., 2004; Nolano et al., 2003; Rode et al., 1985). Hautbiopsien erweitern die Diagnostik bei einer progredienten, neuropathischen Symptomatik unbekannter Ursache und z.B. klinischem Verdacht auf eine Small-fiber-Neuropathie (SFN) (Baron et al., 2010).

Immunohistochemie ermöglicht die Analyse von kleinen und großen Nervenfasern. Fasern kleinen Durchmessers sind in Form von freien, dünn-myelinisierten sowie unmyelinisierten Nervenendigungen in dermalen und epidermalen Hautschichten lokalisiert. Die Morphologie dermalen Nervenfasern lässt sich in der Haut gezielt untersuchen (Heuss et al., 2012; Polydefkis et al., 2002; Provitera et al., 2007).

Die Diagnose einer SFN aus der Hautbiopsie basiert auf der Ermittlung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD). Bei Patienten mit SFN konnte durch Nachweis einer Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) die Erkrankung mit hoher Sensitivität und Spezifität diagnostiziert werden (Koskinen et al., 2005; Vlčková-Moravcová et al., 2008).

Hautbiopsien waren lange Zeit auf die Analyse von unmyelinisierten, intraepidermalen Nervenfasern beschränkt. Myelinisierte Nervenfasern wurden bislang wenig untersucht (Myers et al., 2013). Myelinisierte Nervenfasern innervieren in behaarter Haut vor allem Haarfollikel und vaskuläre Strukturen. Da Haarfollikel als Mechanorezeptoren fungieren, kann ein Verlust der Innervation durch myelinisierte Nervenfasern ein Indiz für eine PNP sein (Doppler et al., 2012; Myers et al., 2013; Nolano et al., 2003; Provitera et al., 2007).

Struktur und genetische Codierung des Myelins von dermalen Nervenfasern und Suralisnerv unterscheiden sich nicht (Sommer & Lauria, 2007). Die Überprüfung von Krankheitsverlauf oder Therapieerfolg lässt sich mittels Hautstanzbiopsie im Gegensatz zur Nervenbiopsie wiederholt durchführen (Li et al., 2005; Polydefkis et al., 2002).

Das Potential von Hautbiopsien als minimal-invasive Ergänzung zur Nervenbiopsie bei der Untersuchung myelinisierter Nervenfasern wurde bereits in mehreren Studien aufgezeigt (Nolano et al., 2003; Polydefkis et al., 2002; Provitera et al., 2007). Behaarte Haut verfügt über eine hohe Dichte unmyelinisierter Nervenfasern. Die Analyse myelinisierter Nervenfasern hingegen kann in behaarter Haut aufgrund ihres dort geringeren Vorkommens erschwert sein (Li et al., 2005). Myelinisierte Nervenfasern sind in höherer Dichte in unbehaarter Haut (v.a. der oberen Extremitäten) lokalisiert, wo sie u.a. die nur in unbehaarter Haut vorkommenden Meissner-Körperchen (Mechanorezeptoren für den Tastsinn) innervieren (Ballin & Thomas, 1969; Bonnaud-Toulze & Raine, 1980; Nolano et al., 2003; Provitera et al., 2007). Morphologisch zeigen sich in behaarter und unbehaarter Haut keine Unterschiede (Arroyo & Scherer, 2000; Myers et al., 2013; Nolano et al., 2003; Provitera et al., 2007; Scherer & Arroyo, 2002).

Hautbiopsien können in der Regel die Ursache der meisten Neuropathien nicht nachweisen. Oftmals stellt sich die dermale Innervation in demyelinisierenden Neuropathien als normal dar, so dass v.a. bei entzündlichen Neuropathien wie der vaskulitischen PNP und CIDP neben Elektrophysiologie eine Suralisbiopsie erforderlich wird (Sommer & Lauria, 2007).

1.7 Reorganisation nodaler Membranproteine infolge demyelinisierender PNP

Myelinisierende Schwann-Zellen sind an der Organisation der axonalen Membran maßgeblich beteiligt (Arroyo et al., 2002). Die charakteristische Anordnung der molekularen Organisation von Membranproteinen entlang myelinisierter Nervenfasern ist für die Fortleitung von Nervenimpulsen von großer Bedeutung (Dupree et al., 1999). Für die saltatorische Reizweiterleitung ist die molekulare Architektur der Ranvier-Schnürringe substanziell für die Axon-Schwann-Zell-Interaktion (Cifuentes-Diaz et al., 2011; Dzhashvili et al., 2007). Myelinisierte Axone enthalten spezifische strukturelle Regionen mit charakteristischen Membranproteinen: das axonale Initial-Segment (AIS), Ranvier-Schnürringe (engl. „Nodes“) sowie Para-, Juxta- und Internodien (Salzer, 1997; Wang et al., 1993; Waxman & Ritchie, 1993).

Das Strukturprotein *MBP* (myelin basic protein) ist im internodalen Bereich lokalisiert. *MBP* ist neben weiteren Myelin-Strukturproteinen an der Bildung des Myelin-Hülle beteiligt (Poliak & Peles, 2003). *Caspr* (Contactin-associated-protein bzw. Paranodin) ist in der paranodalen Region lokalisiert und partizipiert an der Interaktion von Schwann-Zelle und Axon sowie der elektrischen Isolation der nodalen Region (Myers et al., 2013; Poliak et al., 1999). *Natrium*-Kanäle konzentrieren sich in der nodalen Region und sind maßgeblich an der axonalen Depolarisation im Rahmen der Generierung von Aktionspotentialen beteiligt (Boiko et al., 2001; Caldwell et al., 2000; Rasband et al., 2003; Sherman & Brophy, 2005). *Neurofascin-155* ist an der Organisation axo-glialer Verbindungsstellen der paranodalen Region durch Bindung an den Caspr-Contactin-Komplex beteiligt (Charles et al., 2002; Sherman et al., 2005).

Bei demyelinisierender PNP erfolgt eine Reorganisation der nodalen Membranproteine mit in der Folge fehlerhafter Axon-Schwann-Zell-Interaktionen. Juxtaparanodale Proteine waren in vorherigen Studien nach Verlust der axonalen Myelin-Umhüllung in paranodalen Regionen nachweisbar (Arroyo et al., 2002; Poliak & Peles, 2003; Rasband et al., 1998). Das paranodale Protein Caspr zeigte sich im Tiermodell nach axonaler Reorganisation diffus über den internodalen Bereich verstreut (Scherer & Arroyo, 2002).

In humanen Nervenbiopsien wurde zuvor bereits die Möglichkeit der Unterscheidung von CIDP bzw. CIAP (Chronisch idiopathische axonale PNP) durch Nachweis einer Dispersion von Caspr als Indikator aufgezeigt (Cifuentes-Diaz et al., 2011). In Nervenbiopsien von CIDP-Patienten war Caspr mehrheitlich entlang des Axons nachweisbar während sich die Caspr-Färbung in Fällen einer CIAP auf den paranodalen Bereich beschränkte.

In einer weiteren Studie an humanen Hautbiopsien war eine Dispersion des axonalen paranodalen Proteins Caspr mehrheitlich bei demyelinisierenden Neuropathien im Vergleich zu axonalen Neuropathien nachweisbar (Doppler et al., 2013).

Daneben konnte in allen Fällen einer CIDP, die die diagnostischen Kriterien der Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group erfüllten (INCAT positiv), eine Dispersion von Caspr beobachtet werden. Zu den INCAT-Kriterien sei auf Hughes et al. (2001) und Tabelle 18 im Anhang verwiesen. Proben von gesunden Kontrollprobanden zeigten hingegen eine symmetrische Anordnung von Caspr auf beiden Seiten der Ranvierschen Schnürringe ohne Nachweis einer Dispersion.

Eine Arbeit an Hautbiopsien von Patienten mit CMT Typ 1A, einer distal symmetrischen sensomotorischen PNP infolge von Mutationen des Myelin-Proteins PMP22, konnte keine Dispersion von Caspr nachweisen (Saporta et al., 2009). Caspr war sowohl bei CMT-Patienten als auch in Hautproben gesunder Probanden bilateral der Ranvierschen Schnürringe lokalisiert.

Eine im Tiermodell induzierte Demyelinisierung mit darauffolgender Remyelinisierung zeigte eine Dispersion nodaler Natrium-Kanäle (Dugandzija-Novaković et al., 1995; Novakovic et al., 1996). In einer weiteren Studie konnte hingegen im Tiermodell aufgezeigt werden, dass die Verteilung von Natrium-Kanälen trotz gestörter Anordnung von Caspr nahezu unbeeinträchtigt geblieben war (Boyle et al., 2001). Die Elimination des paranodalen Membranproteins Caspr im Tiermodell resultierte in einer zunehmend diffusen, nodalen Anordnung der Natrium-Kanäle (Sherman et al., 2005). Daneben konnte in weiteren tierexperimentellen Studien eine Desorganisation der Natrium-Kanäle im Bereich von Ranvier-Schnürringen bei akuter inflammatorischer

demyelinisierender Polyneuropathie (AIDP) und akuter motor axonaler Neuropathie (AMAN) aufzeigt werden (Novakovic et al., 1998; Susuki et al., 2007).

Eine pathologische Veränderung der nodalen Distribution von Natrium-Kanälen in menschlichen Haut- und Nervenproben als Folge demyelinisierender PNP war hingegen in zahlreichen Studien nicht nachweisbar: Eine Studie an Biopsien des Nervus peroneus von Patienten mit CIDP bzw. CIAP zeigte eine mehrheitlich unauffällige Anordnung von Natrium-Kanälen (Cifuentes-Diaz et al., 2011). Sowohl in Nervenproben von CIDP- als auch von CIAP-Patienten ließen sich allerdings punktuelle Verteilungen von Natrium-Kanal-Anfärbungen entlang des gesamten Axons immunohistochemisch nachweisen. Das hier beobachtete Verteilungsmuster von Natrium-Kanal-Färbungen wurde zuvor bereits als Folge einer Remyelinisierung bei regenerierenden Axonen nach Nervenverletzung im Tiermodell beschrieben (Foster et al., 1980).

Eine weitere Arbeit untersuchte in Hautbiopsien von Patienten mit demyelinisierender bzw. axonaler PNP u.a. die Verteilung der Natrium-Kanal-Distribution entlang von myelinisierten Nervenfasern. Hier wurden keine pathologischen Verteilungsmuster entlang des Axons beobachtet, die Lokalisation der Natrium-Kanäle beschränkte sich auf die nodale Region im Bereich der Ranvierschen Schnürringe (Doppler et al., 2013)

In Hautproben von Patienten mit CMT konnte in myelinisierten Nervenfasern ebenfalls keine veränderte Distribution von Natrium-Kanälen nachgewiesen werden. Natrium-Kanäle konzentrierten sich im Bereich der Ranvier-Schnürringe (Li et al., 2005). Eine Dispersion von Natrium-Kanälen vom Ranvier-Schnürring aus in paranodale bzw. juxtanodale Regionen wurde in einer weiteren Studie an Proben myelinisierter dermaler Nervenfasern von Patienten mit CMT und CIDP nicht beobachtet (Saporta et al., 2009). Auch hier waren Natrium-Kanäle auf die Region der Ranvier-Schnürringe begrenzt.

Eine tierexperimentelle Studie zur experimentellen allergischen Neuritis (EAN), einem Tier-Modell des Guillain-Barré-Syndroms, konnte bei den meisten Nervenfasern des Plexus lumbalis mit verlängerten Ranvier-Schnürringen eine diffuse Anfärbung von Natrium-Kanälen aufzeigen (Lonigro & Devaux, 2009).

Das Membranprotein Neurofascin in dermalen myelinisierten Nervenfasern gesunder Probanden ist im nodalen und paranodalen Bereich lokalisiert (Doppler et al., 2013). Eine Dispersion von Neurofascin war v.a. in Fällen demyelinisierender Neuropathien zu beobachten. Der Nachweis einer Dispersion von Neurofascin entlang Axonen mit Ranvierschen Schnürringe normaler Länge wurde in der o.g. Arbeit als ein mögliches frühes pathologisches Zeichen gewertet.

Eine weitere Arbeit zur pathologischen Reorganisation des Membranproteins Neurofascin beschränkt sich auf Tierexperimente. Hier konnte im Tiermodell einer demyelinisierenden, experimentellen allergischen Neuritis (EAN) eine verminderte Anfärbung von Neurofascin an Nerven des Plexus lumbalis aufgezeigt werden (Lonigro & Devaux, 2009).

Als ein weiteres mögliches Zeichen einer veränderten nodalen Organisation infolge demyelinisierender PNP wurden in mehreren Arbeiten verlängerte Ranvier-Schnürringe in dermalen Nervenfasern beschrieben. Autoimmunvermittelte Neuropathien wie z.B. das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) greifen teilweise spezifische Membranproteine der nodalen und paranodalen Region an. Als frühes pathologisches Zeichen einer veränderten nodalen Organisation wurden verlängerte Ranviersche Schnürringe beschrieben (Griffin et al., 1996). Verlängerte Ranvier-Schnürringe konnten in Fällen INCAT-positiver CIDP nachgewiesen werden (Doppler et al., 2013; Saporta et al., 2009). Eine Studie konnte verlängerte Ranvier-Schnürringe in wenigen Fällen demyelinisierender Neuropathien nachweisen, axonale Neuropathien waren hingegen nicht betroffen (Doppler et al., 2012). Eine weitere Arbeit konnte verlängerte Ranvier-Schnürringe mehrheitlich in Hautproben von Patienten mit einer demyelinisierenden Neuropathie aufzeigen. Nur wenige Fälle axonaler und gemischter Neuropathien waren betroffen (Doppler et al., 2013).

Verlängerte Ranviersche Schnürringe wurden in einer weiteren Arbeit bei der Mehrzahl der Schnürringe in Hautbiopsien von CIDP-Patienten mit positivem Nachweis von Anti-Contactin-1 Autoantikörpern beschrieben (Doppler et al., 2015). Daneben konnten bei dieser vermutlich durch Autoantikörper vermittelten Form einer inflammatorischen Neuropathie auch eine verminderte Anfärbung der paranodalen Membranproteine Caspr und Neurofascin beobachtet werden. Patienten mit GBS

zeigten keine derartig verlängerten Schnürringe bzw. keine verminderte Anfärbung o.g. Membranproteine. CIDP-Patienten mit negativem Autoantikörpernachweis wiesen eine im Median geringere Anzahl an verlängerten Schnürringen sowie keine verminderte Anfärbbarkeit o.g. Membranproteine auf.

1.8 Gewebeeinfiltration durch Entzündungszellen bei PNP

Makrophagen und T-Zellen sind als inflammatorische Zellen an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen durch Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine des Immunsystems (TNF-alpha, Interleukin-Familie IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 u.a.) beteiligt.

Makrophagen gelten als wesentliche Mediatoren inflammatorischer Neuropathien. Als ein Zeichen demyelinisierender Neuropathien siedeln sich neben den ortsansässigen Makrophagen weitere Makrophagen am Ort der peripheren Nervenschädigung an. Eine Untersuchung von Patienten mit GBS und CIDP konnte Makrophagen elektronenmikroskopisch in unmittelbarer Nähe zu Nervenfasern nachweisen. (Griffin et al., 1993; Griffin et al., 1990). Eine weitere Arbeit wies in peripheren Nervenfasern von Patienten mit AMAN Makropagen in unmittelbarer Nähe der Ranvierschen Schnürringe elektronenmikroskopisch nach (Griffin et al., 1996).

T-Zellen setzen nach Schädigung peripherer Nerven proinflammatorische Zytokine frei und sind u.a. an der Entwicklung neuropathischer Schmerzen beteiligt (Cui et al., 2000; Moalem et al., 2004). Im Tiermodell demyelinisierender bzw. axonaler PNP konnte nach mechanisch induzierter Nervenläsion eine Infiltration von T-Zellen und Makrophagen in naher Beziehung zu peripheren Nerven aufgezeigt werden (Stoll et al., 2002).

1.9 Zielsetzung und Fragestellung der Studie

Es sollte untersucht werden, ob sich in Hautproben von PNP-Patienten Veränderungen der nodalen und paranodalen Struktur darstellen lassen. Zudem wurde die Frage gestellt, ob myelinisierte Nervenfasern in der Haut bei PNP mit Entzündungszellen (Makrophagen und T-Zellen) kolokalisiert sind.

1.9.1 Zielsetzung

1. Analyse nodaler Auffälligkeiten an Ranvier-Schnürringen myelinisierter Nervenfasern
2. Untersuchung myelinisierter Nervenfasern auf Kolokalisation von Entzündungszellen (Makrophagen und T-Zellen)
3. Evaluation der Nutzung von Hautbiopsien als zusätzliches diagnostisches Instrument der PNP-Diagnostik

1.9.2 Hypothese

1. Ranvier-Schnürringe und ihre paranodalen Regionen unterscheiden sich nach PNP-Subgruppen und Schädigungsmuster.
2. Entzündungszellen (Makrophagen und T-Zellen) sind an myelinisierten Nervenfasern bei PNP-Patienten lokalisiert.
3. Als minimal-invasives Diagnoseinstrument bieten Hautbiopsien bei Verdacht auf PNP einen zusätzlichen Nutzen zur Basisdiagnostik.

2 Material und Methoden

2.1 Einschlusskriterien für die Studienteilnahme

Die Teilnahme der Patienten an der Studie erfolgte freiwillig. Nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung sowie ausreichender Bedenkzeit erfolgte das schriftliche Einverständnis der Patienten zur Teilnahme an der Studie. Die Befürwortung der Studie durch die Ethikkommission der Universitätsklinik Würzburg lag vor (Aktenzeichen 1/11).

Im Zeitraum zwischen Oktober 2012 und November 2013 erfolgte die prospektive Rekrutierung von 92 Patienten, die sich zur diagnostischen Abklärung oder Therapie einer PNP in der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg aufhielten. Die klinische Diagnostik der Patienten erfolgte analog zu den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Heuss et al., 2012).

Von jedem Patienten wurden Anamnese, körperliche und neurologische Untersuchung sowie neurophysiologische Diagnostik erhoben. An Laboruntersuchungen wurden kleines Blutbild und Differentialblutbild erhoben, Elektrolyte, Nieren-, Leber-, Schilddrüsenfunktionsparameter, die Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) sowie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Zum Ausschluss einer Glukoseverwertungsstörung im Sinne eines Diabetes mellitus oder einer Glukoseintoleranz wurden Nüchternblutzucker und HbA1c-Wert bestimmt sowie ein oraler Glucosetoleranztest durchgeführt. Zur Abklärung einer funikulären Myelose wurde der Vitamin-B-12-Spiegel bestimmt. Während des stationären Aufenthalts erhielten die Patienten eine erweiterte laboratorische Diagnostik um Hinweise auf Vaskulitiden, Neuroborreliose, Paraproteinämie, Sarkoidose, Malresorption oder eine multifokale motorische Neuropathie zu erhalten. Zur Ergänzung der klinischen Untersuchung erhielten die Patienten eine neurophysiologische Untersuchung der oberen und unteren Extremitäten.

Die Hautstanzbiopsie von Ober- und Unterschenkel wurden als Teil der Standarddiagnostik entnommen. Für die Studie erfolgte als zusätzliche Lokalisation eine Biopsie des Fingers. Sofern bei progredienter PNP oder Verdacht auf inflammatorische PNP mit weniger invasiven Methoden keine Diagnose gestellt werden konnte, erfolgte die Biopsie des Nervus suralis.

Ausschlusskriterien der Studie waren bekannte Kontraindikationen zur Durchführung einer Hautbiopsie wie z.B. Wundheilungsstörungen oder Entzündungszeichen im zu biopsierenden Hautgebiet. Patienten mit einer Medikation von Marcumar-Derivaten sowie therapeutischen Antikoagulantien wie z.B. Heparin wurden aufgrund möglicher Blutungskomplikationen nach einer Biopsie von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Patienten mit Gewebeproben von Ober- und Unterschenkel jedoch ohne Biopsie des lateralen Zeigefingers wurden nicht in die Studie einbezogen. Weitere Ausschlusskriterien der Studie waren eine bekannte Unverträglichkeit auf das zu verwendende Haut-Desinfektionsmittel sowie das Lokalanästhetikum.

2.2 Klinisch-diagnostische Testverfahren zur Erfassung des Schweregrades von PNP

Der Schweregrad der PNP wurde bei den Studienteilnehmern anhand der klinisch-diagnostischen Bewertungstests Medical Research Council Score, Overall Disability Sum Score und dem modifizierten Toronto Clinical Neuropathy Score evaluiert.

2.2.1 Medical Research Council Score (MRC)

Der Medical Research Council Score (MRC) erfasst die Muskelkraftgrade von jeweils sechs Muskelgruppen der unteren und oberen Extremität auf einer Skala von 0 (vollständige Paralyse) bis 5 (normale Muskelkraft). Anschließend erfolgt die Summierung der einzelnen Kraftgrade und Einordnung der Werte auf einer Skala von 0 (Plegie) bis 60 (normale Kraft) (Merkies et al., 2003).

2.2.2 Overall Disability Sum Score (ODSS)

Der Overall Disability Sum Score (ODSS) misst den Grad der Beeinträchtigung der Arm- und Beinfunktion durch neuropathische Symptome (Merkies et al., 2002). Obere und untere Extremität werden gesondert bewertet. Die Funktion der Arme wird auf einer Skala von 0 (normale Funktion) bis 5 (Schwere Symptome in einem oder beiden Armen) erfasst. Die Beeinträchtigung für Beine wird auf einer Skala von 0 (normale Funktion) bis zu einem Maximalwert von 7 evaluiert (Patient verbringt die meiste Zeit im Rollstuhl oder Bett, zielgerichtete Bewegungen mit den Beinen nicht möglich). Durch Addition der Werte für Arme und Beine ergibt sich der ODSS-Gesamtwert mit einer Spannweite von 0 (Keine Anzeichen einer Funktionsbeeinträchtigung) bis 12 (maximale Funktionsbeeinträchtigung).

2.2.3 Toronto Clinical Neuropathy Score (TCNS)

Der modifizierte Toronto Clinical Neuropathy Score (TCNS) erfasst quantitativ neuropathische Symptome und sensible Beeinträchtigungen (Bril et al., 2009).

Symptomale Komponenten wie Fußschmerz, Taubheitsgefühl, Parästhesien, Muskelschwäche, Ataxie und Symptome an der oberen Extremität werden auf einer Skala von 0 (keine Symptomatik) bis 3 (Symptom vorhanden, interferiert sowohl mit Wohlbefinden als auch mit Alltagsaktivitäten) erfasst.

Daneben erfolgt die sensible Testung mittels Pinprick, Vibration, Berührung, Lage-sinn, Warm-/Kaltdiskrimination auf einer Skala von 0 (normal) bis 3 (Sensorik reduziert bis oberhalb Knöchel und/oder abwesend an den Zehen). Der maximal zu erreichende Wert der insgesamt elf Komponenten des TCNS liegt bei 33 Punkten.

2.3 Durchführung der Hautstanzbiopsien

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten erhielten analog zu vorherigen Studien (Doppler et al., 2013; Li et al., 2005; Myers et al., 2013; Üçeyler et al., 2010) Hautstanzbiopsien von folgenden Körperstellen: proximaler Oberschenkel (OS) circa 10-15 cm distal der Spina iliaca anterior superior, distaler Unterschenkel (US) circa 10 cm proximal des Malleolus lateralis sowie lateraler Zeigefinger (Fi) zwischen interphalangealen und palmophalangealen Gelenk. Jede der in die Studie eingeschlossenen Hautbiopsien enthielt Epidermis und oberflächliche Dermis mit subpapillären und retikulären Anteilen (Sommer & Lauria, 2007).

Die präoperative Hautdesinfektion wurde mit dem farblosen Hautantiseptikum Cutasept F[®] (arzneilich wirksame Bestandteile laut Hersteller Bode Chemie: Propan-2-ol, Benzalkoniumchlorid, gereinigtes Wasser) ausgeführt. Nach initialer Desinfektion mittels Sprühverfahren erfolgte ein Anrieb der Hautareale mittels Tupfer. Die vom Hersteller empfohlenen Einwirkzeiten wurden eingehalten. Anschließend wurde die Lokalanästhesie mittels Injektion von Lidocain durchgeführt. Die Einweg-Stanzen (Firma Stiefel GmbH, Offenbach, Deutschland) in den Größen 5 mm Durchmesser (für behaarte Haut an Ober- und Unterschenkel) und 3 mm Durchmesser (unbehaarte Haut am lateralen Zeigefinger) wurden im rechten Winkel auf die entsprechenden Hautstellen aufgesetzt. Unter simultanen Vorschieben und Drehung im Uhrzeigersinn wurde die Stanze bis zu einer Tiefe von ca. 5 mm (OS und US) bzw. 3 mm (Fi) in der Haut platziert. Anschließend konnten die Hautproben nach Zurückziehen der Stanze mittels einer Pinzette entnommen werden.

Die Wunde wurde nach initialer Kompression mit sterilen Tupfern mit 3M™Steri-Strip™-Wundverschlussstreifen und Wundpflastern versorgt.

2.4 Gewebeaufbereitung der Hautstanzbiopsien

Die Gewebeprobe wurde unmittelbar nach Entnahme in jeweils zwei Hälften geteilt und in Probenbehältern platziert. Jeweils eine Probenhälfte von Ober- und Unterschenkel wurde für zukünftige Studien mit quantitativer real-time PCR nativ tiefgefroren. Die andere Hälfte der Hautproben von Oberschenkel, Unterschenkel und die ganze Biopsie vom Finger wurden für die folgende histologische Weiterverarbeitung in Probenbehältern mit 4% Paraformaldehyd (PFA) deponiert.

Die Hautproben wurden für 30 Minuten in PFA bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurde das Gewebe dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und über Nacht in 10 % Saccharose-Lösung (10g Saccharose in 100ml Phosphatpuffer) bei Kühlschranktemperatur (+4° Celsius) gelagert. Am Folgetag wurden die Biopsien nach Verwerfen der Saccharose-Lösung in das Medium Tissue Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande) eingebettet. Im Anschluss wurde das Einbettmedium in einen mit 2-Methylbutan (M:72,15 g/mol; Dichte 0,62; Fa. Roth, Karlsruhe) befüllten Behälter platziert, der danach für 30 Sekunden in ein weiteres Behältnis mit Flüssigstickstoff gegeben wurde um die Hautbiopsien einzufrieren.

Nach Lagerung bei -20°C für 10 Minuten, wurden die Proben in Röhrchen gelegt mit folgender Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Verwendung. Mithilfe eines Cryostats (Leica Biosystems, Wetzlar) wurden die Hautproben in 50 µm dünne Schnitte geschnitten. Drei Serienschnitte wurden anschließend auf einen mit Super Frost beschichteten Objektträger platziert (Fa. R. Langenbrick, Emmendingen), für 30 Minuten luftgetrocknet und über Nacht bei -20°C gelagert.

2.5 Immunohistochemische Aufbereitung der Hautstanzbiopsien

Die zuvor eingefrorenen 50µm Schnitte wurden für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Um die gewünschte Menge an Antikörperlösung im Zielbereich zu halten und einen Verlust durch Verlaufen der Flüssigkeit auf dem Objektträger zu minimieren, wurden die Gewebeproben mit einem hydrophoben PAP-Stift (Peroxidase-Anti-Peroxidase) umrandet und in eine feuchte Kammer gelegt.

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers im Gewebe und einer daraus resultierenden, unspezifischen Hintergrundfärbung wurde eine Lösung aus 10% BSA (Bovines Serum Albumin; Fa. Sigma) in PBS auf die Objektträger pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde BSA/PBS von den Objektträgern abgekippt.

Die immunohistochemische Doppelfärbung erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Die Inkubation der Primärantikörper verlief an Tag 1, die des Sekundärantikörpers an Tag 2.

Tabelle 1 zeigt die für die immunohistochemischen Doppelfärbungen verwendeten Antikörper-Kombinationen.

Tabelle 1: Antikörper-Kombinationen für die Immunofluoreszenz

Kombination	Spezifität	Antikörper 1	Konzentration	Antikörper 2	Konzentration
1	Primärantikörper	Caspr (rabbit)	1:1000	MBP (mouse)	1:200
	Sekundärantikörper	Alexa-Fluor 488 (donkey-anti-rabbit)	1:200	Cy3 (donkey-anti-mouse)	1:50
2	Primärantikörper	Neurofascin (rabbit)	1:400	MBP (mouse)	1:200
	Sekundärantikörper	Alexa-Fluor 488 (donkey-anti-rabbit)	1:200	Cy3 (donkey-anti-mouse)	1:50
3	Primärantikörper	MBP (rabbit)	1:1000	Pan-Na ⁺ -Kanal (mouse)	1:100
	Sekundärantikörper	Alexa-Fluor 488 (donkey-anti-rabbit)	1:200	Cy3 (donkey-anti-mouse)	1:50
4	Primärantikörper	PGP (rabbit)	1:800	MBP (mouse)	1:200
	Sekundärantikörper	Alexa-Fluor 488 (donkey-anti-rabbit)	1:200	Cy3 (donkey-anti-mouse)	1:50
5	Primärantikörper	MBP (rabbit)	1:1000	CD3 (mouse)	1:100
	Sekundärantikörper	Cy3 (donkey-anti-rabbit)	1:50	Alexa-Fluor 488 (donkey-anti-mouse)	1:200
6	Primärantikörper	MBP (rabbit)	1:1000	CD68 (mouse)	1:1000
	Sekundärantikörper	Cy3 (donkey-anti-rabbit)	1:50	Alexa-Fluor 488 (donkey-anti-mouse)	1:200

An Tag 1 wurde zunächst der Primärantikörper (siehe Tabelle 1) in 1% BSA/PBS (1ml 10% BSA + 9ml PBS) verdünnter Lösung unter Zugabe von 0,3% Triton-X-100

(1ml der 1% BSA/PBS-Lösung in 3 μ l Triton-X) zu je 50-100 μ l auf die Objektträger aufgetragen. Über Nacht erfolgte die Inkubation in feuchter Kammer bei 4° Celsius im Kühlschrank (siehe Abbildung 1).

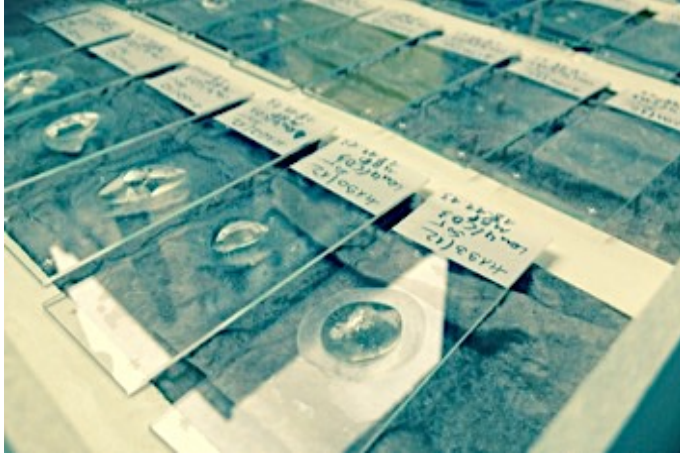


Abbildung 1: Objektträger in feuchter Kammer

An Tag 2 erfolgte zunächst eine dreimalige, je 5-minütige Waschung der Objektträger in PBS um nicht gebundene Antikörper zu entfernen (siehe Abbildung 2).

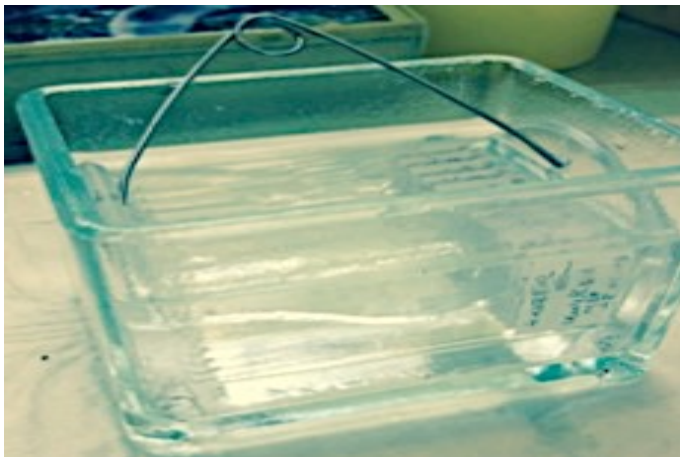


Abbildung 2: Waschung der Objektträger in PBS

Der jeweilige Sekundärantikörper (siehe Tabelle 1) wurden in 1% BSA/PBS verdünnter Lösung zu je 50-100 μ l auf die Objektträger aufgetragen und anschließend für die Dauer von zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch diesen Vorgang bindet der Sekundärantikörper spezifisch an den Primärantikörper und kann mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes am Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Nach der Inkubation erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen der Objektträger in PBS. Im Anschluss daran wurde zur Stabilisierung der Fluoreszenz und zur Hemmung der Ausbleichung von Fluorochrom-Konjugaten sowie zur Anfärbung von Zellkernen das Reagenz Vectashield[®] mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) auf die Objektträger pipettiert.



Abbildung 3: Eindecken der Objektträger mit Vectashield, DAPI und Deckglas

Nachfolgend wurden die Objektträger mit Deckgläsern versehen und mit lichthärtendem Deckglaslack umrandet (siehe Abbildung 3). Als mikroskopische Dauerpräparate konnten die Objektträger anschließend bis zur mikroskopischen Auswertung in der Kühlkammer bei -20° Celsius aufbewahrt werden.

2.6 Histologische Auswertung der Hautstanzbiopsien

Das histologische Hautmaterial umfasste jeweils drei Serienschritte von 92 Patienten. Jeder Studienteilnehmer erhielt Hautstanzbiopsien von Oberschenkel, Unterschenkel sowie Finger. Die standardisierte Auswertung des zahlencodierten Biopsiematerials erfolgte verblindet. Weder klinische noch histologische Diagnose waren für den Untersucher einsehbar.

Die immunohistochemische Färbung umfasste folgende sechs Doppelfärbungen:

- anti-MBP/anti-Caspr,
- anti-MBP/anti-Neurofascin
- anti-MBP/anti-Pan-Natrium
- anti-MBP/anti-PGP 9.5
- anti-MBP/anti-Leu4-CD3
- anti-MBP/anti-CD68

Die Analyse der 50 µm Serienschritte erfolgte unter gleichen Bedingungen am Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2 (Fa. Carl Zeiss, Jena).

Die gesamte Dermis der Serienschritte wurde analog zu vorherigen Studien analysiert (Doppler et al., 2013). Ranvier-Schnürringe wurden in den Doppelfärbungen MBP/Caspr, MBP/Neurofascin und MBP/Pan-Natrium aufgesucht. Anschließend wurde die Anzahl der Schnürringe, die Anzahl verlängerter Schnürringe sowie die Anzahl der Schnürringe mit einer Dispersion der Caspr-Färbung und verbreiterten Neurofascin-Färbung gezählt. Die Färbung von Caspr galt als dispers sobald die Färbung die paranodale Region überschritten hatte und vereinzelt Caspr im inter- bzw. juxtapanodalen Bereich lokalisiert war. Neurofascin galt auf einer Länge > 10,6 µm als verbreitert angefärbt. Ranvier-Schnürringe > 6,1 µm galten als verlängert (Doppler et al., 2012).

Mit der Färbung MBP/PGP 9.5 wurden zunächst Bündel myelinisierter und unmyelinisierter Nervenfasern in 40-facher Vergrößerung betrachtet. Als ein Bündel galten mehr als 5 gruppierte Nervenfasern. Anschließend wurde die Dermis in 2,5-facher

Vergrößerung fotodokumentiert und mit der Software Spot32 vermessen. Die Dichte myelinisierter und unmyelinisierter Bündel wurde jeweils durch Berechnung des Quotienten aus der Anzahl myelinisierter und unmyelinisierter Bündel und der dermalen Fläche berechnet und in Anzahl der Bündel pro mm^2 Dermisfläche angegeben.

Der Nachweis inflammatorischer Zellinfiltration erfolgte anhand der Doppelfärbungen MBP/Leu4-CD3 (T-Zellen) und MBP/CD68 (Makrophagen). Gruppierte myelinisierte Nervenfasern von mehr als 5 Stück wurden als ein Bündel gezählt. Eine Kolokalisation von mehr als 5 inflammatorischen Zellen wurde zunächst als „pathologisch auffällig“ interpretiert und daraufhin überprüft.

2.6.1 Aufstellung der histologischen Auswertung der Hautstanzbiopsien

Hautschnitte mit qualitativ schlechter immunohistochemischer Färbung, ohne Epidermis oder mit umgeklappter Epidermis bzw. Dermis wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Tabelle 2 und Tabelle 3 zeigen eine Übersicht der auswertbaren und nicht auswertbaren Hautbiopsate, aufgeteilt nach immunohistochemischer Färbung und Lokalisation (Ober-, Unterschenkel, Finger). Pro Objektträger wurde jeweils ein Schnitt ausgewertet.

Tabelle 2: Aufstellung 1 über die Anzahl der Patienten mit auswertbaren/nicht auswertbaren Hautbiopsien nach Färbung und Lokalisation.

	NF OS	NF US	NF Fi	Caspr OS	Caspr US	Caspr Fi	Pan- Na OS	Pan- Na US	Pan- Na Fi
Anzahl Patienten mit auswertbaren Hautbiopsien	91	88	89	92	92	92	70	69	78
Anzahl Patienten mit nicht auswertbaren Hautbiopsien	1	4	3	0	0	0	22	23	14

Tabelle 3: Aufstellung 2 über die Anzahl der Patienten mit auswertbaren/nicht auswertbaren Hautbiopsien nach Färbung und Lokalisation

	Leu4 CD3 OS	Leu4 CD3 US	Leu4 CD3 Fi	CD 68 OS	CD 68 US	CD 68 Fi	PGP OS	PGP US	PGP Fi
Anzahl Patienten mit auswertbaren Hautbiopsien	90	89	90	92	88	91	87	85	88
Anzahl Patienten mit nicht auswertbaren Hautbiopsien	2	3	2	0	4	1	5	7	4

2.6.2 Aufstellung der histologischen Merkmalsausprägungen der Nervus suralis Biopsien

Aus dem histologischen Befundbericht der Nervus suralis Biopsien (n=40) wurden folgende Merkmalsausprägungen erfasst und Skalen zugeordnet:

- „Auftreten von Axonuntergängen“ (ja – nein)
- „Häufigkeit dünn myelinisierter Nervenfasern“ (viele – wenige)
- „Vorhandensein von Regenerationsgruppen“ (ja – nein)
- „Vorhandensein von Zwiebschalen“ (ja – nein)
- „Nachweis einer Vermehrung von T-Zellen in der CD3-/ Leu4-Färbung“ (ja – nein)
- „Nachweis einer Vermehrung von Makrophagen in der CD68-Färbung“ (ja – nein)

2.7 Statistische Auswertung und Fallzahlplanung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik- und Analyse-Software SPSS 23 (IBM, Ehningen). Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft und als nicht-normalverteilt befundet. Der bei nicht-normalverteilten Daten durchgeführte statistische Gruppenvergleich für unabhängige Stichproben erfolgte anhand des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests und des Kruskal-Wallis-Tests. Bei allen durchgeführten Tests lag das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$.

Zur Berechnung der Korrelation zwischen zwei Merkmalsausprägungen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman ausgewählt. Eine Korrelation wurde bei einem Wert von $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Als Signifikanztest auf Unabhängigkeit in einer Kontingenztafel wurde der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest und der exakte Fisher-Test verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

Die Fallzahlplanung erfolgte mit dem Programm GPower 3.1 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland). Für die Fallzahlplanung wurde die primäre Hypothese herangezogen, dass sich Subgruppen demyelinisierender Neu-

ropathien im Anteil an Fällen mit nodalen/paranodalen Auffälligkeiten unterscheiden, da der Vergleich der Subgruppen eine größere Fallzahl erfordert, als der Vergleich der demyelinisierenden und axonalen Neuropathien. Basierend auf Vorläuferstudien, die hier einen deutlichen Unterschied zwischen INCAT-positiver CIDP und hereditären Neuropathien nahelegen (Doppler et al., 2013; Saporta et al., 2009), wurde eine Effektgröße von 85% positiven CIDP-Fällen und 10% positiven Fällen bei hereditärer Neuropathie zugrunde gelegt. Für Verwendung des exakten Fisher-Test ergibt sich bei einem Signifikanzniveau von 0.05 und einer Power von 0.9 eine nötige Fallzahl von 10 Fällen pro Gruppe. Da die Rekrutierung der Patienten bei Entnahme der Hautbiopsie erfolgte, einem Zeitpunkt, zu dem die Gruppenzuordnung der Patienten mangels diagnostischer Daten noch nicht getroffen werden konnte, erfolgte gemäß der Prävalenz der CIDP und der hereditären Neuropathie in der Patientenpopulation unserer Klinik zunächst die Rekrutierung von 92 Patienten, aus denen die entsprechenden Subgruppen dann im Verlauf nach dem Vorliegen aller diagnostischen Daten gebildet wurden.

2.8 Materialien

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Katlog-Nr./Clone	Hersteller	Host	Klonalität	Konzentration	Verwendungszweck
Neurofascin	ab31457	Abcam plc, Cambridge, UK	Rabbit	Polyklonal	1:400	Marker für das paranodale Protein Neurofascin-155 und das nodale Protein Neurofascin-186
CD 3	347340	BD Biosciences, San Jose, USA	Mouse	Mono-klonal	1:100	Komplexbildung mit CD3-Antigen/ T-Zell-Antigen-Rezeptor-Komplex
CD 68	M 0814	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	Mouse	Mono-klonal	1:1000	Marker für Makrophagen und weitere Mitglieder der mononukleären Phagozytenlinie
Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5)	RA95101	UltraClone Limited, Wellow, UK	Rabbit	Polyklonal	1:800	Panaxonaler Marker
Contactin associated Protein (Caspr)	ab34151	Abcam plc, Cambridge, UK	Rabbit	Polyklonal	1:1000	Paranodaler Marker der axo-glialen Verbindungsstellen
Pan-Sodium-Channel	K58/35 S8809	Sigma, Saint Louis, USA	Mouse	Mono-klonal	1:100	Marker für Na ⁺ -Kanäle in Zellmembranen des peripheren Nervensystems
Myelin Basic Protein (MBP)	AB980	Merck Millipore, Billerica, USA	Rabbit	Polyklonal	1:1000	Marker für isoforme Proteinkomponenten der Myelinmembran/ Färbung der Myelinscheide
Myelin Basic Protein (MBP)	GTX11159 Clone 2	Biozol Diagnostica GmbH, Eching, Deutschland	Mouse	Mono-klonal	1:200	Marker für isoforme Proteinkomponenten der Myelinmembran

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Katlog-Nr./Clone	Hersteller	Host	Klonalität	Konzentration	Verwendungszweck
Alexa Fluor [®] 488	715-545-150	Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, USA	Donkey	Polyklonal	(1:400) 1:200 (1+1 mit Glycerol vorverdünnt)	Anti-mouse IgG (H+L)
Alexa Fluor [®] 488	711-545-152	Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, USA	Donkey	Polyklonal	(1:400) 1:200 (1+1 mit Glycerol vorverdünnt)	Anti-rabbit IgG (H+L)
Cy [™] 3	711-165-152	Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, USA	Donkey	Polyklonal	(1:100) 1:50 (1+1 mit Glycerol vorverdünnt)	Anti-rabbit IgG (H+L)
Cy [™] 3	715-165-151	Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, USA	Donkey	Polyklonal	(1:100) 1:50 (1+1 mit Glycerol vorverdünnt)	Anti-mouse IgG (H+L)

Tabelle 6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile/Zusätze	Zusammensetzung
1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl • Na₂HPO₄*H₂O • KCl • KH₂PO₄ 	<ul style="list-style-type: none"> • 137 mM • 8,1 mM • 2,7 mM • 1,5 mM in ddH₂O, pH 6,
Blockierlösungen	BSA Triton X-100	10g/100 ml PBS 0,3% (v/v) in 1x PBS

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Katalog-Nr.	Hersteller
Triton X-100	X100	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	158127	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Vectashield™ mit DAPI	H-1200	Vector Lab. Inc, Burlin- game, USA

Tabelle 8: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiophot 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Kamera	SPOT Pursuit™ USB Camera	SPOT Imaging Solu- tions, Burroughs, USA
Objektive	<ul style="list-style-type: none"> • Plan-Apochromat 20x/0.8 Ph2 • Plan-Apochromat 40x/0.95 Ph3 • Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil Ph3 • Plan-Apochromat 100x/1.4 Oil Ph4 	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Konfokalaufsatz	X-Light Confocal Ima- ger	Crestoptics s.r.l., Rom, Italien

Tabelle 9: Software

Software	Hersteller	Version
EndNote®	Thomson Reuters, New York, USA	X7.7.1 (Bld9529)
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda, USA	1.44n
Microsoft® Excel für Mac 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA	14.4.5 (141003)
Microsoft® Word für Mac 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA	14.4.5 (141003)
VisiView	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland	2.1.1
SPSS	IBM Deutschland GmbH, Ehningen	23

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der klinischen Daten

3.1.1 Demographische Daten

Im Zeitraum November 2012 bis Oktober 2013 wurden 92 Patienten, die sich zur Diagnostik einer PNP am Universitätsklinikum Würzburg befanden, zur Teilnahme an der Studie rekrutiert.

55 Männer (59,8%) und 37 Frauen (40,2%) befanden sich unter den Patienten. Das mediane Alter betrug 64,0 Jahre, bei einer Spannweite von 62 Jahren (jüngste/r Patient/in 28 Jahre, älteste/r Patient/in 90 Jahre. Männer waren im Median 66,0 Jahre alt, das Alter der Frauen betrug im Median 60,0 Jahren.

Die Krankheitsdauer bis zur Entnahme der Hautbiopsie betrug im Median 3,0 Jahre (0,1-40). Die geringste Dauer wies ein Patient mit einem progredienten Krankheitsverlauf von wenigen Wochen auf, das Maximum war eine Krankheitsdauer von 40 Jahren. Die mediane Krankheitsdauer bis zu Biopsie betrug bei den weiblichen Patienten 4,0 Jahre (1–30) und bei den männlichen Patienten 3,0 Jahre (0,1-40).

Innerhalb der ersten beiden Jahre nach Symptombeginn wurden 39 von 92 Patienten biopsiert (42%), bei 70% wurde die Hautbiopsie in den ersten fünf Jahren nach Erkrankungsbeginn durchgeführt.

3.1.2 Ätiologische Einteilung der Patienten nach PNP-Diagnostik

Die endgültige ätiologische Einteilung erfolgte nach Sichtung der gesamten klinischen PNP-Diagnostik.

Tabelle 10 zeigt eine Auflistung der Ätiologie der Krankheitsbilder nach erfolgter PNP-Diagnostik.

Tabelle 10: Ätiologische Einteilung der Patienten nach PNP-Diagnostik

Ätiologie nach PNP-Diagnostik	Anzahl der betroffenen Patienten (n=92)
PNP unklarer Ätiologie	22
V.a. CIDP (INCAT negativ)	11
hereditäre PNP	9
SFN	6
diabetische PNP	6
Vaskulitische PNP	5
chronisches Schmerzsyndrom	5
CIDP (INCAT positiv)	4
MADSAM	4
MMN	2
paraneoplastische PNP	2
PNP mit Anti-MAG-Autoantikörpern	2
Erythromelalgie	2
GBS	1
Hinterstrangläsion	1
Myeloradikuloneuropathie	1
Neurolues	1
spastische Spinalparalyse	1
paraproteinämische PNP (ohne anti-MAG)	1
PNP bei Vit.-B-12-Mangel	1
PNP bei rheumatoider Arthritis	1
PNP bei Sarkoidose	1
SFN bei SLE	1
SFN bei Diabetes mellitus	1
SFN bei Sjögren Syndrom	1

Abkürzungen Tabelle Ätiologische Einteilung nach PNP-Diagnostik: Anti-MAG= Antikörper gegen Myelin-associated glycoprotein (MAG); CIDP= chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; GBS = Guillain-Barré-Syndrom; INCAT= Kriterien für die Diagnose CIDP der Arbeitsgruppe INCAT (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment); MADSAM= Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy; MMN= Multifokale motorische Neuropathie; PNP= Polyneuropathie; SLE= Systemischer Lupus Erythematoses

Die größte Gruppe umfasste PNP unbekannter Ätiologie mit 22 betroffenen Patienten (24%). Zweithäufigste Ursache war die entzündliche PNP in Form einer CIDP mit insgesamt 15 betroffenen Patienten (16%), die anhand der klinisch-elektrophysiologischen INCAT-Kriterien in zwei Subgruppen unterschieden werden konnten (Hughes et al., 2001). INCAT-negative erfüllten diese Kriterien zwar nicht, wurden jedoch aufgrund des klinischen, elektrophysiologischen Befundes, der Nervenbiopsie und/oder eines Therapieansprechens als CIDP eingestuft und bildeten mit 11 betroffenen Patienten (12%) im CIDP-Patientenkollektiv den größten Anteil. 4 Patienten (4%) erfüllten hingegen die Kriterien für eine INCAT-positive CIDP.

40 von 92 Patienten (43,5%) erhielten eine Biopsie des Nervus suralis. In diesem Patientenkollektiv war die PNP unklarer Ätiologie mit 11 betroffenen Patienten (27,5%) die häufigste Krankheitsursache. INCAT negative CIDP (8 Patienten; 20%) und INCAT positive CIDP (4 Patienten; 10%) folgten an zweiter bzw. dritter Stelle. Addiert erhielten somit 30% der CIDP diagnostizierten Patienten eine Nervenbiopsie.

Tabelle 11 zeigt die ätiologische Einteilung der Patienten mit Suralisbiopsie nach erfolgter PNP-Diagnostik.

Tabelle 11: Ätiologische Einteilung der Patienten mit Suralisbiopsie nach PNP-Diagnostik

Ätiologie PNP (n=40)	Anzahl der betroffenen Patienten
PNP unklarer Ätiologie	11
CIDP (INCAT negativ)	8
CIDP (INCAT positiv)	4
hereditäre PNP	4
Vaskulitische PNP	3
diabetische PNP	2
PNP bei Anti-MAG	2
chronisches Schmerzsyndrom	1
MADSAM	1
Neurolues	1
paraneoplastischen PNP	1
paraproteinämische PNP	1
PNP bei rheumatoider Arthritis	1

Abkürzungen Tabelle Ätiologische Einteilung der PNP-Patienten mit Suralisbiopsie: Anti-MAG= Antikörper gegen Myelin-associated glycoprotein (MAG); CIDP= chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; GBS = Guillain-Barré-Syndrom; INCAT= Kriterien für die Diagnose CIDP der Arbeitsgruppe INCAT (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment); MADSAM= Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy; PNP= Polyneuropathie

3.2 Auswertung der klinisch-diagnostischen Testverfahren (MRC, ODSS, TCNS)

Der MRC-Gesamtwert (n=92) des Patientenkollektivs lag im Median mit 59 Punkten (30-60) näherungsweise an der maximalen Punktzahl von 60 (normale Kraft). Der Median unterschied sich nach Geschlecht mit jeweils 59,0 Punkten nicht (Spannweite m=30-60 Punkte; w=49-60 Punkte). Der MRC-Wert für Arme und Beine erreicht im Median den Maximalwert (normale Kraft) von jeweils 30,0 Punkten (Spannweite Arme: 11-30 Punkte; Spannweite Beine: 8-30 Punkte).

Der mediane ODSS-Gesamtwert (n=92) lag bei 2,0 Punkten (0-11) als Zeichen für eine moderate Beeinträchtigung von Armen und Beinen. Männer hatten im Median einen ODSS von 2,0 Punkten, Frauen erreichten einen Median von 3,0 Punkten. Der gesondert Median von ODSS für Arme betrug 1,0 Punkte (0-5) sowie für Beine 2,0 Punkte (0-7). 57 Patienten (62,0%) hatten keine bzw. nur leichtgradige Symptome an den Armen. 28 Patienten zeigten mäßiggradige Symptome (30,4%). Schwere Symptome fanden sich bei lediglich 7 Patienten (7,6%). Das Gehen war bei lediglich 19 Patienten (20,7%) unbeeinträchtigt. Bei 13 Patienten (14,1%) im Rahmen der klinisch-neurologischen Untersuchung Gangbild normal, die Patienten klagten aber subjektiv über ein gestörtes Gehverhalten in Form von Dysästhesien, Parästhesien u.a. 45 Patienten (48,9%) zeigten ein auffälliges Gangbild, benötigten aber keine Gehhilfe. 13 Patienten (14,1%) waren auf mindestens eine Gehhilfe angewiesen. 2 Patienten (2,2%) waren aufgrund der Schwere der Symptomatik dauerhaft auf einen Rollstuhl angewiesen.

Der mediane Gesamtwert des TCNS lag bei den Studienteilnehmern bei 18,0 Punkten (1-32). Männer und Frauen wiesen jeweils einen Median von 18,0 Punkten. Der Symptomkomplex lag mit einem medianen Wert von 10,5 Punkten (0-18) über denen des sensiblen Komplexes mit einem Median von 8,0 Punkten (0-15). In allen Einzelkategorien des TCNS zeigten sich in der Mehrzahl pathologische Ergebnisse mit Abstufungen nach Schweregrad. Schmerzhaftige Symptome an den Füßen hatten 65 von 92 Patienten (70,6%), über Taubheitsgefühle berichteten 73 Patienten (79,3%), Kribbelsymptome beschrieben 63 Patienten (68,5%). Muskelschwäche war bei 48 Patienten (52,2%) anzutreffen. Bei 59,7% (55 Patienten) war eine Ataxie vorhanden. 59

Patienten (64,1 %) zeigten auch Symptome an den Armen. Die sensible Testung lieferte ebenfalls in der Mehrzahl Auffälligkeiten mit Abstufungen nach Schweregrad. Bei lediglich 49 von 92 Patienten (53,2%) war die Stumpf-Spitz-Diskrimination pathologisch auffällig. Die Thermotestung war bei lediglich 37 von 92 Patienten (40,2%) normal. Die Oberflächensensibilität war in 66 Fällen (71,7%) beeinträchtigt. Das Vibrationsempfinden war bei 68 Patienten (73,9%) eingeschränkt. Lediglich der Lage-sinn war in der Mehrheit der Fälle bei 56 von 92 Patienten (60,9%) ohne pathologischen Befund.

3.3 Analyse der histologischen Daten

3.3.1 Übersicht Nervus Suralis Biopsien

Im histologischen Befundbericht der Biopsien des N. suralis (n= 40) zeigten 23 von 40 Patienten (57,5%) das Bild einer axonalen Neuropathie. An zweiter Stelle folgte die demyelinisierende Neuropathie mit 14 betroffenen Patienten (35,0%). Gemischte Neuropathien waren in 3 Fällen (7,5%) anzutreffen. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der histologischen Befunde der Patienten mit einer Nervus Suralis Biopsie.

Tabelle 12: Übersicht histologische Befundung Nervus Suralis Biopsien

Histologie Nervus Suralis Biopsie	Anzahl der betroffenen Patienten (n=40)
axonal	23
demyelinisierend	14
gemischt	3

Einen hochgradigen Faserverlust verzeichneten 18 von 40 Patienten (45,0%). 20 weitere Patienten zeigten eine mittelgradigen Faserverlust (50,0%). 1 Patient (2,5%) hatte einen leichtgradigen Faserverlust, ein weiterer Patient (2,5%) zeigte keinen Faserverlust im Nervenbiopsat.

3.3.2 Pathologische Auffälligkeiten an Ranvier-Schnürringen in Hautbiopsien nach Diagnosegruppen

Tabelle 13 zeigt eine Übersicht der pathologischen Auffälligkeiten an Ranvierschen Schnürringen unterteilt nach Diagnosegruppen.

Tabelle 13: ätiologische Diagnosgruppen und Anzahl der Patienten mit pathologischen Auffälligkeiten an den Ranvier-Schnürringen

Ätiologische Diagnosegruppe	Anzahl Pat. mit verlängerten Ranvier-Schnürringen (n=55/92)	Anzahl Pat. mit Dispersion Caspr (n=8/92)	Anzahl Pat. mit Dispersion Neurofascin (n=20/92)
CIDP INCAT neg. (n=11)	6	0	2
CIDP INCAT pos. (n=4)	1	0	0
PNP sonstige (n=23)	15	2	5
PNP unklarer Ätiologie (n= 22)	14	4	6
PNP vaskulitisch (n= 5)	4	1	1
SFN (n= 6)	3	1	1
Sonstige Diagnosen (Chron. Schmerzsyndrom, Erythromelalgie, MADSAM u.a.) (n= 21)	12	0	5

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit zu einer Diagnosegruppen und dem Auftreten von verlängerten Ranvier-Schnürringen sowie Dispersion von Neurofascin und Caspr wurde untersucht. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Diagnosegruppe und pathologischer Auffälligkeit an Schnürringen nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Test).

3.3.3 Verlängerte Ranvier-Schnürringe in Hautbiopsien

Verlängerte Ranviersche Schnürringe in mindestens einer immunohistochemischen Färbung in der Hautbiopsie (siehe Abbildung 4 Pan-Natrium-Kanalfärbung) fanden sich bei 55 von 92 Patienten (59,8%).

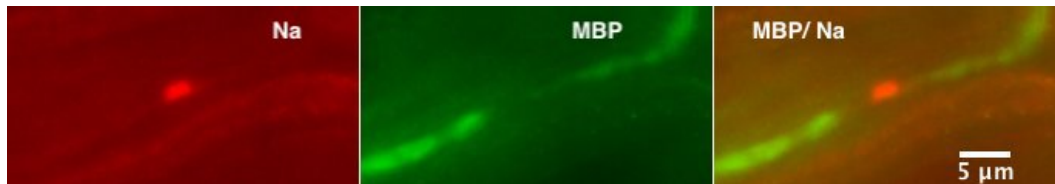


Abbildung 4: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (grün) und Pan-Natrium (rot)

Die Pan-Natrium-Kanalfärbung ist in der zentralen Region eines verlängerten Ranvier-Schnürringes lokalisiert. Nicht-angefärbte Regionen zwischen Pan-Natrium-Färbung und Beginn der Myelinscheide.

3.3.3.1 Analyse verlängerter Ranvier-Schnürringe nach diagnostischen Subgruppen

Die Mehrzahl der Patienten mit verlängerten Schnürringen hatten eine unklare PNP (14/55) oder gehörten zur Gruppe „sonstige PNP“ (15/55). 7 von 55 (12,7%) Patienten mit verlängerten Schnürringen hatten eine CIDP. 1 von 7 Patienten erfüllte die INCAT-Kriterien einer CIDP, 6 Patienten hatten eine INCAT-negative CIDP. Eine vaskulitische PNP war bei 4 von 55 (7,3%) Patienten mit verlängerten Schnürringen anzutreffen. Bei 3 von 55 Patienten (5,5%) mit verlängerten Schnürringen handelte es sich um eine SFN.

3.3.3.2 Analyse verlängerter Ranvier-Schnürringe nach Schädigungsmuster axonal/demyelinisierend

Bei 27 der 40 Patienten mit Suralisbiopsie (67,5%) zeigten sich in mindestens einer Färbung verlängerte Ranvierschnürringe im Hautbiopsat. Davon hatten 14 Patienten (51,9%) eine axonale PNP, 12 Patienten (44,4%) eine demyelinisierende PNP und 1 Patient (3,7%) eine gemischte PNP.

3.3.3.3 Analyse Patientengruppen „verlängerte Ranvier-Schnürringe“

Ein signifikanterer Unterschied zwischen den Patientengruppen mit bzw. ohne verlängerte Schnürringe in Hautbiopsien in Bezug auf die histologischen Merkmalsausprägungen in Suralisbiopsien „Regenerationsgruppen“, „Axonuntergänge“, „dünn

myelinisierte Nervenfasern“ und „Zwiebelschalen“ bestand nicht ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test). Die Merkmalsausprägung „dünn myelinisierte Nervenfasern“ deutet allerdings auf einen Trend hin ($p = 0,143$; exakter Fisher-Test). 11 von 13 Patienten (84,6%) hatten verlängerte Schnürringe in mind. einer Färbung und viele dünn myelinisierte Nervenfasern. Lediglich 2 Patienten (15,4%) ohne verlängerte Schnürringe verfügten ebenfalls über eine Vielzahl dünn myelinisierter Fasern.

Die statistische Analyse der klinisch-diagnostischen Tests (TCNS, MRC, ODSS) und der Krankheitsdauer ergab keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Patientengruppen mit und ohne verlängerte Schnürringe ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Des Weiteren wurde das Schädigungsmuster (axonal/demyelinisierend) anhand der Suralisbiopsie analysiert und auf Unabhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit untersucht. Hier ließ sich kein signifikantes Ergebnis nachweisen ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test). Die histologischen Merkmalsausprägungen der Nervenbiopsie sind unabhängig vom Vorliegen verlängerter Schnürringe.

3.3.4 Dispersion Caspr

Eine Dispersion von Caspr war bei 8 von 92 Patienten (8,7%) nachweisbar (siehe Abbildung 5). Einschränkend soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass in der Caspr-Färbung aufgrund der hohen Anzahl an Biopsien ohne Nervenfasern nur selten eine Dispersion anzutreffen war. 38 von 92 Patienten (41,3%) wiesen an mindestens einer Biopsiestelle keine Nervenfasern auf.

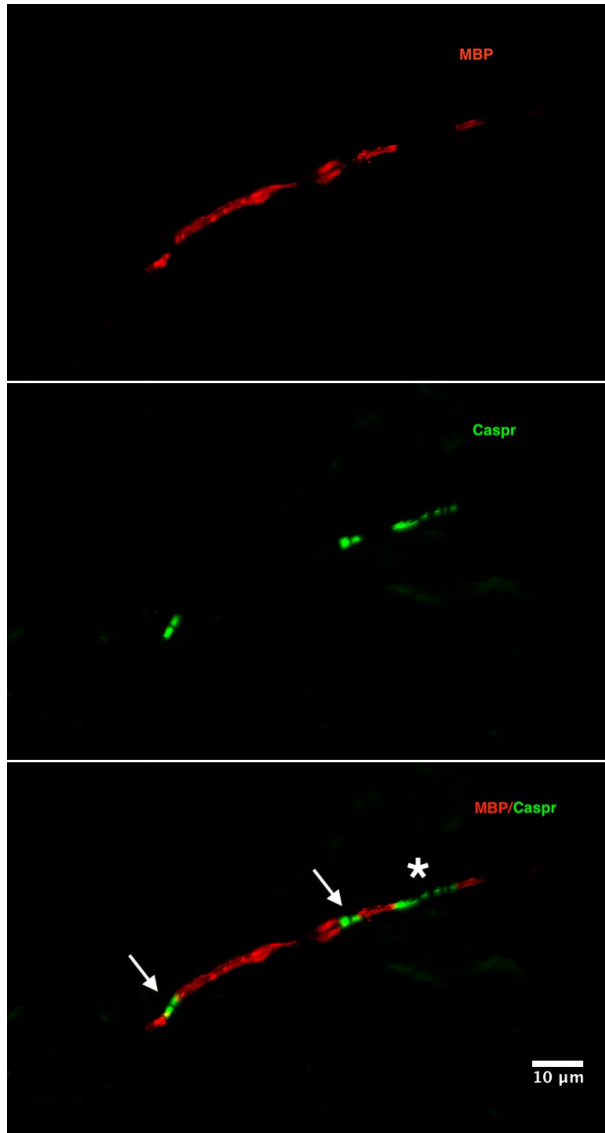


Abbildung 5: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und Caspr (grün)

Lokalisation von Caspr in der paranodalen Region (Pfeile). Verlängerter Ranvier-Schnürring mit Dispersion von Caspr (Stern).

3.3.4.1 Analyse Dispersion Caspr nach diagnostischen Subgruppen

Die Mehrzahl der Diagnosefälle stellten Patienten mit PNP unklarer Ätiologie (4/8) und sonstige PNP (2/8). Je ein Patient mit SFN (1/8) und vaskulitischer PNP (1/8) waren von einer Caspr-Dispersion betroffen. Bei Patienten mit CIDP war eine Caspr-Dispersion nicht nachweisbar.

3.3.4.2 Analyse Dispersion Caspr nach Schädigungsmuster axonal/ demyelinisierend

4 von 40 Patienten mit Suralisbiopsie (10%) zeigten an mindestens einer Biopsiestelle eine Dispersion von Caspr. Davon hatte 1 Patient (25%) eine demyelinisierende PNP, 1 Patient eine gemischte PNP und 2 Patienten eine axonale PNP (50%).

3.3.4.3 Analyse Patientengruppen „Dispersion Caspr“

Die Analyse der histologischen Befundberichte der Suralisbiopsien zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Patientengruppe mit bzw. ohne Caspr-Dispersion. Hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens von Regenerationsgruppen, Axonuntergängen, dünn myelinisierten Nervenfasern und Zwiebelschalen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Bei der histologischen Merkmalsausprägung „Zwiebelschalen“ zeigte sich jedoch ein Trend hin zu einem häufigeren Vorkommen von Zwiebelschalen bei Patienten mit einer Dispersion von Caspr ($p = 0,091$; exakter Fisher-Test; Tabelle 14).

Tabelle 14: Kreuztabelle Anzahl Patienten „Dispersion Caspr ja/nein“ und „Vorkommen Zwiebelschalen Suralisbiopsie ja/nein“

	Anzahl Patienten mit Dispersion Caspr an mind. 1 Biopsiestelle	
	nein	ja
Vorkommen von Zwiebelschalen in Suralisbiopsie		
nein	24	1
ja	9	3
Gesamt	33	4

Die Analyse der klinisch-diagnostischen Tests (ODSS, MRC, TCNS) und der Krankheitsdauer zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Allerdings ließ sich ein Trend hin zu einer längeren Krankheitsdauer bei Patienten mit einer Dispersion von Caspr erkennen ($p = 0,068$; Mann-Whitney-U-Test). Der Vergleich des Schädigungsmusters (axonal/demyelinisierende PNP) zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test).

3.3.5 Dispersion Neurofascin

Eine Dispersion von Neurofascin ließ sich bei 20 von 92 Patienten (21,7%) an mindestens einer Biopsiestelle nachweisen (siehe Abbildung 6).

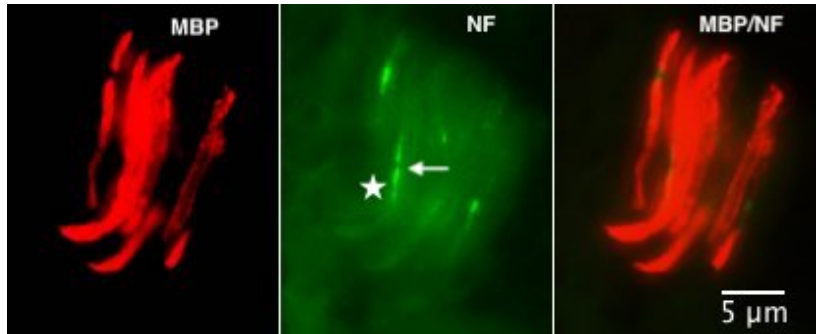


Abbildung 6:: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und Neurofascin (grün)

Neurofascin-Färbung ist in der Mitte des Ranvier-Schnürringes unterbrochen (Pfeil). Asymmetrische Anfärbung von Neurofascin im Sinne einer Dispersion (Stern).

3.3.5.1 Analyse Dispersion Neurofascin nach diagnostischen Subgruppen

Die Mehrzahl der Fälle fiel auf die Diagnosegruppen „sonstige PNP“ (5/20) und PNP unklarer Ätiologie (6/20). Zwei Patienten mit einer INCAT-negativen CIDP (2/20) sowie ein Patient mit SFN (1/20) waren von einer Neurofascin-Dispersion betroffen. Die Gruppe „sonstige Diagnosen“ umfasste insgesamt 5 Patienten mit einer Neurofascin-Dispersion.

3.3.5.2 Analyse Dispersion Neurofascin nach Schädigungsmuster axonal/demyelinisierend

7 von 40 Patienten mit Suralisbiopsie (17,5%) zeigten an mindestens einer Biopsiestelle eine Dispersion von Neurofascin. Ein Patient (14,3%) hatte eine gemischte PNP, drei Patienten (42,9%) hatten eine axonale PNP und weitere drei Patienten (42,9%) eine demyelinisierende PNP.

3.3.5.3 Analyse Patientengruppen „Dispersion Neurofascin“

Der Vergleich der Patientengruppen mit und ohne Dispersion von Neurofascin zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Betrachtung der histologischen Merkmalsausprägungen der Nervenbiopsiebefunde ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test). Das Vorkommen von Regenerationsgruppen, Axonuntergängen, dünn myelinisierten Nervenfasern und Zwiebelschalen war unabhängig von der Dispersion von Neurofascin.

Die klinisch-diagnostischen Tests (ODSS, MRC, TCNS) sowie die Krankheitsdauer unterschieden sich bei den Patienten mit und ohne Dispersion von Neurofascin nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Das Schädigungsmuster (axonale/ demyelinisierende PNP) von Patienten mit bzw. ohne Dispersion von Neurofascin unterschied sich nicht signifikant voneinander. Die histologischen Merkmalsausprägungen der Nervenbiopsie waren unabhängig vom Vorliegen einer Dispersion von Neurofascin ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test).

3.3.6 Entzündungszellen in Haut- und Nervenbiopsien

Die Gruppe entzündlicher PNP umfasste 31 von 92 Patienten (33,7%). Darunter hatte die Mehrzahl der Fälle eine CIDP (15/31 Patienten) sowie 5 Fälle (16,1%) eine vaskulitische PNP. Nicht-entzündliche PNP stellten mit 61 von 92 Patienten (66,3%) die größte Fallgruppe. PNP unklarer Ätiologie (22 Patienten; 36,1%) stellte die häufigste Diagnose, gefolgt von 9 Patienten (14,8%) mit hereditärer PNP sowie je 6 Patienten (9,8%) mit SFN bzw. Diabetes.

3.3.6.1 Analyse Kolokalisation von Entzündungszellen in Hautbiopsien nach diagnostischen Subgruppen

Eine Kolokalisation von Makrophagen an Nervenbündeln in Hautbiopsien war lediglich bei 1 von 92 Patienten (1,1%) möglich. In diesem einen Fall handelte es sich um eine nicht-entzündliche PNP (siehe Abbildung 7).

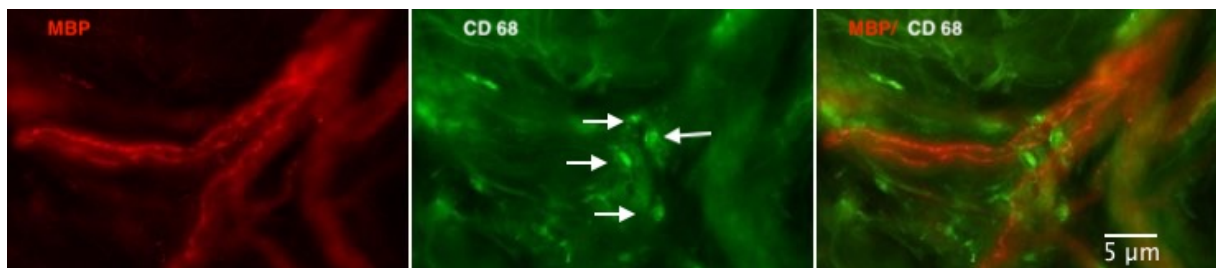


Abbildung 7: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und CD 68 (grün)

Kolokalisation CD 68-positive Makrophagen (grün) mit Pfeil markiert

T-Zellen ließen sich kolokalisiert in 26 von 92 Hautbiopsien (28,3%) nachweisen (siehe Abbildung 8). Davon waren 9 Fälle (34,6 %) einer entzündlichen PNP zuzuordnen, in 17 Fällen (65,4%) handelte es sich laut Suralisbiopsie um eine nicht-entzündliche Form der PNP.

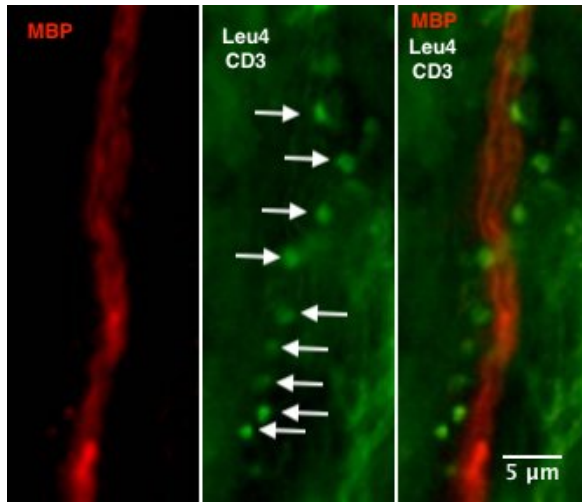


Abbildung 8: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und Leu4CD3 (grün)

Kolokalisation CD 3-positive T-Zellen (grün) mit Pfeil markiert

3.3.6.2 Analyse Vermehrung von Entzündungszellen in Suralisbiopsien nach diagnostischen Subgruppen

In 24 von 39 Suralisbiopsien (61,5%) konnten laut histologischem Befund vermehrt Makrophagen (CD-68-positive Färbung) nachgewiesen werden. 15 von 39 Suralisbiopsien (38,5%) zeigten keine vermehrten Entzündungszellen. Eine Suralisbiopsie war in der CD-68-Färbung nicht auswertbar.

In Suralisbiopsien von Patienten mit PNP unklarer Ätiologie sowie Patienten mit INCAT negativer CIDP waren mit jeweils 7 Fällen (29,2 %) am häufigsten Makrophagen vermehrt nachweisbar. Bei 3 Patienten (12,5 %) mit vaskulitischer Neuropathie war eine erhöhte Anzahl Makrophagen in der Suralisbiopsie nachweisbar. Jeweils 1 Fall (4,2 %) bei PNP rheumatoider Genese, Neurolues, Anti-MAG, paraproteinämische PNP, diabetische PNP, MADSAM und INCAT positiver CIDP war nachweisbar.

T-Zellen ließen sich vermehrt bei 22 von 40 (55,0 %) Suralisbiopsien nachweisen (Leu4/CD3-positiv). 18 Suralisbiopsien (45,0 %) zeigten keine Vermehrung von T-Zellen. In 5 Fällen (22,7 %) handelte es sich um PNP unklarer Ätiologie und jeweils 4 Fälle (18,2 %) INCAT negativer CIDP sowie INCAT positiver CIDP. 3 Suralisbiopsien (13,6 %) von Patienten mit vaskulitischer Neuropathie wiesen eine erhöhte Anzahl an T-Zellen auf. Suralisbiopsien von Patienten mit MADSAM, diabetische PNP, paraproteinämische PNP und chronischem Schmerzsyndrom waren in je 1 Fall (4,5 %) von

einer erhöhten Anzahl T-Zellen betroffen.

3.3.6.3 Analyse Korrelation von Entzündungszellen in Haut- und Nervenbiopsien

Weder für T-Zellen noch für Makrophagen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Entzündungszellen in Haut- und in Nervenbiopsaten nachgewiesen werden ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test). Zusätzlich wurden entzündliche und nicht-entzündliche Formen der PNP in Bezug auf Entzündungszellen in Hautbiopsien miteinander verglichen. Auch hier konnte kein Zusammenhang zwischen dem Diagnosekriterium entzündliche bzw. nicht-entzündliche PNP und dem Nachweis von kolokalisierten Entzündungszellen an Nervenbündeln in Hautbiopsien aufgezeigt werden ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test).

3.3.7 Doppelte Anfärbarkeit von Natrium-Kanälen an Ranvierschen Schnürringen

Als ein mögliches pathologisches Merkmal an Ranvierschen Schnürringen wurde eine doppelte Anfärbarkeit von Natrium-Kanälen bei 7 von 92 Patienten (7,6 %) beobachtet. Bei 4 von 40 Patienten, die neben der Haut- auch eine Suralisbiopsie erhielten, ließen sich doppelt angefärbte Natrium-Kanäle an mindestens einer Hautbiopsiestelle nachweisen. Alle 4 Patienten hatten eine axonale PNP.

Patienten mit und ohne doppelt angefärbte Natrium-Kanäle zeigten im Vergleich keine signifikanten Unterschiede in den histologischen Merkmalsausprägungen der Suralisbiopsien ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test). Die klinischen-diagnostischen Testergebnisse (ODSS, MRC, TCNS) sowie die Krankheitsdauer unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die diagnostischen Merkmalsausprägungen „axonal“ und „demyelinisierend“ sind unabhängig vom Auftreten doppelt angefärbter Natrium-Kanäle im Hautbiopsat ($p > 0,05$; exakten Fisher-Test).

3.3.8 myelinisierte/ nicht-myelinisierte Nervenfaserdichte in Hautbiopsien

3.3.8.1 Analyse Nervenfaserdichte SFN- und PNP-Patienten

Der Vergleich der Dichte myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenbündel von SFN- und PNP-Patienten ergab zum Teil signifikante Unterschiede. PNP-Patienten wiesen am Unterschenkel im Vergleich zu SFN-Patienten eine höhere Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel auf ($p= 0,032$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 9). SFN-Patienten wiesen am Finger eine höhere Dichte myelinisierter Nervenbündel im Vergleich zu PNP-Patienten auf ($p= 0,022$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 10).

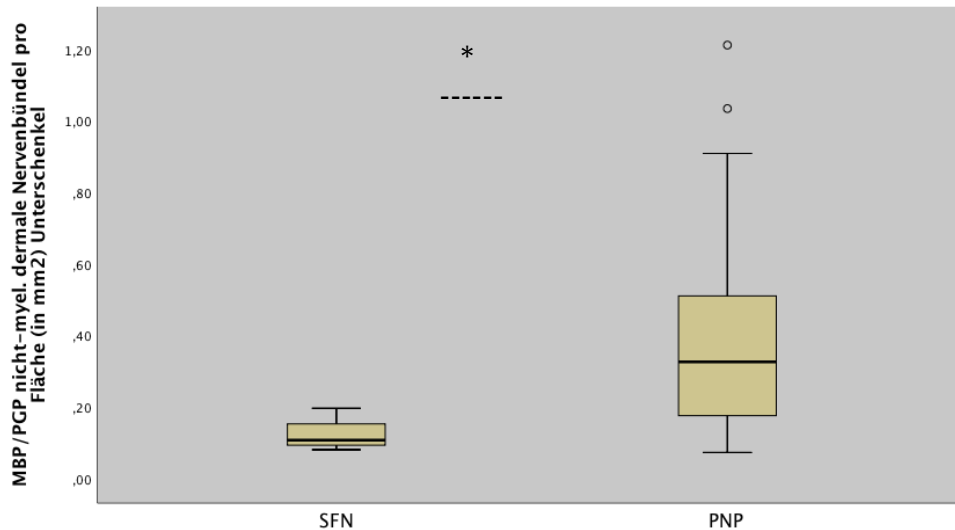


Abbildung 9: Vergleich Faserdichte nicht-myelinisierter Nervenbündel Unterschenkel zwischen PNP- und SFN-Patienten

*
----- = signifikanter Unterschied

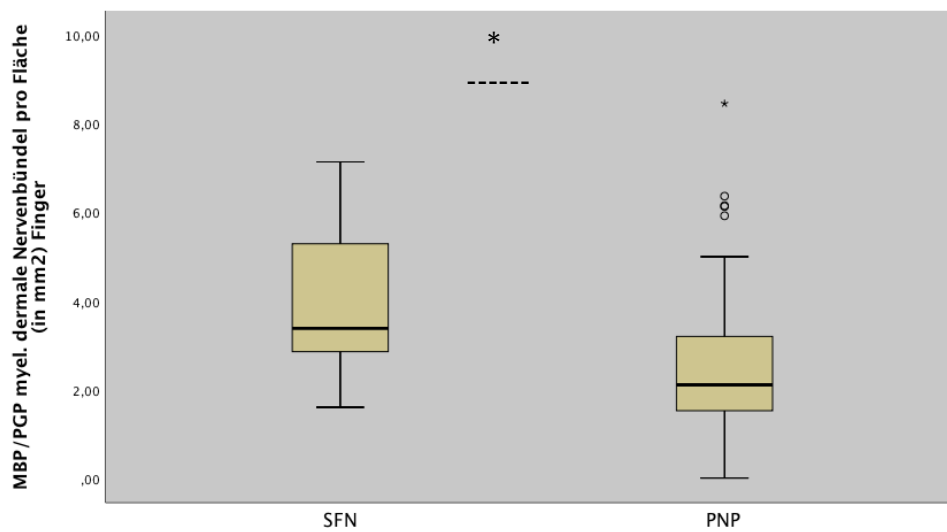


Abbildung 10: Vergleich Faserdichte myelinisierter Nervenbündel Finger zwischen PNP- und SFN-Patienten

*
----- = signifikanter Unterschied

Der gesonderte Vergleich zwischen Patienten aus den PNP-Subgruppen und SFN-Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Allerdings lässt sich ein Trend hin zu einer höheren Dichte nicht-myelinisierter Nervenfasern des Fingers bei Patienten mit SFN sowie bei Patienten mit vaskulitischer PNP erkennen ($p = 0,059$; Mann-Whitney-U-Test).

3.3.8.2 Analyse der Nervenfaserdichte nach Schädigungsmuster

Die Dichte myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenbündel in Hautbiopsien unterschied sich nicht signifikant zwischen axonaler und demyelinisierender PNP. Einzig die Analyse des Unterschenkels deutete auf einen Trend zu einer höheren Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel bei Patienten mit demyelinisierender PNP hin ($p=0,059$; Mann-Whitney-U-Test).

3.3.8.3 Analyse der Nervenfaserdichte nach Biopsielokalisation

Es erfolgte eine Zuteilung in Gruppen anhand der Biopsiestelle (Oberschenkel, Unterschenkel, Finger) sowie der Anzahl der Bündel pro Fläche (jeweils für myelinisierte und nicht-myelinisierte Nervenfasern (Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 15: Übersicht Häufigkeitsverteilung Gruppenkategorie myel. Bündel nach Lokalisation

Gruppenkategorie Anzahl myelinisierte Bündel pro Fläche (in mm ²)	Anzahl Patienten Finger	Anzahl Patienten Unter- schenkel	Anzahl Patienten Ober- schenkel
0	3	5	1
< 1	9	49	61
1 bis < 2	20	21	15
2 bis <3	23	5	6
> 3	32	5	4

Tabelle 16: Übersicht Häufigkeitsverteilung Gruppenkategorie nicht-myel. Bündel nach Lokalisation

Gruppenkategorie Anzahl nicht-myelinisierte Bündel pro Fläche (in mm ²)	Anzahl Patienten Finger	Anzahl Patienten Unterschenkel	Anzahl Patienten Ober- schenkel
< 1	20	26	29
1 bis < 2	6	2	1
2 bis <3	5	0	1
> 3	1	0	0

Beim Vergleich der drei Biopsiestellen zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied in der Dichte an myelinisierten und nicht-myelinisierten Nervenbündeln ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis-Test; Abbildung 11; Abbildung 12). Fingerbiopsate wiesen im Vergleich zu Hautproben von Ober- und Unterschenkel eine höhere Dichte an myelinisierten und nicht-myelinisierten Bündeln auf.

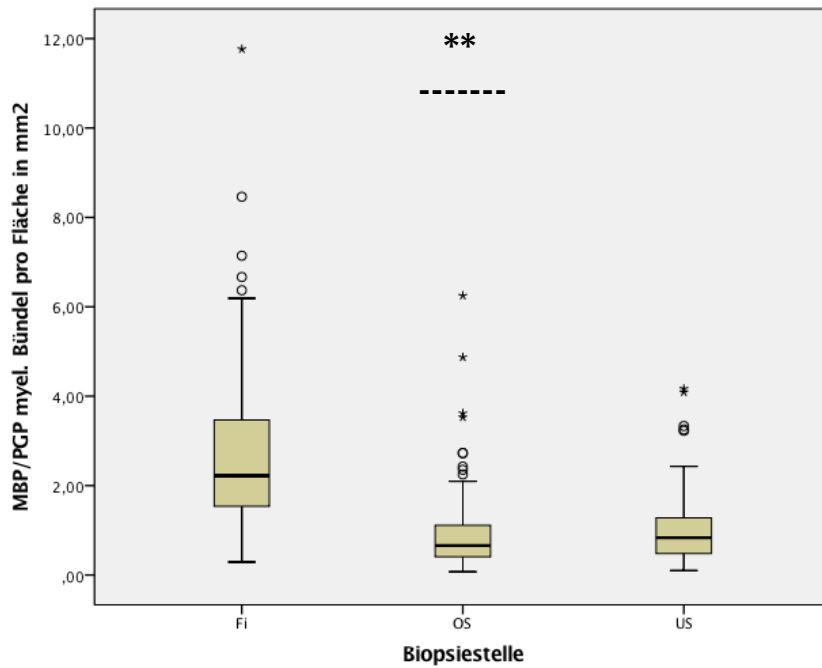


Abbildung 11: Vergleich der myelinisierten Nervenfaserdichten nach Lokalisation

°= Ausreißer; *= extremer Ausreißer; ----- = hochsignifikanter Unterschied

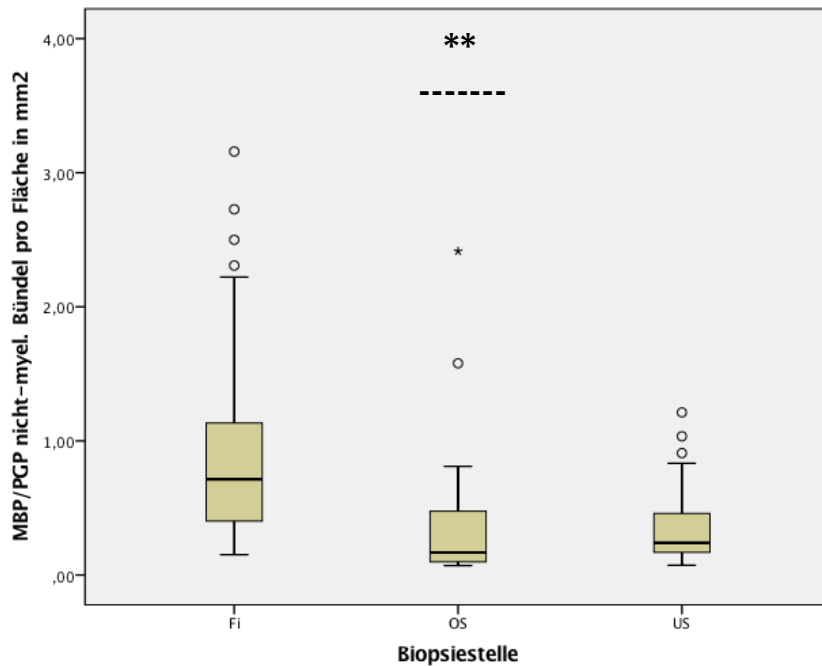


Abbildung 12: Vergleich der nicht-myelinisierten Nervenfaserdichten nach Lokalisation

° = Ausreißer; * = extremer Ausreißer; ----- = hochsignifikanter Unterschied

3.3.8.4 Analyse klinisch-diagnostische Testverfahren und Nervenfaserdichte

Ein Gruppenvergleich der klinisch-diagnostischen Testverfahren (ODSS, MRC, TCNS) zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Weiterhin wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den klinisch-diagnostischen Testergebnissen und der Anzahl myelinisierter/ nicht-myelinisierter Nervenbündel pro Fläche vorlag. Hier konnten keine signifikanten Zusammenhänge aufgezeigt werden ($p > 0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman).

3.3.8.5 Analyse Krankheitsdauer und Nervenfaserdichte

Die Analyse der Anzahl myelinisierter/ nicht-myelinisierter Bündel pro Fläche und der Krankheitsdauer ergab kein signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Die Krankheitsdauer von Patienten mit einer geringen bzw. vermehrten Anzahl an Nervenbündeln unterschied sich nicht signifikant voneinander. Eine Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der Anzahl an Nervenbündeln konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Korrelationskoeffizient nach Spearman).

3.3.8.6 Analyse histologische Merkmalsausprägungen N. suralis und Nervenfaserdichte

Signifikante Unterschiede in den histologischen Merkmalsausprägungen von Suralisbiopsien zeigten sich einzig für die Merkmalsausprägung „Regenerationsgruppen“. Patienten mit Nervenbiopsaten ohne Regenerationsgruppen wiesen am Oberschenkel im Vergleich zu Patienten mit Regenerationsgruppen eine höhere Dichte myelinisierter Nervenbündel ($p=0,041$; Mann-Whitney-U-Test) und eine höhere Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel auf ($p=0,026$; Mann-Whitney-U-Test).

3.3.8.7 Analyse Faserverlust in Suralisbiopsien und Nervenfaserdichte

Die gesonderte Betrachtung der Anzahl myelinisierter/ nicht-myelinisierter Bündel pro Fläche und des Faserverlust-Schweregrades in Suralisbiopsien lieferte keine signifikanten Ergebnisse ($p>0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Allerdings deutet die Verteilung nicht-myelinisierter Nervenbündel am Finger mit $p=0,086$ auf einen Trend hin. Patienten mit einem mittelgradigen Faserverlust im Suralisbiopsat wiesen am Finger im Median eine höhere Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel im Vergleich zu Patienten mit einem hochgradigen Faserverlust im Nervenbiopsat auf.

3.3.8.8 Entzündliche/ nicht-entzündliche PNP und Nervenfaserdichte

Die Nervenfaserdichte ausgewählter nicht-entzündlicher und entzündlicher Formen der PNP wurde miteinander verglichen. Die Gruppe „nicht-entzündlichen PNP“ ($n=21$; 51,2%) umfasste die Diagnosen SFN, hereditäre PNP und diabetische PNP. Die Gruppe „entzündliche PNP“ ($n=20$; 48,8%) bestand aus Patienten mit den Diagnosen CIDP und vaskulitische PNP.

Im Vergleich beider Gruppen zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Dichte myelinisierter Bündel an Ober- und Unterschenkel sowie bei der Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel des Oberschenkels ($p<0,05$, Mann-Whitney-U-Test). Patienten mit einer entzündlichen PNP-Form zeigten im Vergleich zu Patienten mit nicht-entzündlichen PNP-Formen sowohl am Ober- als auch am Unterschenkel eine im Median höhere Dichte an myelinisierten Nervenbündeln (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Beim Vergleich der Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel an Ober-

und Unterschenkel wiesen Patienten mit entzündlichen PNP-Formen ebenfalls signifikant höhere Medianwerte als Patienten mit nicht-entzündlichen PNP-Formen auf (siehe Abbildung 15). Am Finger zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit entzündlichen und nicht-entzündlichen Formen der PNP.

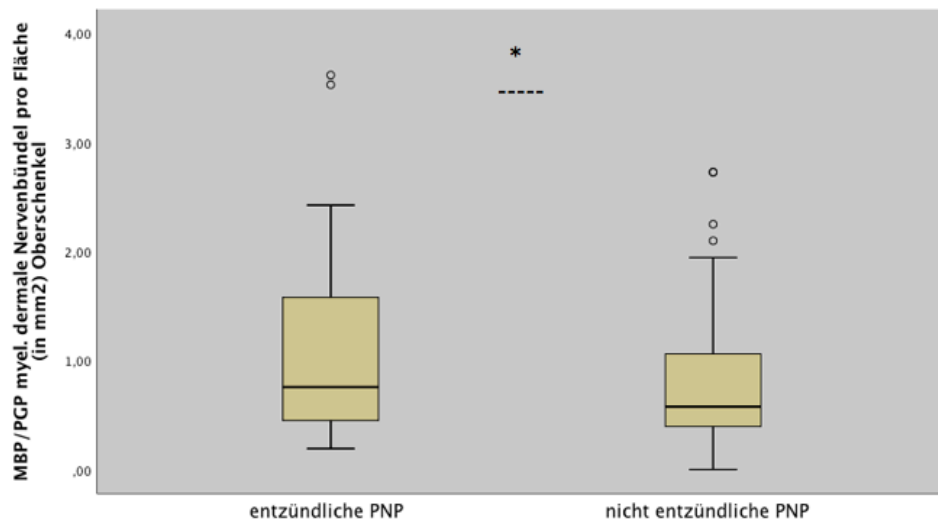


Abbildung 13: Vergleich der Dichte myelinisierter Nervenbündel des Oberschenkels zwischen Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP

° = Ausreißer; * = extremer Ausreißer; ----- = signifikanter Unterschied

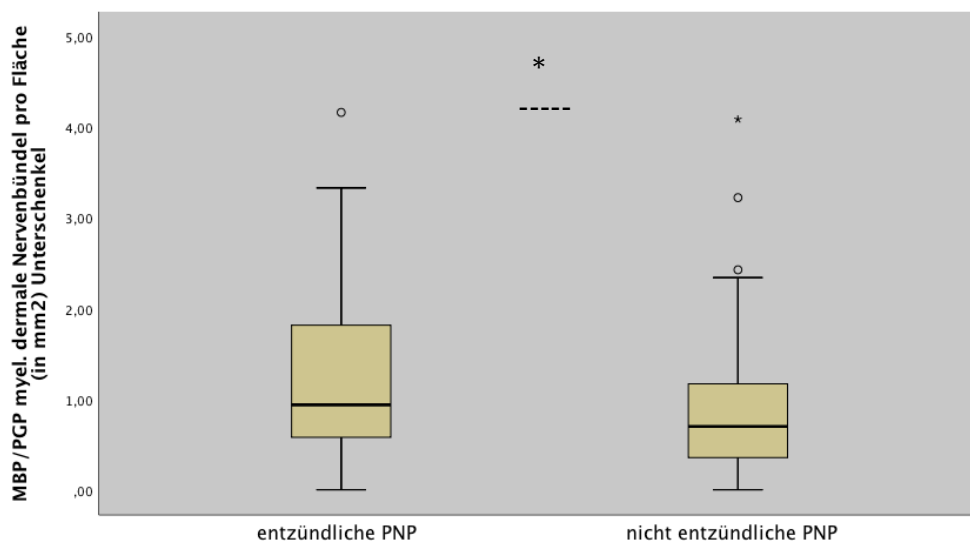


Abbildung 14: Vergleich der Dichte myelinisierter Nervenbündel des Unterschenkels zwischen Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP

° = Ausreißer; * = extremer Ausreißer; ----- = signifikanter Unterschied

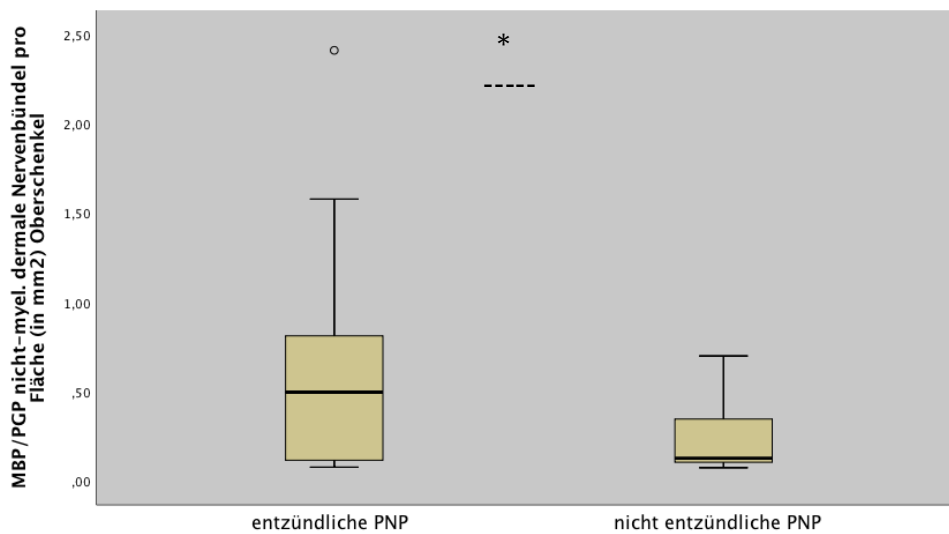


Abbildung 15: Vergleich der Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel des Oberschenkels zwischen Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP

*
----- = signifikanter Unterschied

3.3.9 Faserverlust in Hautbiopsien

In den Färbungen MBP/Caspr und MBP/Neurofascin befand sich eine Vielzahl an Schnitten ohne Nervenfasern.

33 von 92 Patienten (35,9%) zeigten in der Färbung MBP/Neurofascin an mindestens einer von drei Biopsiestellen einen Verlust aller myelinisierten Fasern. 17 von 40 Patienten (42,5%), die zudem eine Nervus suralis Biopsie erhalten haben, hatten in der Färbung MBP/Neurofascin an mindestens einer Biopsiestelle einen Faserverlust. Davon hatten 3 Patienten (17,6%) eine demyelinisierende PNP, 13 Patienten (76,5%) eine axonale PNP und 1 Patient eine gemischte PNP (5,9%).

38 von 92 Patienten (41,3%) zeigten an mindestens einer Biopsiestelle der Färbung MBP/Caspr einen Nervenfaserverlust. 23 von 40 Patienten (57,5%), die neben der Haut- auch eine Suralisbiopsie erhalten hatten, hatten an mindestens einer Biopsiestelle der Färbung MBP/Caspr einen Nervenfaserverlust. 9 Patienten (39,1%) hatten eine demyelinisierende PNP, 13 Patienten (56,5%) eine axonale PNP und 1 Patient (4,3%) eine gemischte PNP.

Bei 17 von 92 Patienten (18,5%) ließen sich an mindestens einer Biopsiestelle weder in der Färbung MBP/Neurofascin noch in der Färbung MBP/Caspr Nervenfasern nachweisen. Bei 12 von 40 Patienten (30%), die neben der Haut- auch eine Suralisbiopsie erhielten, konnte sowohl in der Färbung MBP/Caspr als auch in der Färbung MBP/Neurofascin an mindestens einer Biopsiestelle ein Nervenfaserverlust festgestellt werden. Hier hatten 3 Patienten (25,0%) eine demyelinisierende PNP, 8 Patienten (66,7%) eine axonale PNP und 1 Patient eine gemischte PNP (8,3%).

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den Merkmalsausprägungen der Suralisbiopsie (Regenerationsgruppen, dünn myelinisierte Nervenfasern, Axonuntergänge, Zwiebelschalen) und der Zuordnung zu einer Gruppe anhand des Vorkommens eines Faserverlustes im Hautbiopsat nachgewiesen werden ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test).

Die Analyse der klinisch-diagnostischen Testergebnisse von Patientengruppen mit und ohne Nervenfasern zeigte für die Tests ODSS und MRC keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Die TCNS- Werte unterschieden sich hingegen signifikant zwischen den Patienten mit und ohne Nervenfasern. Patienten, die sowohl in der immunohistochemischen Färbungen MBP/Neurofascin als auch in der Färbung MBP/Caspr einen Faserverlust verzeichneten, wiesen signifikant höhere TCNS-Werte auf als Patienten ohne Faserverlust im Hautbiopsat ($p = 0,03$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 16). Die gesonderte Betrachtung der Färbung MBP/Neurofascin zeigte im Vergleich von Patienten mit und ohne Nervenfasern ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p = 0,08$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 17). Patienten mit Hautbiopsaten ohne Nervenfasern (an mindestens einer Biopsiestelle) erzielten signifikant höhere TCNS-Werte als Patienten die keinen Nervenfaserverlust im Hautbiopsat verzeichneten. Auch in der Färbung MBP/Caspr zeigten Patienten mit Serienschnitten ohne Nervenfasern (an mindestens einer Biopsiestelle) signifikant höhere TCNS-Werte als solche Patienten ohne Nervenfaserverlust im Hautbiopsat ($p = 0,014$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 18).

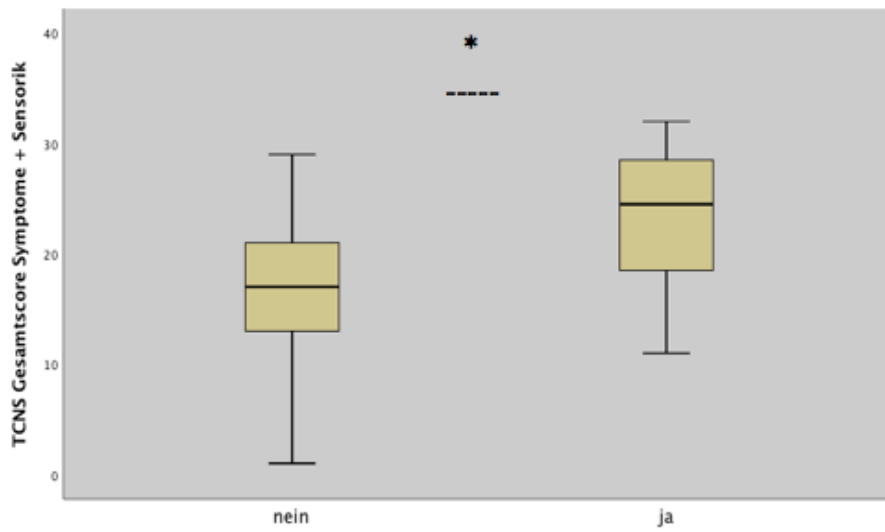


Abbildung 16: Gruppenvergleich TCNS-Gesamtscore Biopsien mit/ohne Fasern Färbung Neurofascin und Caspr

*
----- = signifikanter Unterschied

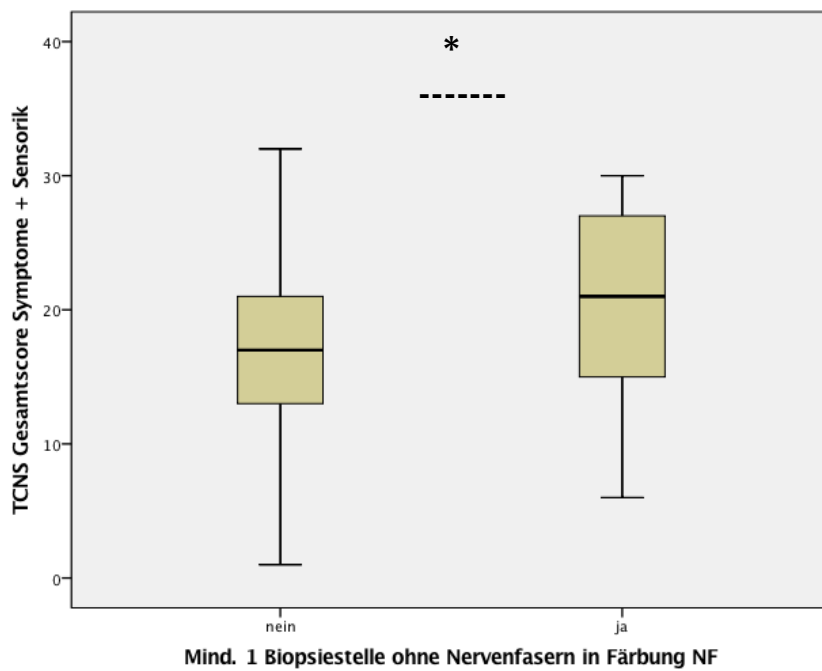


Abbildung 17: Gruppenvergleich TCNS-Gesamtscore Biopsien mit/ohne Fasern Färbung Neurofascin

*
----- = signifikanter Unterschied

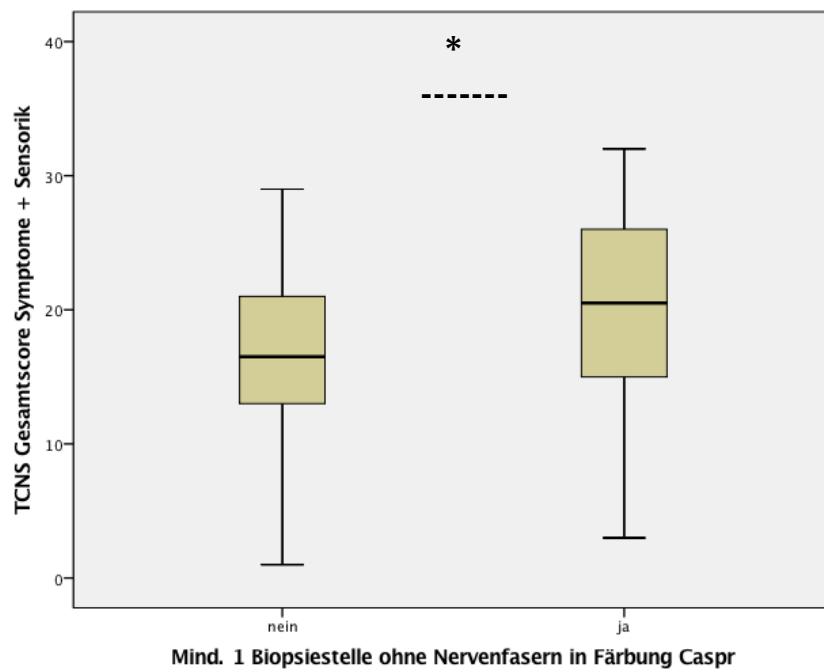


Abbildung 18: Gruppenvergleich TCNS-Gesamtscore Biopsien mit/ohne Fasern Färbung Caspr

*
----- = signifikanter Unterschied

Im Vergleich der Krankheitsdauer konnte kein Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Faserverlust im Hautbiopsat ermittelt werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

22 von 37 Patienten (59,5%), die eine Suralisbiopsie erhielten, zeigten in der Caspr-Färbung an mindestens einer Hautbiopsielokalisation keine Nervenfasern. 10 von 22 Patienten (45,5%) zeigten in der Suralisbiopsie einen hochgradigen Faserverlust. Die restlichen 12 Patienten (54,5%) verfügten über einen mittelgradigen Faserverlust. Bei 15 von 37 Patienten (40,5%), die eine Suralisbiopsie erhielten, war der Nachweis von Nervenfasern in der Neurofascin-Färbung an mindestens einer Hautbiopsielokalisation nicht möglich. 7 von 15 Patienten (46,7%) zeigten in der Suralisbiopsie einen hochgradigen Faserverlust. Weitere 8 Patienten (53,3%) hatten einen mittelgradigen Faserverlust im Nervenbiopsat.

11 von 37 Patienten (29,7%) zeigten sowohl in der Caspr- als auch in der Neurofascin-Färbung an mindestens einer Hautbiopsielokalisation einen kompletten Nervenfaserverlust. 4 Patienten (36,4%) hatten einen hochgradigen Faserverlust in der

Suralisbiopsie, weitere 7 Patienten (63,6%) zeigten einen mittelgradigen Faserverlust im Nervenbiopsat.

Anschließend wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Schwere des Faserverlusts in der Suralisbiopsie und dem Faserverlust in der Hautbiopsie gab. Betrachtet wurden die Haut- und Nervenbiopsate von Patienten mit axonaler und demyelinisierender PNP (n=37). Patienten mit gemischter PNP (n=3) wurden hier nicht betrachtet. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Schwere des Faserverlusts in der Suralisbiopsie und dem Faserverlust in der Hautbiopsie konnte nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest).

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen Faserverlust in der Hautbiopsie und dem Schädigungsmuster einer axonalen bzw. demyelinisierenden PNP, untersucht. Hier konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Diagnosekriterium axonale/ demyelinisierende PNP und dem Faserverlust in Hautbiopsien der Neurofascin-Färbung aufgezeigt werden ($p = 0,048$; Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest; Tabelle 17). Patienten mit einer axonalen PNP waren häufiger von einem Nervenfaserverlust betroffen.

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen dem Faserverlust in der Hautbiopsie und dem Diagnosekriterium axonale bzw. demyelinisierende PNP

Diagnosekriterium	Anzahl Patienten mit Nervenfaserverlust an mind. 1 Biopsiestelle (Färbung MBP/Neurofascin)	
	nein	ja
demyelinisierende PNP	11	3
axonale PNP	10	13
Gesamt	21	16

4 Diskussion

4.1 Zu den histopathologischen Auffälligkeiten an Ranvier-Schnürringen

4.1.1 Verlängerte Ranviersche Schnürringe

Verlängerte Ranvierschnürringe wurden in einer vorherigen Studie (Doppler et al., 2013) in der Mehrzahl bei demyelinisierenden PNP sowie in einigen Fällen axonaler PNP beobachtet. Eine weitere Studie (Doppler et al., 2012) konnte verlängerte Ranvier-Schnürringe einzig bei demyelinisierenden PNP nachweisen. In der hier vorliegenden Arbeit erhielten 40 von 92 Patienten (43,5%) neben der Hautbiopsie zusätzlich eine Suralisbiopsie. Verlängerte Ranvier-Schnürringe in Hautbiopsien ließen sich bei 27 der o.g. 40 Patienten (67,5%) nachweisen. Hier waren Patienten mit einer axonalen PNP mehrheitlich von verlängerten Schnürringen betroffen (14/27). 12 Patienten hatten eine demyelinisierende PNP (12/27). Nur in einem Fall ließen sich verlängerte Ranvier-Schnürringe bei gemischter PNP beobachten.

Bei 1 von 4 Patienten (25%) mit INCAT-positiver CIDP ließen sich verlängerte Schnürringe nachweisen. In zuvor veröffentlichten Arbeiten konnten verlängerte Ranvier-Schnürringe in 80-100% der Fälle bei INCAT-positiver CIDP nachgewiesen werden (Doppler et al., 2013; Saporta et al., 2009). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass die geringe Anzahl von nur vier Patienten in unserer Studie mit INCAT-positiver CIDP nicht repräsentativ ist. Zudem ließen sich bei 3 von 4 Patienten (75%) mit INCAT-positiver CIDP aufgrund eines vollständigen Verlusts der myelinisierten Nervenfasern in den Hautbiopsaten nicht alle Biopsiestellen auswerten, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigt ist. Die in der zuvor genannten Arbeit verwendete Free-Floating-Färbetechnik kann ein möglicher Grund für abweichende Ergebnisse in der hier vorliegenden Studie mit konventioneller immunohistochemischer Färbung sein. Vermutlich dringen mittels Free-Floating-Technik Antikörper besser in das Gewebe ein, wodurch mehr Gewebefasern angefärbt und quantifizierbar werden.

4.1.2 Dispersion von Caspr und Neurofascin

Eine Dispersion von Caspr in Hautbiopsien war bei 8 von 92 Patienten (8,7%) nachweisbar. Davon hatten 4 Patienten eine PNP unklarer Ätiologie, sowie in jeweils einem Fall die Diagnosen diabetische PNP, vaskulitische PNP, hereditäre PNP und SFN. In keinem Fall konnte eine Dispersion bei INCAT positiven CIDP-Patienten nachgewiesen werden. Bei 4 von 40 Patienten (10%), die eine Suralisbiopsie erhielten, konnte eine Caspr-Dispersion in Hautbiopsien nachgewiesen werden. 50% der Fälle mit Caspr-Dispersion waren Patienten mit axonaler PNP (2 von 4 Patienten). Nur in jeweils einem Fall konnte eine Caspr-Dispersion bei Patienten mit demyelinisierender PNP sowie gemischter PNP beobachtet werden.

Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit einer vorherigen Studie, in der eine Caspr-Dispersion mehrheitlich bei Patienten mit demyelinisierender PNP sowie bei INCAT positiven Fällen einer CIDP anzutreffen war (Doppler et al., 2013). Eine weitere Arbeit konnte in Biopsien des N. peroneus superficialis eine Caspr-Dispersion bei CIDP-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Anzeichen einer PNP feststellen (Cifuentes-Diaz et al., 2011). In o.g. Studien wurden u.a. unterschiedliche Färbetechniken (Free-Floating-Technik) sowie Probenmaterial (Nervus peroneus) verwendet, was mitunter ein möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sein kann.

Eine Dispersion von Neurofascin ließ sich in unserer Arbeit bei 20 von 92 Patienten (21,7%) an mindestens einer Hautbiopsiestelle nachweisen. 7 von 40 Patienten (17,5%), die neben einer Haut- auch eine Suralisbiopsie erhielten, wiesen eine Dispersion von Neurofascin an mindestens einer Lokalisation auf. Davon hatten jeweils 3 Patienten eine demyelinisierende bzw. axonale Neuropathie. Nur in einem Fall waren Patienten mit gemischter PNP von einer Neurofascin-Dispersion betroffen.

Eine verminderte Dichte von Neurofascin in der paranodalen Region wurde im Tiermodell bei akuter inflammatorischer demyelinisierender PNP beschrieben (Lonigro & Devaux, 2009). Veränderungen der Distribution des paranodalen Membranproteins Neurofascin wurden in einer weiteren Studie als Vorläufer von demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS beschrieben (Howell et al., 2006). Eine weitere Studie konnte

die Dispersion von Neurofascin mehrheitlich bei Patienten mit demyelinisierender PNP nachweisen (Doppler et al., 2013). Patienten mit gemischter PNP waren analog zu unserer Arbeit am wenigsten von einer Neurofascin-Dispersion betroffen.

Im Gegensatz zu o.g. Arbeit konnte in unserer Arbeit eine Neurofascin-Dispersion bei Patienten mit INCAT-positiver CIDP nicht nachgewiesen werden. Allerdings ließen sich, wie zuvor bereits beschrieben, bei 3 von 4 Patienten (75%) mit INCAT-positiver CIDP aufgrund eines Faserverlusts in den Hautbiopsaten nicht alle Biopsiestellen auswerten, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigt wurde. Daneben erscheint auch hier die geringe Anzahl von nur vier Patienten mit CIDP als nicht repräsentativ. Da sich aber eine Neurofascin-Dispersion bei Patienten mit INCAT-negativer CIDP sowie bei anderen Krankheitsformen der PNP beobachten ließ, könnte eine zukünftige Studie mit einer größeren Anzahl an Studienteilnehmern zu eindeutigeren Ergebnissen gelangen.

Des Weiteren sollte einschränkend erwähnt werden, dass sowohl in der Caspr- als auch in der Neurofascin-Färbung aufgrund der hohen Anzahl an Biopsaten mit Faserverlust nur selten eine Dispersion nachweisbar war. Die Analyse der Krankheitsdauer als mögliche Ursache für die abweichenden Ergebnisse lieferte keinen Aufschluss. Unsere Patienten wiesen mit einer medianen Krankheitsdauer von 3,0 Jahren eine lediglich um 0,5 Jahre geringere Dauer auf als die Patientenkohorte der o.g. Vergleichsarbeit von Doppler et al. (2013) mit einer Krankheitsdauer von 3,5 Jahren.

4.2 Zu den kolokalisierten Entzündungszellen in Haut- und in Nervenbiopsaten

Periphere Neuropathien können inflammatorische Signalketten in der Haut initiieren, die zu einem Anstieg pro- und anti-inflammatorischer Zytokine führen. Mechanismen, die infolge peripherer Nervenschädigung zu einer Invasion von Entzündungszellen entlang kutaner Nervenfasern führen, sind bislang unklar. Eine chemisch induzierte Zellinfiltration infolge lokal produzierter Faktoren durch ortsansässige Makrophagen, Fibroblasten, kutaner Langerhans-Zellen u.a. wird aktuell diskutiert (Üçeyler et al., 2016). Die Persistenz perivaskulärer, postphagozytischer Zellen wurde zuvor als wahrscheinlichste Ursache für vermehrte Makrophagencluster in Suralisbiopsien bei entzündlichen Neuropathien angenommen (Sommer et al., 2005).

In vorherigen Studien erfolgte ein Nachweis von T-Zellen und Makrophagen in Suralisbiopsien mehrheitlich bei entzündlichen und vaskulitischen Neuropathien überwiegend im Bereich von epineuralen Blutgefäßen (Lindenlaub & Sommer, 2003; Sommer et al., 2005). Bei Patienten mit nicht-systemischer vaskulitischer Neuropathie (NSVN) konnte eine höhere perivaskuläre Infiltration von T-Zellen und Makrophagen im Vergleich zu Patienten mit nicht-entzündlicher axonaler Neuropathie und gesunden Kontrollpatienten beobachtet werden (Üçeyler et al., 2010). Eine weitere Arbeit konnte in Suralisbiopsien vermehrt Makrophagencluster entlang endoneuraler Blutgefäße bei inflammatorischen Neuropathien nachweisen (Sommer et al., 2005). Im Vergleich zu hereditären Neuropathien waren Makrophagencluster vermehrt in Fällen von CIDP zu beobachten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Kolokalisation von Makrophagen und T-Zellen an myelinisierten Nervenfasern in Hautproben untersucht. Bei lediglich 1 von 92 Patienten (1,09%) konnte eine Kolokalisation von Makrophagen und myelinisierten Nervenbündeln nachgewiesen werden. Hier handelte es sich ätiologisch allerdings um eine nicht-entzündliche PNP-Form. Eine Kolokalisation von T-Zellen und myelinisierten Nervenbündeln war bei nahezu einem Drittel der Studienteilnehmer zu beobachten (26 von 92 Fälle). Entzündliche PNP-Formen stellten dabei allerdings die Minderheit (9 von 26 Fälle). Entzündungszellen waren in der Mehrheit der Fälle bei nicht-entzündlichen Formen der PNP mit Nervenbündeln kolokalisiert (17 von 26 Fälle).

Als mögliche Ursache für den geringen Nachweis von kolokalisierten Entzündungszellen in der Nähe peripherer Hautnerven kann angenommen werden, dass Entzündungszellen zunächst aus Blutgefäßen in das umliegende Gewebe der Haut emigrieren und somit mehrheitlich perivaskulär nachweisbar sind (Üçeyler et al., 2016).

Weder für T-Zellen noch für Makrophagen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Entzündungszellen in Haut- und in Nervenbiopsaten nachgewiesen werden. Der Vergleich von entzündlichen und nicht-entzündlichen Formen der PNP konnte keinen Zusammenhang mit der Kolokalisation von Entzündungszellen an Nervenbündeln in Hautbiopsien aufzeigen.

Die Krankheitsdauer unseres Patientenkollektivs bis zur Entnahme von Hautbiopsien betrug im Median 3,0 Jahre. Möglicherweise hätte die Biopsie zu einem früheren Zeitpunkt zu einem vermehrten Nachweis einer Kolokalisation von Entzündungszellen beitragen können. In tierexperimentellen Arbeiten zu inflammatorischen Neuropathien konnte eine Gewebeeinfiltration durch Makrophagen vor allem in Frühphasen nach einer Nervenschädigung nachgewiesen werden (Mueller et al., 2001; Susuki et al., 2007). Eine weitere Studie konnte allerdings nachweisen, dass die Anzahl der Entzündungszellen in Hautbiopsien von PNP-Patienten nicht mit Krankheitsdauer und -aktivität korrelieren (Üçeyler et al., 2016).

Des Weiteren sei erwähnt, dass in Hautbiopsien nur sensible Nervenfasern untersucht werden können. Entzündliche Neuropathien, die vermehrt motorische Nervenfasern beeinträchtigen, werden somit möglicherweise nicht optimal erfasst. Anzumerken ist zudem, dass in den o.g. Arbeiten unterschiedliche Methoden in Hinblick auf immunohistochemische Färbungen, gewählter Schnittdicke der Biopsate und Quantifizierungsmethoden von Entzündungszellen angewendet wurden, weshalb die Ergebnisse nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind.

In der vorliegenden Arbeit bestand die Gruppe „entzündliche PNP“ aus insgesamt 20 Patienten mit den Diagnosen CIDP und vaskulitische PNP. Die Reproduktion der Daten in einer größeren Kohorte wäre wünschenswert.

4.3 Zur Dichte der myelinisierten Nervenfasern in Hautbiopsien

Beim Vergleich der drei Biopsieentnahmestellen wiesen die distalen Nervenendigungen aus Fingerbiopsien (unbehaarte Haut) im Vergleich zu den distalen Nervenendigungen aus Ober- und Unterschenkel (behaarte Haut) eine signifikant höhere Dichte myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenbündel pro Fläche Dermis auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit zuvor veröffentlichten Studien, die ebenfalls eine höhere Dichte myelinisierter Nervenfasern in unbehaarter Haut nachweisen konnten (Doppler et al., 2017; Doppler et al., 2012; Provitera et al., 2007). Anzumerken ist allerdings, dass die Analyse myelinisierter Nervenfasern in behaarter Haut generell

aufgrund ihres dort geringeren Vorkommens mitunter erschwert sein kann (Li et al., 2005).

PNP-Patienten wiesen im Vergleich zu SFN-Patienten eine signifikant höhere Dichte nicht-myelinisierter Nervenfaserbündel am Unterschenkel auf. An Oberschenkel und Finger gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen PNP- und SFN-Patienten. SFN-Patienten zeigten am Finger eine signifikant höhere Dichte myelinisierter Nervenbündel im Vergleich zu PNP-Patienten. Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen, da bei einer SFN myelinisierte Nervenfasern in der Regel nicht betroffen sind. An Ober- und Unterschenkel gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen PNP- und SFN-Patienten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Fingerbiopsien am ehesten zur Untersuchung der Dichte myelinisierter Nervenfasern geeignet sind. Angemerkt sei allerdings die relativ geringe Anzahl an Patienten mit SFN (n=9), wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt wird.

Doppler et al. (2012) konnten am Oberschenkel eine geringere Dichte myelinisierter Nervenbündel bei PNP-Patienten und eine höhere Dichte unmyelinisierter Bündel im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden aufzeigen. Ein signifikanter Unterschied zwischen SFN- und PNP-Patienten war nicht nachweisbar. Das Vorherrschen nicht-myelinisierter Nervenbündel in Hautbiopsien wird als das Distinktionsmerkmal zur Unterscheidung zwischen PNP-Patienten und gesunden Probanden beschrieben. Daneben wurde in der o.g. Studie eine höhere Dichte myelinisierter Nervenbündel des Oberschenkels bei SFN-Patienten im Vergleich zu PNP-Patienten aufgezeigt, allerdings ohne den Nachweis einer statistischen Signifikanz.

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten sei angemerkt, dass eine relativ geringe Anzahl an Patienten mit SFN analysiert wurden und es sich um ein eher homogenes Studienkollektiv mit mehrheitlich PNP handelt. Die Untersuchung erfolgte anhand einer unterschiedlichen Anzahl an Biopsielokalisationen. Im Gegensatz zur oben genannten Studie wurden in dieser Arbeit neben Biopsien vom Oberschenkel auch Hautproben von Unterschenkel und Finger analysiert. Angemerkt sei allerdings, dass der Oberschenkel bei den meisten Patienten nicht von polyneuropathischen Symptomen betroffen ist.

Auch an dieser Stelle sei auf die Verwendung unterschiedlicher Methoden der immunohistochemischen Färbung hingewiesen, die die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnten. Im Vergleich zu o.g. Studie wurde in dieser Arbeit statt der Free-floating-Methode die konventionelle Immunohistochemie verwendet. Möglicherweise dringen Antikörper durch Einsatz der Free-Floating-Technik besser in das Gewebe ein, wodurch mehr Gewebefasern bzw. Fasern verstärkt angefärbt und somit quantifizierbar gemacht werden. Eine kürzere Erkrankungsdauer unserer Patientenkohorte könnte ein potentieller Grund für die divergierenden Ergebnisse sein. SFN-Patienten (2,0 Jahre) und PNP-Patienten (4,00 Jahre) in unserer Studie wiesen im Vergleich zu o.g. Arbeit (SFN 4,74 Jahre; PNP 4,88 Jahre) eine kürzere Krankheitsdauer auf. Möglicherweise ließen sich bei ähnlicher hoher Krankheitsdauer vergleichbare Ergebnisse erzielen.

Die weitere Analyse ergab für Patienten ohne den Nachweis von Regenerationsgruppen im Nervenbiopsat eine signifikant höhere Dichte myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenbündel im Hautbiopsat. Da Regenerationsgruppen Anzeichen einer chronischen axonalen Schädigung sind und mit einer Reduktion von Nervenfasern einhergehen, entspricht dieses Ergebnis unseren Erwartungen (Taylor et al., 2004).

4.4 Zu den Faserverlusten in Hautbiopsien

Der Nachweis myelinisierter Nervenfasern in Hautbiopsien war bei 33 von 92 Patienten (35,9%) in der Färbung MBP/Neurofascin und bei 38 von 92 Patienten (41,3%) in der Färbung MBP/Caspr nicht möglich. Sowohl in der Färbung MBP/Neurofascin als auch in der Färbung MBP/Caspr waren mehrheitlich Patienten mit einer axonalen PNP von einem Verlust myelinisierter Nervenfasern an mindestens einer Hautbiopsielokalisation betroffen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Faserverlust und axonalen Schädigungsmuster konnte in Hautbiopsien der Färbung MBP/Neurofascin nachgewiesen werden ($p < 0,05$; exakter Fisher-Test).

Ein Faserverlust war mehrheitlich bei PNP-Patienten und nur in wenigen Fällen bei Patienten mit SFN zu beobachten. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Faserverlust und der Diagnose PNP/SFN war nicht nachweisbar ($p > 0,05$; exakter Fisher-Test).

her-Test). Eine zuvor veröffentlichte Studie konnte ebenfalls einen vermehrten Verlust myelinisierter Nervenfasern in Hautbiopsien von Patienten mit axonaler PNP sowie eine Verringerung der dermalen myelinisierten Nervenfasern bei Patienten mit PNP im Vergleich zu SFN-Patienten beobachten (Doppler et al., 2012).

Ein Zusammenhang zwischen dem Verlust myelinisierter Nervenfasern in Hautbiopsien und dem Faserverlust in Nervenbiopsien (klassiert nach Schweregraden) konnte in unserer Arbeit im Gegensatz zur o.g. Studie nicht aufgezeigt werden. Ein Einfluss der Krankheitsdauer auf die Biopsieergebnisse war nicht nachweisbar. Einschränkend für die Ergebnisse der Analyse von Hautbiopsien sei erwähnt, dass Patienten mitunter an einer derart schweren neuropathischen Störung leiden, die zu einem so starken Faserverlust führt, dass der Nachweis und somit die Analyse myelinisierter Nervenfasern erschwert bzw. unmöglich ist, wodurch die Interpretation der Ergebnisse signifikant beeinträchtigt werden könnte (Myers et al., 2013).

4.5 Zu den histologischen Merkmalsausprägungen in Haut- und Nervenbiopsien

Die Analyse der histologischen Merkmalsausprägungen der Suralisbiopsie bei Patienten mit und ohne pathologische Auffälligkeiten in Hautbiopsien (Gruppenvergleich Patienten mit bzw. ohne verlängerte Ranvierschnürringe, Caspr-Dispersion, Neurofascin-Dispersion, Nervenfaserverlust in Hautbiopsien) zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Des Weiteren wurde das Vorkommen eines Faserverlustes in Hautbiopsien mit der Schwere des Faserverlustes in Biopsien vom Nervus suralis verglichen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Merkmalsausprägungen in Haut- und Nervenbiopsie konnte nicht festgestellt werden. In einer zuvor veröffentlichten Arbeit konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl myelinisierter Nervenfasern in Hautbiopsien und der Schwere des Faserverlustes in Nervenbiopsien beobachtet werden. Ein schwacher Zusammenhang zwischen der Anzahl myelinisierter Nervenbündel und der Schwere des Faserverlustes in Nervenbiopsien wurde allerdings beschrieben (Doppler et al., 2012).

Myelinisierte Nervenfasern der Haut repräsentieren die distalen Nervenendigungen, der Nachweis pathologischer Veränderungen in Hautbiopsien als Zeichen eines distalen Schädigungsmusters einer PNP kann im Rahmen der Diagnostik genutzt werden. Während die molekulare Architektur der Ranvier-Schnürringe in Hautbiopsien infolge demyelinisierender PNP pathologisch verändert sein kann, zeigt sich im Nervenbiopsat oftmals eine normale Morphometrie. Möglicherweise ist der biopsierte Nervus suralis vom Krankheitsprozess ausgespart, pathologische Veränderungen sind nicht darstellbar. Zudem wäre es durchaus möglich, dass dermale Nervenfasern aufgrund ihrer distalen Lokalisation früher als der Suralisnerv von einer Schädigung betroffen sind.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Hautbiopsien mitunter morphologische Veränderungen infolge einer PNP aufzeigen können, die in einer Nervenbiopsie nicht bzw. noch nicht zu identifizieren sind. Anzumerken ist allerdings, dass in unserer Studie lediglich 40 von 92 Patienten (43,5%) neben einer Haut- auch eine Suralisbiopsie erhielten, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse einzuschränken ist.

Des Weiteren sei angemerkt, dass Hautstanzbiopsien nur einen kleinen Ausschnitt von kleinkalibrigen myelinisierten Axonen liefern. Ranvier-Schnürringe sind aufgrund des Nervenfaserverlaufs nicht immer über die gesamte Nervenlänge zu beurteilen bzw. zu erfassen. Fokale bzw. segmental ablaufende Krankheitsprozesse werden in der Regel nicht erfasst. Die Entnahme des Nervus Suralis hingegen erlaubt die Analyse von klein- und großkalibrigen Nervenfasern im Verlauf, u.a. durch Beurteilung des gesamten Nervs im Querschnitt sowie durch das Einzelfaser-Zupfen von Axonen. Der Einsatz von Hautbiopsien kann ergänzend zu einer Nervenbiopsie die Sensitivität für pathologische Veränderungen im Rahmen der PNP-Diagnostik erhöhen.

4.6 Zu den Unterschieden in den klinisch-diagnostischen Tests

Mit im Median 59,0 Punkten lag der MRC-Gesamtwert unseres Patientenkollektivs näherungsweise an der zu erreichenden Höchstpunktzahl von 60,0 Punkten (mediane Krankheitsdauer 3,0 Jahre), die Patienten wiesen mehrheitlich eine Normalkraft auf. Motorische Defizite an den Muskelgruppen der unteren und oberen Extremität in Folge von PNP ließen sich mittels MRC-Test nicht darstellen. Die Ergebnisse deuten

darauf hin, dass unsere Studienteilnehmer mehrheitlich eine sensible sowie relativ milde Form der PNP aufwiesen. In einer weiteren Arbeit zeigten Patienten ebenfalls milde neurologische PNP-Symptome bei nicht näher beschriebener Krankheitsdauer und einem medianen MRC-Gesamtwert von 54,0 Punkten (Molenaar et al., 1999). Eine weitere Studie konnte bei Patienten mit immunbedingten PNP und einer Krankheitsdauer von 6,9 Jahren ebenfalls eher milde motorische Defizite bei einem MRC-Gesamtwert von 53,3 Punkten beobachten (Merkies et al., 2003). Im Vergleich der MRC-Werte der o.g. Studien zeigte sich, dass Patienten eher von sensiblen, relativ milden PNP-Formen ohne motorische Beteiligung betroffen sind. Anzumerken ist zudem, dass motorische Defizite besser durch den Overall Disability Sum Score (ODSS), vor allem bei immunbedingten PNP, erfasst werden können (Merkies et al., 2002).

Der mediane ODSS-Gesamtwert unseres Patientenkollektivs lag bei 2 Punkten (0-11) als Zeichen für eine moderate Beeinträchtigung von Armen und Beinen durch neuropathische Symptome. Die ODSS-Gesamtwerte unterschieden sich nicht signifikant zwischen PNP- und SFN-Patienten. Beide Patientengruppen wiesen bei der Messung des Grades der Beeinträchtigung von Armen und Beinen durch neuropathische Symptome moderate Werte auf. In einer Studie zu Patienten mit immunvermittelten PNP lag der ODSS-Median bei einem höheren Wert von 4 Punkten (Merkies et al., 2000; Merkies et al., 2002). Die Krankheitsdauer unterschied sich in den o.g. Studien allerdings im Vergleich zur unserer Arbeit. Die Krankheitsdauer unserer Patienten betrug im Median 3,0 Jahre gegenüber 5,1 Jahre in den o.g. Arbeiten. Allerdings waren die Patienten unserer Studie mit medianen 64,0 Jahren um 8 Jahre älter als die Vergleichspatienten der o.g. Studien. Im Vergleich der Arbeiten lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse in den klinisch-diagnostischen Tests möglicherweise anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung des Patientenkollektivs hinsichtlich Alter, Krankheitsdauer und Ätiologie der neuropathischen Symptome erklären.

Die TCNS-Werte von PNP-Patienten waren signifikant höher als die von SFN-Patienten. PNP-Patienten waren stärker von neuropathischen Symptomen betroffen in Form von sensiblen Beeinträchtigungen und symptomalen Komponenten (Schmerzen, Muskelschwäche, Ataxien u.a.).

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich Patienten mit und ohne pathologische Auffälligkeiten in den immunohistochemischen Doppelfärbungen der Hautbiopsie in Bezug auf die klinisch-diagnostischen Testergebnisse unterscheiden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich von Patienten mit und ohne verlängerte Ranvierschnürringe, Dispersion von Caspr und Dispersion von Neurofascin festgestellt werden.

Beim Vergleich der Dichte myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenbündel in Hautbiopsien mit den Ergebnissen der klinisch-diagnostischen Tests zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. In einer zuvor veröffentlichten Studie konnte allerdings bei Patienten mit diabetischer sensomotorischer PNP eine negative Korrelation zwischen der Höhe des TCNS-Scores und der Nervenfaserdichte in Biopsien des Nervus suralis nachgewiesen werden (Bril et al., 2009). Der Verlust myelinisierter Fasern peripherer Nerven hatte in der o.g. Studie einen Einfluss auf das Ergebnis des klinisch-diagnostischen Tests.

Patienten mit einem vollständigen Faserverlust im Hautbiopsat wiesen signifikant höhere TCNS-Werte auf als Patienten ohne Faserverlust. Diese Beobachtung entspricht unseren Erwartungen. Der Verlust von myelinisierten Nervenfasern gilt als charakteristisches Merkmal einer Vielzahl neuropathischer Erkrankungen. Die Schwere klinischer Symptome kann durch einen erhöhten TCNS-Wert quantifizierbar gemacht werden. Eine Korrelation von Faserverlust und klinischen Symptomen bei Patienten mit Charcot-Marie-Tooth Typ 1A, einer erblichen Form peripherer Neuropathien, wurde bereits beschrieben (Krajewski et al., 2000; Saporta et al., 2009).

4.7 Zu den Unterschieden der Krankheitsdauer im Gruppenvergleich

Im Vergleich von Patienten mit und ohne pathologische Auffälligkeiten (verlängerte Ranvier-Schnürringe, Dispersion von Caspr/ Neurofascin, Faserverlust in Hautbiopsien) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf die Krankheitsdauer. Des Weiteren wurde der Einfluss der Krankheitsdauer auf die Dichte myelinisierter und nicht-myelinisierter Nervenbündel an den Biopsiestellen von Ober- und Unter-

schenkel sowie Finger untersucht. Die Reduktion myelinisierter Nervenfasern als Folge von PNP ließe einen Einfluss der Krankheitsdauer auf die Nervenfaserdichte erwarten. In unserer Arbeit zeigte sich allerdings kein signifikanter zeitabhängiger Zusammenhang zwischen Krankheitsdauer und Nervenfaserdichte. Der Einfluss der Krankheitsdauer auf die Dichte myelinisierter Nervenfasern und -bündel wurde zuvor von Doppler et al. (2012) untersucht. Im Gegensatz zu unserer Studie konnte dort aufgezeigt werden, dass Patienten mit einer längeren Krankheitsdauer eine geringere Dichte myelinisierter Nervenfasern und -bündel aufwiesen.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist die Tatsache, dass in der o.g. Studie lediglich eine Biopsiestelle (Oberschenkel) untersucht worden ist. In behaarter Haut ist allerdings eine vergleichsweise geringe Anzahl myelinisierter Nervenfasern anzutreffen, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. In unserer Arbeit ließen sich am Oberschenkel keine signifikanten Ergebnisse nachweisen. Lediglich am - ebenfalls behaarten - Unterschenkel ließ sich ein nicht signifikanter Trend beobachten. Hier zeigte sich, dass Patienten (n=2) mit einer Krankheitsdauer unter einem Jahr die höchste Dichte an myelinisierten Nervenfasern aufwiesen ($p=0,123$; Kruskal-Wallis-Test). Patienten mit einer längeren Krankheitsdauer (n=83) wiesen folglich eine geringere Dichte myelinisierter Nervenfasern auf. Als weitere Erklärung der o.g. Ergebnisse sei darauf hingewiesen, dass die Mehrzahl der PNP längenabhängig ist und daher dermale Nervenfasern des Unterschenkels stärker von einer Schädigung betroffen sein könnten als die des Oberschenkels.

Einschränkend für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sei erwähnt, dass die Studienkohorte mitunter sehr heterogen in Hinblick auf Diagnosen und Schwere der Krankheit ist. Zukünftige Studien mit einem homogeneren Patientenkollektiv wären notwendig, um die o.g. Daten zu bestätigen bzw. zu widerlegen.

4.8 Kritikpunkte der vorliegenden Studie und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Hautbiopsien und Ergebnisse aus klinisch-diagnostischen Tests von 92 Patienten sowie Nervenbiopsien von 40 Patienten untersucht und miteinander verglichen. Eine größere Anzahl an Probanden mit sowohl Haut- als auch Nervenbiopsie wäre zur Verbesserung der Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse wünschenswert gewesen.

Das Patientenkollektiv bestand ausschließlich aus Probanden mit bereits bestehenden neuropathischen Symptomen. Im Gegensatz zu vorherigen Studien wurden keine gesunden Kontrollprobanden rekrutiert, da das Ziel in der aktuellen Studie nicht der Vergleich mit einem Kontrollkollektiv, sondern verschiedener Subklassen von Polyneuropathien untereinander war. In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse aus Haut- und Nervenbiopsien diverser Untergruppen von PNP miteinander zu vergleichen. Daher lässt es sich nicht immer eindeutig klären, ob es sich bei den von uns beobachteten Ergebnissen um Pathologien oder um Normvarianten handelt.

Hinsichtlich des Patientenkollektivs sei angemerkt, dass die Studienteilnehmer in Bezug auf Geschlecht und Alter ungleich verteilt waren. Probanden der Alterskategorie von 66-70 Jahren stellten die größte Gruppe. An zweiter Stelle folgten Patienten im Alter von 71-75 Jahren. 79,3% der Patienten waren über 50 Jahre alt. Nur 20,7% der Patienten waren unter 50 Jahre alt. In der Altersgruppe der unter 30-jährigen befand sich lediglich 1 von 92 Patienten (1,1%). Das im vorliegenden Patientenkollektiv gehäufte Auftreten von neuropathischen Symptomen in der Gruppe der über 50-jährigen stimmt jedoch mit der in der Literatur beschriebenen erhöhten Prävalenz der PNP mit zunehmendem Alter allerdings überein (Beghi & Monticelli, 1998; Martyn & Hughes, 1997), so dass die Studienkohorte dem durchschnittlichen Patientenkollektiv von Patienten mit Polyneuropathien entspricht.

In Bezug auf das Geschlecht der Studienteilnehmer überwog der Anteil männlicher Patienten (Männer: 59,8%) im Vergleich zu weiblichen Studienteilnehmern (Frauen: 40,2%). In vorherigen Arbeiten wurde ebenfalls ein mehrheitliches Vorkommen von PNP beim männlichen Geschlecht beschrieben (Engelhardt, 1994; Koren et al., 2013).

Aufgrund der Technik der Hautstanzbiopsie kann lediglich ein relativ kleines Schnittbild der Dermis mit kleinkalibrigen myelinisierten Axonen analysiert werden. Der undulierende Nervenfaserverlauf erlaubt oftmals keine vollständige Analyse über die gesamte Nervenlänge hinweg. Ranvier-Schnürringe werden mitunter nicht alle erfasst und entziehen sich somit einer Analyse.

Oftmals stellt sich die dermale Innervation in demyelinisierenden Neuropathien als normal dar, so dass v.a. bei entzündlichen Neuropathien wie Guillain-Barré-Syndrom und CIDP neben Elektrophysiologie und Klinik auch eine Nervus Suralis Biopsie in der PNP-Diagnostik zu berücksichtigen sind. Daneben können Neuropathien so schwer ausgeprägt sein, dass Nervenfasern nicht mehr nachweisbar sind und sich somit einer Evaluation entziehen, wodurch die Aussagekraft der Analyse des Einsatzes von Hautbiopsien als Ergänzung in der PNP-Diagnostik eingeschränkt sein kann.

Als weitere Einschränkung sei erwähnt, dass - vor allem in behaarten - Hautbiopsaten lediglich eine relativ kleine Anzahl myelinisierter Nervenfasern im Vergleich zu Biopsien des Nervus Suralis enthalten sind, wodurch die Analyse dermalen Nervenfasern im Rahmen der PNP-Diagnostik signifikant beeinträchtigt werden kann.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Hypothese überprüft, ob pathologisch auffällige Ranvier-Schnürringe Hinweise auf Unterschiede bei PNP-Subgruppen und Schädigungsmuster liefern. Daneben wurden die Hypothesen überprüft, ob Entzündungszellen an myelinisierten Nervenfasern kolokalisiert nachweisbar sind und ob Hautbiopsien einen zusätzlichen Nutzen zur PNP-Basisdiagnostik liefern.

92 Patienten wurden prospektiv im Zeitraum von Oktober 2012 bis November 2013 rekrutiert. Hautbiopsien von Finger, Ober- und Unterschenkel wurden entnommen und daraus gewonnene myelinisierte Nervenfasern der Haut mittels immunohistochemischer Antikörper-Doppelfärbungen analysiert. 40 Studienteilnehmer erhielten im Rahmen der Routinediagnostik zusätzlich Biopsien des Nervus suralis, pathologische Veränderungen der Nervenbiopsien wurden den histologischen Befundberichten entnommen. Alle Studienteilnehmer erhielten neben Hautbiopsien klinisch-neurologische, elektrophysiologische sowie laborchemische Basisuntersuchungen im Rahmen der PNP-Diagnostik.

Verlängerte Ranviersche Schnürringe in mindestens einer immunohistochemischen Färbung in der Hautbiopsie ließen sich bei 55 von 92 Patienten (59,8%) nachweisen. Ätiologisch waren Patienten mit unklarer PNP sowie die Patientengruppe „sonstige PNP“ mehrheitlich von verlängerten Ranvier-Schnürringen betroffen. Axonale und demyelinisierende Schädigungsmuster zeigten sich nahezu gleichermaßen. Signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit bzw. ohne verlängerte Schnürringe in Bezug auf die histologischen Merkmalsausprägungen der Suralisbiopsie und den Ergebnissen aus klinisch-diagnostischen Tests ergaben sich nicht.

Eine Dispersion des nodalen und paranodalen Proteins Neurofascin ließ sich bei 20 von 92 Patienten (21,7%) beobachten. Die Mehrzahl der Fälle fiel auf die Diagnosegruppen „sonstige PNP“ und PNP unklarer Ätiologie. Axonale und demyelinisierende Schädigungsmuster waren gleichermaßen von einer Neurofascin-Dispersion betroffen. Signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit bzw. ohne Dispersion von Neurofascin in Bezug auf die histologischen Merkmalsausprägungen der

Suralisbiopsie und den Ergebnissen aus klinisch-diagnostischen Tests ergaben sich nicht.

Eine Dispersion des paranodalen Proteins Caspr war bei 8 von 92 Patienten (8,7%) nachweisbar. PNP unklarer Ätiologie und die Gruppe „sonstige PNP“ waren mehrheitlich von Caspr-Dispersion betroffen. Caspr-Dispersion konnte mehrheitlich bei axonaler PNP aufgezeigt werden. Infolge der hohen Anzahl an Biopsaten ohne Nervenfasern war allerdings nur selten eine Caspr-Dispersion anzutreffen. Signifikante Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit bzw. ohne Dispersion von Caspr in Bezug auf die histologischen Merkmalsausprägungen der Suralisbiopsie und den Ergebnissen aus klinisch-diagnostischen Tests ergaben sich nicht.

Wir konnten zeigen, dass neuropathische Schädigungsformen vom axonalen und demyelinisierenden Typ keine signifikante Korrelation mit dem Auftreten von verlängerten Ranvier-Schnürringen und der Dispersion charakteristischer paranodaler und nodaler Membranproteine (Neurofascin, Caspr, Pan-Natrium-Kanäle) aufwiesen.

Eine Kolokalisation von Entzündungszellen und myelinisierten Nervenfasern in Hautproben gelang lediglich in wenigen Fällen. Makrophagen ließen sich nur in einem Fall einer nicht-entzündlichen PNP kolokalisiert mit myelinisierten Nervenfasern nachweisen. Die Kolokalisation von T-Zellen und myelinisierten Nervenfasern hingegen konnte bei einem Drittel der Patienten nachgewiesen werden. Hier waren allerdings mehrheitlich nicht-entzündliche PNP-Formen von einer T-Zell-Kolokalisation betroffen. Die gleichzeitige Kolokalisation von Entzündungszellen in Hautbiopsien und der vermehrte Nachweis von Entzündungszellen in Suralisbiopsien konnte keinen signifikanten Zusammenhang aufweisen.

Die Überprüfung der eingangs gestellten Hypothese, dass PNP-Subgruppen Unterschiede in Hinblick auf eine pathologische nodale oder paranodale Organisation aufzeigen, konnte nicht bestätigt werden. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen axonalen und demyelinisierenden Schädigungsformen und pathologisch veränderter Ranvier-Schnürringe sowie disperser nodaler und paranodaler Membranproteine feststellen. Es lässt sich allerdings feststellen, dass bei einer Vielzahl an Hautbiopsien insgesamt eine geringe Anzahl an Ranvier-Schnürringen nachweisbar

und somit zu analysieren war, wodurch die Aussagekraft der vorliegenden Studienergebnisse erheblich eingeschränkt wird.

Der in der Hypothese vermutete Nachweis einer Kolokalisation von Entzündungszellen an myelinisierten Nervenfasern bei entzündlichen PNP konnte nicht bestätigt werden. Der Vergleich von entzündlichen und nicht-entzündlichen Formen der PNP konnte keinen Zusammenhang mit der Kolokalisation von Entzündungszellen an Nervenbündeln in Hautbiopsien aufzeigen.

Der als Hypothese aufgestellte Zusatznutzen von Hautbiopsien in der PNP-Basisdiagnostik kann in Bezug auf die vorliegende Arbeit nur eingeschränkt bestätigt werden. In zahlreichen Hautbiopsien von Ober- und Unterschenkel waren nur wenige Nervenfasern nachweisbar und einer Evaluation zugänglich. Da Fingerbiopsien im Vergleich zu Proben aus Ober- und Unterschenkel eine signifikant höhere Dichte myelinisierter Nervenbündel pro Fläche Dermis aufweisen, wäre es durchaus denkbar, zukünftig primär Fingerbiopsien zu entnehmen um diese auf etwaige pathologische Veränderungen infolge neuropathischer Erkrankungen zu untersuchen. Neben einer Zeitersparnis bei der Diagnostik könnte der Fokus auf eine anstatt auf zwei oder drei Biopsielokalisation das potentielle Risiko biopsieassoziierter Wundheilungsstörungen, v.a. bei Patienten mit einem Diabetes mellitus, verringern. Auch könnte die in dieser Arbeit verwendeten, konventionellen immunohistochemischen Färbemethoden einer Free-Floating-Färbetechnik unterlegen sein. Möglicherweise dringen mittels Free-Floating-Technik Antikörper besser in das zu untersuchende Gewebe ein, wodurch mehr Nervenfasern angefärbt und quantifizierbar gemacht werden können.

Anamnese, Basisdiagnostik und klinischer Befund erbringen nach wie vor den wichtigsten Beitrag zur PNP-Diagnostik. Aufgrund der minimal-invasiven Eigenschaften und der Möglichkeit, Hautproben an unterschiedlichen Lokalisationen des Patienten wiederholt zu entnehmen, ist der Einsatz von Hautbiopsien allerdings zur Analyse morphologischer Veränderungen im Zeitverlauf durchaus denkbar.

6 Anhang

6.1 diagnostische INCAT Kriterien zur Diagnose einer CIDP

Tabelle 18: diagnostische Kriterien der INCAT zur Diagnose einer CIDP

Klinik	
Symptome	Motorische und sensorische Dysfunktionen, von mehr als einer Gliedmaße; signifikante Dysfunktionen in Funktion von Arm oder Bein
Dauer der Symptomatik	Mind. 2 Monate andauernd. Stabile oder progrediente Symptomatik
Reflexstatus	Hypo-/ Areflexie
Elektrophysiologie (Hughes et al., 2001)	
Entweder	Partieller Leitungsblock oder abnormale zeitliche Dispersion in mindestens zwei Nerven. Signifikant reduzierte NLG oder verlängerte dmL oder fehlende bzw. verlängerte minimale F-Wellen Latenz in mindestens einem Nerven.
Oder	In Abwesenheit eines Leitungsblocks oder einer Dispersion muss eine signifikant reduzierte NLG oder eine signifikant verlängerte dmL oder eine fehlende oder verlängerte minimale F-Wellen Latenz in mind. drei Nerven vorhanden sein.
Oder	Bei Vorhandensein signifikanter neurophysiologischer Anomalitäten in maximal zwei Nerven, muss zusätzlich ein histologischer Nachweis einer Demyelinisierung oder von demyelinisierenden Nervenfasern erfolgen
Peripher zu messende Nerven	
N. tibialis	Fossa poplitea, Malleus
N. peroneus	Malleus, ober- und unterhalb des Caput fibulae
N. medianus	Articulatio radio-/ mediocarpalis, Regio cubitalis, Axilla

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Objektträger in feuchter Kammer.....	26
Abbildung 2: Waschung der Objektträger in PBS.....	26
Abbildung 3: Eindecken der Objektträger mit Vectashield, DAPI und Deckglas	27
Abbildung 4: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (grün) und Pan- Natrium (rot)	45
Abbildung 5: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und Caspr (grün)	47
Abbildung 6:: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und Neurofascin (grün)	50
Abbildung 7: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und CD 68 (grün)	52
Abbildung 8: Immunohistochemische Doppelfärbungen mit MBP (rot) und Leu4CD3 (grün)	53
Abbildung 9: Vergleich Faserdichte nicht-myelinisierter Nervenbündel Unterschenkel zwischen PNP- und SFN-Patienten.....	55
Abbildung 10: Vergleich Faserdichte myelinisierter Nervenbündel Finger zwischen PNP- und SFN-Patienten.....	56
Abbildung 11: Vergleich der myelinisierten Nervenfaserdichten nach Lokalisation.....	58
Abbildung 12: Vergleich der nicht-myelinisierten Nervenfaserdichten nach Lokalisation	59
Abbildung 13: Vergleich der Dichte myelinisierter Nervenbündel des Oberschenkels zwischen Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP.....	61
Abbildung 14: Vergleich der Dichte myelinisierter Nervenbündel des Unterschenkels zwischen Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP.....	61
Abbildung 15: Vergleich der Dichte nicht-myelinisierter Nervenbündel des Oberschenkels zwischen Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP	62
Abbildung 16: Gruppenvergleich TCNS-Gesamtscore Biopsien mit/ohne Fasern Färbung Neurofascin und Caspr	64
Abbildung 17: Gruppenvergleich TCNS-Gesamtscore Biopsien mit/ohne Fasern Färbung Neurofascin.....	64
Abbildung 18: Gruppenvergleich TCNS-Gesamtscore Biopsien mit/ohne Fasern Färbung Caspr.....	65

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper-Kombinationen für die Immunofluoreszenz	25
Tabelle 2: Aufstellung 1 über die Anzahl der Patienten mit auswertbaren/nicht auswertbaren Hautbiopsien nach Färbung und Lokalisation.	30
Tabelle 3: Aufstellung 2 über die Anzahl der Patienten mit auswertbaren/nicht auswertbaren Hautbiopsien nach Färbung und Lokalisation	30
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper.....	33
Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper	34
Tabelle 6 Puffer und Lösungen	34
Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien.....	35
Tabelle 8: Geräte	35
Tabelle 9: Software	36
Tabelle 10: Ätiologische Einteilung der Patienten nach PNP-Diagnostik.....	38
Tabelle 11: Ätiologische Einteilung der Patienten mit Suralisbiopsie nach PNP- Diagnostik	40
Tabelle 12: Übersicht histologische Befundung Nervus Suralis Biopsien	43
Tabelle 13: ätiologische Diagnosgruppen und Anzahl der Patienten mit pathologischen Auffälligkeiten an den Ranvier-Schnürringen.....	44
Tabelle 14: Kreuztabelle Anzahl Patienten „Dispersion Caspr ja/nein“ und „Vorkommen Zwiebelschalen Suralisbiopsie ja/nein“	48
Tabelle 15: Übersicht Häufigkeitsverteilung Gruppenkategorie myel. Bündel nach Lokalisation	57
Tabelle 16: Übersicht Häufigkeitsverteilung Gruppenkategorie nicht-myel. Bündel nach Lokalisation	57
Tabelle 17: Zusammenhang zwischen dem Faserverlust in der Hautbiopsie und dem Diagnosekriterium axonale bzw. demyelinisierende PNP	66
Tabelle 18: diagnostische Kriterien der INCAT zur Diagnose einer CIDP	84

7 Literaturverzeichnis

- Arroyo, E. J. & Scherer, S. S. (2000). On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol*, 113(1), 1-18.
- Arroyo, E. J., Xu, T., et al. (2002). Genetic dysmyelination alters the molecular architecture of the nodal region. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), 1726-1737.
- Ballin, R. H. & Thomas, P. K. (1969). Electron microscope observations on demyelination and remyelination in experimental allergic neuritis. I. Demyelination. *J Neurol Sci.*, 8(1), 1-18.
- Baron, R., Binder, A., et al. (2010). Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology*, 9(8), 807-819.
- Beghi, E. & Monticelli, L. (1998). Chronic symmetric symptomatic polyneuropathy in the elderly: a field screening investigation of risk factors for polyneuropathy in two Italian communities. *Journal of clinical epidemiology*, 51(8), 697-702.
- Benatar, M. (2006). Neuromuscular Disease. *Neuromuscular Disease*.
- Blackstock, E., Rushworth, G., et al. (1972). Electrophysiological studies in alcoholism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 35(3), 326-334.
- Boiko, T., Rasband, M. N., et al. (2001). Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron*, 30(1), 91-104.
- Bonnaud-Toulze, E. N. & Raine, C. S. (1980). Remodelling during remyelination in the peripheral nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 6(4), 279-290.
- Boyle, M. E., Berglund, E. O., et al. (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron*, 30(2), 385-397.
- Bril, V., Tomioka, S., et al. (2009). Reliability and validity of the modified Toronto Clinical Neuropathy Score in diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetic Medicine*, 26(3), 240-246.
- Caldwell, J. H., Schaller, K. L., et al. (2000). Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5616-5620.
- Charles, P., Tait, S., et al. (2002). Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Current Biology*, 12(3), 217-220.
- Cifuentes-Diaz, C., Dubourg, O., et al. (2011). Nodes of ranvier and paranodes in chronic acquired neuropathies. *PloS one*, 6(1).
- Collins, M. P., Mendell, J. R., et al. (2000). Superficial peroneal nerve/peroneus brevis muscle biopsy in vasculitic neuropathy. *Neurology*.
- Cui, J. G., Holmin, S., et al. (2000). Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. *Pain*.
- Dalsgaard, C. J., Rydh, M., et al. (1989). Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. *Histochemistry*.
- Doppler, K., Appeltshauser, L., et al. (2015). Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*.

- Doppler, K., Frank, F., et al. (2017). Nodes of Ranvier in skin biopsies of patients with diabetes mellitus. *Journal of the Peripheral Nervous System*.
- Doppler, K., Werner, C., et al. (2012). Analysis of myelinated fibers in human skin biopsies of patients with neuropathies. *J Neurol*, 259(9), 1879-1887.
- Doppler, K., Werner, C., et al. (2013). Disruption of nodal architecture in skin biopsies of patients with demyelinating neuropathies. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, 18(2), 168-176.
- Dugandzija-Novaković, S., Koszowski, A. G., et al. (1995). Clustering of Na⁺ channels and node of Ranvier formation in remyelinating axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 2), 492-503.
- Dupree, J. L., Girault, J. A., et al. (1999). Axo-glial interactions regulate the localization of axonal paranodal proteins. *The Journal of Cell Biology*, 147(6), 1145-1152.
- Dyck, P. J., Gutrecht, J. A., et al. (1968). Histologic and teased-fiber measurements of sural nerve in disorders of lower motor and primary sensory neurons. *Mayo Clin Proc*, 43(2), 81-123.
- Dzhashiashvili, Y., Zhang, Y., et al. (2007). Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *The Journal of Cell Biology*, 177(5).
- Engelhardt, A. (1994). *Vaskulitische Neuropathien: klinische und nervenbiologische Befunde*. (Habil.-Schr), Erlangen, Nürnberg, Univ.
- England & Asbury. (2004). Peripheral neuropathy. *Lancet (London, England)*, 363(9427), 2151-2161.
- England, J. D., Gronseth, G. S., et al. (2009). Practice Parameter: Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: Role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review) Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology*, 72(2), 185-192.
- Feldman, E. L., Grisold, W., et al. (2005). *Atlas of Neuromuscular Diseases A Practical Guideline*. Vienna: Springer-Verlag/Wien.
- Florica, B., Aghdassi, E., et al. (2011). Peripheral Neuropathy in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 41(2), 203-211.
- Foster, R., Whalen, C., et al. (1980). Reorganization of the axon membrane in demyelinated peripheral nerve fibers: morphological evidence. *Science*, 210(4470), 661-663.
- Gehlen, W. & Delank, H.-W. (2010). *Neurologie 96 Tabellen* (12., vollst. überarb. Aufl. ed.). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Gemignani, F., Marbini, A., et al. (1994). Peripheral neuropathy associated with primary Sjögren's syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 57(8), 983-986.
- Griffin, J. W., George, R., et al. (1993). Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol*, 52(6), 553-560.
- Griffin, J. W., Li, C. Y., et al. (1996). Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barré syndrome. *Journal of neurocytology*, 25(1), 33-51.
- Griffin, J. W., Stoll, G., et al. (1990). Macrophage responses in inflammatory demyelinating neuropathies. *Annals of neurology*.
- Herrlinger, U., Steinbach, J. P., et al. (2010). Neurologische Komplikationen der neuroonkologischen Therapie. *Der Nervenarzt*.
- Heuss, D., Haupt, W. F., et al. (2012). *Diagnostik bei Polyneuropathien*. Stuttgart: Thieme.

- Hietaharju, A., Jääntti, V., et al. (1993). Nervous system involvement in systemic lupus erythematosus, Sjögren syndrome and scleroderma. *Acta Neurologica Scandinavica*, 88(4), 299-308.
- Hiraga, A., Mori, M., et al. (2003). Differences in patterns of progression in demyelinating and axonal Guillain-Barre syndromes. *Neurology*, 61(4), 471-474.
- Hiraga, A., Mori, M., et al. (2005). Recovery patterns and long term prognosis for axonal Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(5), 719-722.
- Ho, T. W., Willison, H. J., et al. (1999). Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 45(2), 168-173.
- Howell, O. W., Palser, A., et al. (2006). Disruption of neurofascin localization reveals early changes preceding demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, 129(12), 3173-3185.
- Hughes, Swan, A. V., et al. (2007). Immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: a systematic review. *Brain*, 130(Pt 9), 2245-2257.
- Hughes, R. (2002). Regular review: Peripheral neuropathy. *BMJ*, 324(7335), 466-469.
- Hughes, R., Bensa, S., et al. (2001). Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol*, 50(2), 195-201.
- Koren, P. J., Erdler, M., et al. (2013). Polyneuropathie – Ätiologie, Geschlechterverteilung und Altersdurchschnitt in Ost-Österreich, eine retrospektive Datenanalyse an 278 Patienten. *Klinische Neurophysiologie*, 44(01), 10-17.
- Koskinen, M., Hietaharju, A., et al. (2005). A quantitative method for the assessment of intraepidermal nerve fibers in small-fiber neuropathy. *J Neurol*, 252(7), 789-794.
- Krajewski, K. M., Lewis, R. A., et al. (2000). Neurological dysfunction and axonal degeneration in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain*.
- Lauria, G. (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. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 15(2).
- Lauria, G., Borgna, M., et al. (2004). Tubule and neurofilament immunoreactivity in human hairy skin: markers for intraepidermal nerve fibers. *Muscle Nerve*, 30.
- Li, J., Bai, Y., et al. (2005). Skin biopsies in myelin-related neuropathies: bringing molecular pathology to the bedside. *Brain*, 128(5), 1168-1177.
- Lindenlaub, T. & Sommer, C. (2003). Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta neuropathologica*, 105(6), 593-602.
- Loffel, N. B., Rossi, L. N., et al. (1977). The Landry-Guillain-barre syndrome. Complications, prognosis and natural history in 123 cases. *J Neurol Sci*, 33(1-2), 71-79.
- Lonigro, A. & Devaux, J. J. (2009). Disruption of neurofascin and gliomedin at nodes of Ranvier precedes demyelination in experimental allergic neuritis. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 1), 260-273.
- Lumpkin, E. A. & Caterina, M. J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, 445(7130), 858-865.
- Magerl, W., Maihöfner, C., et al. (2010). Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain*.
- Martyn, C. & Hughes, R. (1997). Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol*.

- Merkies, I. S. J., Schmitz, P. I. M., et al. (2000). Psychometric evaluation of a new sensory scale in immune-mediated polyneuropathies. *Neurology*.
- Merkies, I. S. J., Schmitz, P. I. M., et al. (2002). Clinimetric evaluation of a new overall disability scale in immune mediated polyneuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 72(5), 596-601.
- Merkies, I. S. J., Schmitz, P. I. M., et al. (2003). Connecting impairment, disability, and handicap in immune mediated polyneuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(1), 99-104.
- Moalem, G., Xu, K., et al. (2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience*, 129(3), 767-777.
- Mold, J. W., Vesely, S. K., et al. (2004). The prevalence, predictors, and consequences of peripheral sensory neuropathy in older patients. *The Journal of the American Board of Family Practice / American Board of Family Practice*, 17(5), 309-318.
- Molenaar, D. S. M., Vermeulen, M., et al. (1999). Impact of neurologic signs and symptoms on functional status in peripheral neuropathies. *Neurology*.
- Mueller, M., Wacker, K., et al. (2001). Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *The American Journal of Pathology*, 159(6), 2187-2197.
- Myers, I. M., Peltier, A. C., et al. (2013). Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy. *Muscle & nerve*, 47(1), 1-11.
- Nolano, M., Provitera, V., et al. (2003). Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin. *Annals of neurology*, 54(2), 197-205.
- Novakovic, S., Levinson, S., et al. (1998). Disruption and reorganization of sodium channels in experimental allergic neuritis. *Muscle Nerve*, 21(8), 1019-1032.
- Novakovic, S., TJ, D., et al. (1996). Clusters of axonal Na⁺ channels adjacent to remyelinating Schwann cells. *Journal of neurocytology*, 25(1), 403-412
- Partanen, J., Niskanen, L., et al. (1995). Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 333(2), 89-94.
- Plasmati, R., Pastorelli, F., et al. (2007). Neuropathy in multiple myeloma treated with thalidomide: a prospective study. *Neurology*, 69(6), 573-581.
- Poliak & Peles. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(12), 968-980.
- Poliak, S., Gollan, L., et al. (1999). Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*, 24(4), 1037-1047.
- Polydefkis, M., Yiannoutsos, C. T., et al. (2002). Reduced intraepidermal nerve fiber density in HIV-associated sensory neuropathy. *Neurology*, 58(1), 115-119.
- Provitera, V., Nolano, M., et al. (2007). Myelinated nerve endings in human skin. *Muscle & nerve*, 35(6), 767-775.
- Rasband, M. N., Kagawa, T., et al. (2003). Dysregulation of axonal sodium channel isoforms after adult - onset chronic demyelination. *Journal of Neuroscience Research*, 73(4), 465-470.
- Rasband, M. N., Trimmer, J. S., et al. (1998). Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(1), 36-47.
- Reilly, M. M. & Shy, M. E. (2009). Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80(12), 1304-1314.
- Rode, J., Dhillon, A. P., et al. (1985). PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Pain*, 150, 439 - 450.

- Rolke, R., Baron, R., et al. (2006). Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values*.
- Ropper, A. H. & Gorson, K. C. (1998). Neuropathies associated with paraproteinemia. *The New England journal of medicine*, 338(22), 1601-1607.
- Rosenbaum, R. (2001). Neuromuscular complications of connective tissue diseases. *Muscle & nerve*, 24(2), 154-169.
- Salzer, J. L. (1997). Clustering sodium channels at the node of Ranvier: close encounters of the axon-glia kind. *Neuron*, 18(6), 843-846.
- Saperstein, D. S., Wolfe, G. I., et al. (2003). Challenges in the identification of cobalamin-deficiency polyneuropathy. *Archives of Neurology*, 60, 1296 - 1301.
- Saporta, Sottile, S. L., et al. (2011). Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Annals of neurology*, 69(1), 22-33.
- Saporta, M. A., Katona, I., et al. (2009). Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain*, 132(12), 3263-3273.
- Scherer, S. S. & Arroyo, E. J. (2002). Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst*, 7(1), 1-12.
- Sherman, D. L. & Brophy, P. J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(9), 683-690.
- Sherman, D. L., Tait, S., et al. (2005). Neurofascins Are Required to Establish Axonal Domains for Saltatory Conduction. *Neuron*, 48(5).
- Smith, A. G. & Singleton, J. R. (2004). The diagnostic yield of a standardized approach to idiopathic sensory-predominant neuropathy. *Archives of internal medicine*.
- Sommer, C. (2001). Cytokines in neuropathic pain. *Der Anaesthetist*, 50(6).
- Sommer, C., Brandner, S., et al. (2010). Peripheral Nerve Society Guideline on processing and evaluation of nerve biopsies. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 15(3), 164-175.
- Sommer, C., Koch, S., et al. (2005). Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology*, 65(12), 1924-1929.
- Sommer, C. & Lauria, G. (2007). Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *The Lancet Neurology*, 6(7), 632-642.
- Stoll, G., Jander, S., et al. (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 7, 13 - 27.
- Susuki, K., Rasband, M. N., et al. (2007). Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *The Journal of Neuroscience*, 27(15), 3956 - 3967.
- Taylor, B. V., Dyck, J. P. B., et al. (2004). Multifocal Motor Neuropathy: Pathologic Alterations at the Site of Conduction Block. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(2), 129-137.
- Tredici, G. & Minazzi, M. (1975). Alcoholic neuropathy. An electron-microscopic study. *J Neurol Sci*, 25(3), 333-346.
- Üçeyler, N., Braunsdorf, S., et al. (2016). Cellular infiltrates in skin and sural nerve of patients with polyneuropathies. *Muscle & nerve*.
- Üçeyler, N., Devigili, G., et al. (2010). Skin biopsy as an additional diagnostic tool in non-systemic vasculitic neuropathy. *Acta neuropathologica*.
- Üçeyler, N., Kafke, W., et al. (2010). Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy. *Neurology*, 74(22), 1806-1813.

- Vallat, J. M., Sommer, C., et al. (2010). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol*, 9(4), 402-412.
- Van Asseldonk, J. T., Franssen, H., et al. (2005). Multifocal motor neuropathy. *Lancet Neurol*, 4(5), 309-319.
- Van den Bergh, P. Y., Hadden, R. D., et al. (2010). 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. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 17(3), 356-363.
- Vlčková - Moravcová, E., Bednařík, J., et al. (2008). Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle & nerve*, 37(1), 50-60.
- Wang, H., Kunkel, D. D., et al. (1993). Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. *Nature*, 365(6441), 75-79.
- Wasner, G. (2012). Diagnostik neuropathischer Schmerzen. *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*.
- Watson, J. C. & Dyck, J. P. B. (2015). Peripheral Neuropathy: A Practical Approach to Diagnosis and Symptom Management. *Mayo Clinic Proceedings*, 90(7), 940-951.
- Waxman, S. G. & Ritchie, J. M. (1993). Molecular dissection of the myelinated axon. *Annals of neurology*, 33(2), 121-136.
- Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. (2003). Medium- and large-vessel vasculitis. *The New England journal of medicine*, 349(2), 160-169.
- Young, M. J., Boulton, A. J. M., et al. (1993). A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia*.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben:

- Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer für die Überlassung und Betreuung des Dissertationsthemas
- Frau Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler für die unermüdliche und aufopferungsvolle Betreuung des Dissertationsthemas sowie die inhaltliche und organisatorische Unterstützung bis zum Fertigstellen der Arbeit
- Allen Mitarbeitern des histologischen Labors der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg und der AG von Frau Prof. Dr. Sommer für die stets freundliche Unterstützung und Einführung in die Arbeitstechniken. Besonders gilt mein Dank Frau Barbara Dekant sowie Frau Hiltrud Klüpfel, Frau Barbara Broll und Frau Kathleen Stahl
- Den Mitgliedern der AG von Frau Prof. Dr. med. Sommer für die hilfreichen und konstruktiven Ratschläge während der gesamten Promotionszeit.

Kurzversion Lebenslauf Alexander Pina Kilgué

Ausbildung

- 04/2010 – 06/2016 **Julius-Maximilians-Universität Würzburg**
Studium der Humanmedizin
Praktisches Jahr (05/2015 - 04/2016)
- Innere Medizin (Universitätsklinikum Würzburg)
- Chirurgie (Klinikum Bielefeld Mitte)
- Wahltertial Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Klinikum Bielefeld Mitte)
- 04/2005 – 09/2009 **Hochschule für Technik und Wirtschaft Berlin**
Ecole Supérieure de Commerce Extérieur (ESCE) Paris
Studium der Betriebswirtschaftslehre
Abschluss: Diplom-Kaufmann (FH)

Berufliche Tätigkeiten

- Seit 10/2016 **Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie -
Klinikum Bielefeld Mitte**
Assistenzarzt

Bielefeld , April 2018

Alexander Pina Kilgué