

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Volkmann

**Untersuchung von Veränderungen der myelinisierten Nervenfasern durch
Entmarkung in Haut- und Nervenbiopsien von Patienten mit Polyneuropathie**



Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kai Alexander Wilhelmi

aus Trier

Würzburg, Oktober 2023

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

Korreferent: Prof. Dr. med. Heike Rittner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2024

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Polyneuropathien	1
1.2 In Studie eingeschlossene Polyneuropathie-Formen.....	2
1.2.1 GBS (Guillain-Barré-Syndrom) bzw. AIDP (akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie).....	2
1.2.2 CIDP (chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie)	3
1.2.3 MMN (multifokale motorische Neuropathie)	3
1.2.4 MADSAM (multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Polyneuropathie).....	4
1.2.5 HNPP (Hereditäre Polyneuropathie mit Neigung zu Druckpareesen)	4
1.2.6 HMSN1A (hereditäre motorische und sensible Neuropathie 1A)	4
1.2.7 SFN (Small Fiber Neuropathien)	5
1.2.8 Paraproteinämische PNP	6
1.2.9 Vaskulitische PNP	6
1.3 Nervenleitungsstudien.....	7
1.4 Mikroarchitektur der peripheren Nerven.....	8
1.4.1 Aufbau	8
1.4.2 Internodium.....	9
1.4.3 Juxtaparanodium	9
1.4.4 Paranodium	9
1.4.5 Nodium	10
1.5 Axonale periphere Neuropathien	10
1.6 Demyelinisierende periphere Neuropathien.....	11
1.7 Untersuchte Nerven	11
1.7.1 Hautnerven	11
1.7.2 Nervus suralis.....	12
1.8 Methoden zur Untersuchung von Hautnerven	13
1.9 Hypothese dieser Arbeit.....	14

2 Material und Methoden	15
2.1 Ethikvotum	15
2.2 Fallzahlplanung	15
2.3 Patientengruppe	15
2.4 Kontrollgruppe.....	16
2.5 Materialgewinnung für Hautbiopsien und Zupfnerven.....	16
2.5.1 Entnahme der Hautbiopsien	16
2.5.2 Erstellung der Gefrierschnitte durch Mitarbeiterinnen des Neurohistologie Labors.....	17
2.5.3 Entnahme und Vorbereitung des Nervus suralis	17
2.5.4 Anfertigung der Zupfnerven.....	18
2.6 Durchführung der Doppelfärbungen.....	19
2.6.1 Färbung der Hautschnitte	19
2.6.2 Färbung der Zupfnerven.....	20
2.7 Auswertung	24
2.8 Elektrophysiologische Untersuchung	25
2.8.1 Nervus tibialis motorisch.....	25
2.8.2 Nervus medianus motorisch	26
2.8.3 Nervus medianus sensibel	26
2.8.4 Nervus suralis sensibel.....	26
2.9 Statistische Auswertung.....	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Beschreibung der Patientengruppe.....	27
3.2 Beschreibung der Kontrollgruppe.....	27
3.3 Fingerhautbiopsien.....	28
3.3.1 Durchschnittliche normale Schnürringlänge in Fingerhautbiopsien.....	28
3.3.2 Qualität und Beurteilbarkeit der Doppelfärbungen der Fingerhautbiopsien und Verteilung der beobachteten Schnürringveränderungen in den PNP-Subgruppen	28
3.3.2.1 Caspr/MBP-Doppelfärbung.....	28
3.3.2.2 NF/MBP-Doppelfärbung.....	29

3.3.2.3 Pan-Na-Kanal/MBP-Doppelfärbung	30
3.3.2.4 Alle Doppelfärbungen mit MBP	32
3.3.3 Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien von Patienten- und Kontrollgruppe	32
3.4 Nervus suralis Biopsien.....	34
3.4.1 Patientenkollektiv mit Zupfnerven-Präparaten.....	34
3.4.2 Qualität und Beurteilbarkeit der Doppelfärbungen der Zupfnerven und Verteilung der beobachteten Schnürringveränderungen unter Berücksichtigung der Ätiologie.....	34
3.4.3 Befunde der histologischen Routinediagnostik unter Berücksichtigung der Ätiologie.....	35
3.4.4 Vergleich der histologischen Routinediagnostik mit den Schnürringveränderungen in Zupfnerven	36
3.4.5 Vergleich der Schnürringveränderungen in Zupfnerven und Hautbiopsien..	37
3.5 Elektrophysiologische Messungen	38
3.5.1 Patienten und Messverfahren.....	39
3.5.2 Elektrophysiologische Schädigungsmuster bei unterschiedlichen Ätiologien der Polyneuropathien	40
3.5.3 Schnürringveränderungen der Fingerhautbiopsien in Abhängigkeit der einzelnen elektrophysiologischen Messgrößen.....	41
3.5.4 Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien in Abhängigkeit des Befundes der elektrophysiologischen Untersuchungen	44
3.5.5 Schnürringveränderungen in Zupfnerven in Abhängigkeit von der elektrophysiologischen Gesamtdiagnose	46
3.6 Beschreibung der PNP-Subgruppen unter Berücksichtigung der Schnürringveränderungen aus Fingerhautbiopsien und Zupfnerven und der elektrophysiologischen Einordnung	47
3.6.1 Ätiologisch demyelinisierende Polyneuropathien	47
3.6.2 Ätiologisch nicht-demyelinisierende Polyneuropathien	48
3.6.3 Übersicht der Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien bei ätiologisch demyelinisierenden und nicht-demyelinisierenden Polyneuropathien .	50

4 Diskussion.....	53
4.1 Einleitung	53
4.2 Patientengruppe.....	53
4.3 Kontrollgruppe.....	54
4.4 Auswertung der Fingerhautbiopsien	55
4.4.1 Normale Schnürringlänge in Fingerhautbiopsien der Kontrollgruppe.....	55
4.4.2 Qualität und Beurteilbarkeit der prozessierten Fingerhautbiopsien.....	55
4.4.2 Einleitung zur Auswertung der Färbungen und der erhobenen Daten	56
4.4.3 Natriumkanal-Färbung.....	58
4.4.4 MBP-Färbung	60
4.4.5 Caspr-Färbung	61
4.4.6 Neurofascin-Färbung.....	63
4.4.7 Internodopathien, Paranodopathien, Nodopathien.....	63
4.5 Auswertung der Zupfnerven.....	64
4.6 Hautbiopsien zur Untersuchung myelinisierter Axone	66
5 Zusammenfassung.....	68
6 Appendix	69
6.1 Abkürzungsverzeichnis	69
6.2 Abbildungsverzeichnis	72
6.3 Tabellenverzeichnis	73
6.4 Literaturverzeichnis	74

Danksagung

1 Einleitung

1.1 Polyneuropathien

Der Begriff Polyneuropathie fasst eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammen, die mehrere periphere Nerven betreffen. An den Wurzeln der Spinal- und Hirnnerven existiert an den Ranvierschen Schnürringen eine scharfe Grenze zwischen der zentralen Glia, bestehend aus Oligodendrozyten und den peripheren Schwannzellen. (Osen, Furness, & Hackney, 2011) Zum peripheren Nervensystem gehören alle Nervenabschnitte und Plexus distal dieser Grenze. Es besteht somit aus Nerven, die sich in Länge, Myelinisierung, Leitungsrichtung, Leitungsgeschwindigkeit und Funktion deutlich unterscheiden. Abhängig von den jeweils geschädigten Nerven, sind bei Polyneuropathien also autonome, motorische und sensible Symptome in verschiedenen Bereichen des Körpers möglich. Bedenkt man die Prävalenz von 8/100.000 allein für die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP) und den teilweise langen Weg von den ersten Beschwerden bis zur endgültigen Diagnose und damit zur passenden Therapie wird klar, dass weitere Werkzeuge für eine effiziente Diagnostik dringend benötigt werden. (Bril et al., 2016)

Die Eingrenzung der in Frage kommenden PNP erfolgt folgendermaßen (Heuß, D. et al, 2019): Durch Anamnese, sowie klinische und laborchemische Untersuchungen werden Verteilung, zeitliche Entwicklung und Qualität der Symptome, sowie möglicherweise ursächliche Erkrankungen bestimmt. Nervenleitungsstudien liefern Hinweise zur Art (axonal, demyelinisierend, gemischt) und zur Lokalisation beziehungsweise zum Verteilungsmuster der Nervenschäden. In Hautbiopsien wird unter anderem nach Zeichen einer Vaskulitis gesucht und die Nervenfaserdichte der Epidermis als Indikator für eine Neuropathie der kleinen Nervenfasern bewertet. Bei Verdacht auf eine entzündliche Genese, insbesondere auf Vaskulitis, ist eine Biopsie des Nervus suralis oftmals indiziert. Hier kommen Semidünnschnitte, Immunhistochemie und andere Färbungen zur Anwendung.

Die Diagnose ergibt sich häufig erst in Zusammenschau aller Befunde. Das Therapiespektrum bei den verschiedenen Polyneuropathien umfasst je nach Ursache beispielsweise immunsuppressive und immunmodulatorische Therapien bei entzündlichen Polyneuropathien, sowie intravenöse Immunglobuline oder

Plasmapherese beim Guillain-Barré-Syndrom. Auch die optimale Therapie zugrundeliegender Krankheiten wie beispielsweise Diabetes mellitus, spielt eine wichtige Rolle. Symptomatisch erfolgt bei neuropathischen Schmerzen eine multimodale Therapie unter Einbeziehung von physikalischen Maßnahmen und speziell gegen neuropathische Schmerzen gerichteten Medikamenten, wie z. B. Pregabalin, Gabapentin, Amitriptylin oder Duloxetin. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Versorgung mit Hilfsmitteln und Physiotherapie. Beim Guillain-Barré-Syndrom muss die supportive Therapie teils bis hin zur intermittierenden Intensivtherapie mit Intubation und Beatmung eskaliert werden. (Sommer C. et al., 2018)

1.2 In Studie eingeschlossene Polyneuropathie-Formen

1.2.1 GBS (Guillain-Barré-Syndrom) bzw. AIDP (akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie)

Beim GBS bzw. der AIDP liegt eine monophasische, akute, entzündliche und demyelinisierende Polyneuropathie vor, die sich typischerweise nach einem respiratorischen oder nach einem gastrointestinalen Infekt, häufig mit *Campylobacter jejuni*, manifestiert. Zuletzt wurde auch das Auftreten nach Infektionen mit SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2) beschrieben. (Sedaghat & Karimi, 2020; Virani et al., 2020) Ursächlich wird molekulares Mimikry vermutet. Führend sind in der Regel an der unteren Extremität beginnende und über etwa zwei Wochen progrediente Paresen mit Areflexie, welche in etwa 30 % der Fälle zu einer intermittierenden Beatmungspflichtigkeit führen. Schwere autonome Symptome treten in 20 % der Fälle auf. (Hughes et al., 2007) Sensible Symptome zu Beginn sind eher mild ausgeprägt. Im Verlauf entwickelt ungefähr die Hälfte der Patienten (diese Formulierung schließt hier und folgend alle Geschlechter mit ein) behandlungsbedürftige neuropathische Schmerzen. Im Liquor findet sich eine zytalbuminäre Dissoziation. Im Blut können in etwa 14 % der Fälle Gangliosid-Antikörper nachgewiesen werden. (Taams et al., 2018) Therapeutisch stehen Intensivtherapie und Plasmapherese oder die Applikation von intravenösem Immunglobulin im Vordergrund. Um Residuen zu minimieren ist auch Physiotherapie nötig. Ist die Erkrankung länger als vier Wochen progredient, handelt es sich per Definition um eine CIDP. (Heuß, D. et al, 2019; Ropper, 1992; Yuki & Hartung, 2012)

1.2.2 CIDP (chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie)

Typisch ist eine chronisch progrediente symmetrische Schwäche der proximalen und distalen Extremitätenmuskulatur, die auch mit einer Abschwächung oder dem Ausfall der Muskeleigenreflexe einhergeht. Sensible Negativsymptome (z.B. Hypästhesie, Hypalgesie, Thermhypästhesie, Pallhypästhesie) sind häufig und Schmerzen möglich. Autonome oder bulbäre Symptome, sowie eine Beteiligung von Hirnnerven, sind hingegen eher selten. (Dimachkie & Barohn, 2013) Wie bei der AIDP, findet sich auch bei der CIDP eine zytoalbuminäre Dissoziation im Liquor. (Heuß, D. et al, 2019) Die Suralisbiopsie zeigt nicht immer Zeichen der Demyelinisierung (demyelinisierte und remyelinisierte Fasern, Zwiebelschalenformationen), da die motorischen Symptome oft überwiegen und es sich bei dem oft für Biopsien gewählten Nervus suralis um einen rein sensiblen Nerven handelt. (Van den Bergh et al., 2021) In unklaren Fällen kann die Biopsie aber zur differentialdiagnostischen Abgrenzung einer Amyloidose, Sarkoidose oder Vaskulitis beitragen. (Dimachkie & Barohn, 2013) In Ultraschall und Magnetresonanztomographie können sich Spinalwurzeln und Plexus verdickt und mit einer Kontrastmittelanreicherung darstellen. (Heuß, D. et al, 2019; Van den Bergh et al., 2021) Das Spektrum möglicher Therapien umfasst intravenöse Immunglobuline, Plasmapherese, Glucocorticoide oder Immunsuppression, die Schmerztherapie, Physiotherapie und die Versorgung mit Hilfsmitteln. (Sommer C. et al., 2018)

1.2.3 MMN (multifokale motorische Neuropathie)

Bei der MMN handelt es sich um eine seltene, vermutlich immunologisch bedingte, rein motorische demyelinisierende Neuropathie, meist mit Leitungsblöcken. Etwa die Hälfte der Patienten weisen erhöhte GM1-IgM-Antikörpertiter auf. Möglicherweise richten sich diese Antikörper aufgrund von molekularem Mimikry gegen das im Axolemm und Myelin vorkommende Gangliosid GM1. Da dieses besonders im Bereich der Schnürringe konzentriert ist, könnte es hier so zu einer Zerstörung der bestehenden Strukturen kommen. (Hameed & Cascella, 2020; Nobile-Orazio, Giannotta, Musset, Messina, & Léger, 2014) Kennzeichnend ist eine langsam progressive asymmetrische Schwäche und im Verlauf auch Atrophie von einzelnen Muskeln. Oft ist die Hand zuerst betroffen. Sensible Symptome fehlen. Zu Beginn ist die MMN von der amyotrophen Lateralsklerose oft schwer zu unterscheiden. Mit der regelmäßigen Verabreichung von Immunglobulinen kann meist eine gute Symptomkontrolle erreicht werden. Plasmapherese und Glucocorticoide sind hingegen unwirksam oder führen

sogar zu einer Verschlechterung. (Heuß, D. et al, 2019; Nguyen & Chaudhry, 2011; Sommer C. et al., 2018)

1.2.4 MADSAM (multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Polyneuropathie)

Diese auch als Lewis-Sumner Syndrom bezeichnete PNP-Form tritt, wie der Name schon sagt, als Mononeuropathia multiplex mit sensiblen und motorischen Symptomen auf und zeichnet sich wie die MMN durch Leitungsblöcke aus. Bis auf das asymmetrische Verteilungsmuster und die stärkere Beteiligung sensibler Nerven, entspricht die MADSAM und ihre Behandlung weitgehend der CIDP. (Meuth & Kleinschnitz, 2010)

1.2.5 HNPP (Hereditäre Polyneuropathie mit Neigung zu Druckparesen)

Diese auch als tomakulöse PNP bezeichnete Variante, wird autosomal dominant vererbt und ist durch eine Deletion des PMP22 (peripheres Myelinprotein) -Gens verursacht. Somit steht weniger dieses Proteins für die korrekte Myelinbildung zur Verfügung. Erkrankte Patienten werden meist vor dem dreißigsten Lebensjahr mit Paresen von druckexponierten Nerven symptomatisch. Die Paresen bilden sich innerhalb von Tagen bis Monaten zurück. Residuen können jedoch verbleiben. Die Patienten zeigen im Verlauf auch ohne Druckparesen elektrophysiologisch Zeichen einer generalisierten demyelinisierenden sensiblen PNP und einer geringen demyelinisierenden motorischen PNP. Nervenbiopsien zeigen fokale „tomakulöse“ Verdickungen der Myelinscheiden. Die Patienten müssen Situationen, die zur Ausbildung von Druckparesen führen, vermeiden und bei Bedarf mit Physiotherapie, Ergotherapie und technischen Hilfsmitteln wie zum Beispiel mit orthopädischen Schuhen und Gehhilfen versorgt werden. Eine kausale Therapie steht nicht zur Verfügung. (van Paassen et al., 2014)

1.2.6 HMSN1A (hereditäre motorische und sensible Neuropathie 1A)

Die HMSN1A wird durch verschiedene Mutationen des PMP22-Gens verursacht. Das Genprodukt ist ein Protein der Schwanzzellen. Es werden verschiedene Mutationsformen und klinische Ausprägungen der HMSN unterschieden. Die häufigste ist mit einer geschätzten Prävalenz von 40/100.000 die HMSN1A, historisch CMT1A für

Charcot-Marie-Tooth Disease. Hierbei handelt es sich um eine demyelinisierende PNP, bei der es meistens durch eine Verdopplung des PMP22-Gens zu einer Überexpression des entsprechenden peripheren Myelin Proteins 22 in den Schwann-Zellen kommt, wodurch es nicht mehr richtig prozessiert werden kann. Somit liegt im Endeffekt eine Verminderung von funktionsfähigem PMP22 vor. Die akkumulierenden geschädigten Proteine beeinträchtigen die Myelinbildung zusätzlich. Liegt hingegen eine Punktmutation vor, akkumuliert das Protein in den Schwannzellen und wird gar nicht in die Myelinscheide eingebaut. Patienten mit dieser selteneren Mutationsvariante der CMT1A weisen oft eine stärkere Symptomatik auf. (Hanemann & D'Urso, 2000) Die ersten Symptome treten typischerweise vor dem zwanzigsten Lebensjahr auf. Es kommt zu einer symmetrischen Schwäche der Fuß- und Beinmuskulatur und zu einem Verlust der Oberflächen- und Tiefensensibilität, was zu Beginn zu einem unsicherer werdenden Gang und später zu sichtbaren Muskelatrophien und Haltungsschäden führt. Für die hereditären PNP stehen keine kausalen Therapien zur Verfügung. Hier steht die Versorgung mit Hilfsmitteln, die Vermeidung von Folgeschäden und die Aufrechterhaltung der Mobilität und Lebensqualität im Vordergrund. (Heuß, D. et al, 2019; van Paassen et al., 2014)

1.2.7 SFN (Small Fiber Neuropathien)

SFN treten als Komplikation einiger Erkrankungen, genetisch bedingt oder idiopathisch auf. Leitsymptom sind distal betonte, meist brennende Schmerzen, Thermhypästhesie und Hypalgesie, objektivierbar durch eine quantitative sensorische Testung, aber auch autonome Symptome sind möglich. Ursächlich ist eine meist längenabhängige Schädigung der dünnen A-delta und C-Fasern. In Hautbiopsien kann meist eine längenabhängige Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte gezeigt werden, während die Nervenleitungsstudien ohne pathologischen Befund sind. Auch nicht-längenabhängige SFN-Formen mit fleckförmigen betroffenen Arealen, z. B. im Bereich von Gesicht und Rumpf, treten auf. Vor allem bei entzündlicher oder autoimmuner Genese, wie z. B. bei Ganglionitis. (Gemignani, Bellanova, Sacconi, & Pavesi, 2022; Themistocleous, Ramirez, Serra, & Bennett, 2014) Behandelt werden Grunderkrankungen und die neuropathischen Schmerzen. (Sommer C. et al., 2018)

1.2.8 Paraproteinämische PNP

Treten PNP in Verbindung mit einem monoklonalen Paraprotein im Serum auf und besteht ein ätiologischer Zusammenhang, spricht man von paraproteinämischen PNP. Im Serum lassen sich je nach zu Grunde liegender Erkrankung freie schwere Ketten (von IgM, IgG, IgA, IgD, IgE), freie leichte Ketten (kappa, lambda) oder monoklonale Antikörper (vor allem IgM, IgG oder IgA) nachweisen. (Heuß, D. et al, 2019; Rison & Beydoun, 2016) Mögliche Ursachen für die Produktion der Paraproteine sind unter anderem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (z.B. Multiple Myelome wie Plasmozytom und POEMS (Polyneuropathie-Organomegalie-Endokrinopathie-M-Gradient-Skin Lesions) -Syndrom, die Makroglobulinämie Morbus Waldenström), oder andersbedingte Kryoglobulinämien. (Herold, Gerd und Mitarbeiter, 2017; Shankland, Armitage, & Hancock, 2012) Am häufigsten liegt aber keine dieser Erkrankungen, sondern eine monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) vor. In einigen Fällen mit IgM-Paraprotein finden sich monoklonale Antikörper gegen das Myelin assoziierte Glykoprotein (anti-MAG) im Serum. Damit assoziiert ist die klinische Präsentation in Form der DADS (distal acquired demyelinating symmetric) -Neuropathie. Paraproteinämische PNP manifestieren sich generell als längenabhängige, axonale oder demyelinisierende, sensomotorische PNP. (Rison & Beydoun, 2016) Je nach Ursache wird mit intravenösen Immunglobulinen, Plasmapherese, Glucocorticoiden, Immunsuppression, Rituximab, Resektion eines Plasmozytoms, Bestrahlung oder sogar Stammzelltransplantation behandelt. Um eine Therapieentscheidung zu treffen, muss die Schwere der Symptomatik gegen das Risiko der Therapie abgewogen werden. (Sommer C. et al., 2018)

1.2.9 Vaskulitische PNP

Grund für den Nervenschaden ist hier eine Ischämie durch eine Entzündung der Vasa nervorum. Vaskulitische PNP treten als Begleiterscheinung einer systemischen Vaskulitis auf oder es kann eine isolierte Vaskulitis der Vasa nervorum ohne Systembeteiligung (= NSVN: nicht systemische Vaskulitis des peripheren Nerven) vorliegen. Dies kann auch die Erstmanifestation einer später systemisch werdenden Vaskulitis sein. Immunkomplexablagerungen in den Gefäßwänden führen zu einer Aktivierung des Immunsystems und über Inflammation zur Nervenschädigung. Zudem werden die Axone aufgrund des gestörten Blutflusses ischämisch und sterben ab. (Vrancken & Said, 2013) Die Symptome wie Schmerzen, Hypästhesie, Parästhesien

und Paresen, können plötzlich oder schleichend einsetzen. Es können verschiedene Verteilungsmuster auftreten, wobei die Mononeuritis multiplex und die distale symmetrische PNP am häufigsten sind. (Ramineni, Chandra, Mahadevan, Kulkarni, & Ramanujam, 2019) Die Diagnose kann mit einer kombinierten Biopsie von Nerv und Muskel, der ebenfalls mitbefallen sein kann, gesichert werden. (Heuß, D. et al, 2019) Meist muss mit Corticosteroiden und immunsuppressiv therapiert werden. (Sommer C. et al., 2018)

1.3 Nervenleitungsstudien

Zur Differenzierung zwischen axonalen und demyelinisierenden PNP werden auch elektrophysiologische Messungen an sensiblen und motorischen Nerven durchgeführt.

Motorische Nerven werden dazu mittels einer auf der Haut platzierten Elektrode nacheinander an zwei Stellen (proximale und distale Reizung) supramaximal elektrisch stimuliert. Das Signal pflanzt sich über Nerv und motorische Endplatte fort und wird mit einer Elektrode über dem innervierten Muskel als Muskelsummenaktionspotential (MSAP), auch M-Welle genannt, abgeleitet. Die Laufzeiten zwischen distaler Stimulation und Reizantwort bezeichnet man als distale motorische Latenz (dmL). Die Nervenleitgeschwindigkeit errechnet sich dann aus dem Quotienten aus der Strecke zwischen proximalem und distalem Reizort und der Differenz der zugehörigen motorischen Latenzen. Beurteilt werden weiterhin die Größen der proximalen und distalen Amplitude (A) und deren Differenz. Bei überschwelliger Reizung des Nerven, pflanzt sich das Signal auch in entgegengesetzter Richtung, also antidrom, zum Ursprung des Axons hin fort. Dort wird es reflektiert, läuft wieder nach distal und kann dort nach der M-Welle als F (folgende) -Welle registriert werden. Mit der benötigten Zeit bis zum Eintreffen des Signals, der F-Latenz, kann der Nerv also über seine gesamte Länge beurteilt werden. Auch die als F-Persistenz bezeichnete Anzahl der auslösbaren F-Wellen in Prozent wird zur Beurteilung herangezogen. (Bischoff, Schulte-Mattler, & Conrad, 2005)

Sensible Nerven können mit einer stimulierenden und einer empfangenden Hautelektrode über Nerv bzw. Innervationsgebiet vermessen werden. Das gemessene Signal bezeichnet man als sensibles Nervenaktionspotential (SNAP) und seine Laufzeit als Latenzzeit. Ob die Leitung orthodrom oder antidrom erfolgt, spielt dabei keine Rolle. Auch die Größe der Amplitude wird registriert. (Bischoff, 2008)

Bei demyelinisierenden PNP erwartet man durch den Verlust der Myelinscheiden eine Einschränkung der schnellen saltatorischen Leitung und damit eine Verlangsamung der NLG und eine Verlängerung der dmL und der F-Latenzen mit zeitlicher Dispersion des gemessenen Signals bei fast normalen Amplituden. Die dmL, F-Latenz und NLG können aber auch durch axonale Schäden verlängert sein, nämlich wenn die Axone schnell leitender Nerven zuerst beschädigt werden.

Bei primär axonalen Schäden erwartet man aufgrund des Faserverlustes eine Reduktion der Amplituden, bei weitgehend normaler Funktion der übrigen Nervenfasern. Niedrige Amplituden können aber auch durch die vollständige Demyelinisierung von Axonen und bei distalen Leitungsblöcken entstehen.

Bei den elektrophysiologischen Messungen werden aufgrund der Technik der Ableitung nur die großen Nervenstränge erfasst und die darin enthaltenen Leitungsfähigkeiten der Nervenfasern zu einem Durchschnittswert zusammengefasst. Diese Faktoren beschränken die Aussagekraft der Nervenleitungsstudien. (Heuß, D. et al, 2019)

1.4 Mikroarchitektur der peripheren Nerven

1.4.1 Aufbau

Die Axone von bemarkten peripheren Nerven werden durch eine von Schwann-Zellen gebildete Myelinschicht umgeben. Dazu umwickelt eine Schwannzelle einen Abschnitt eines Axons. Das Zytoplasma wird verdrängt und mehrere Schichten ihrer Zellmembran isolieren das Axon elektrisch. So entsteht im Querschnitt eine spiralförmige Verbindung zwischen der Innen- und der Außenseite der Schwannzelle. Die Zugänge dazu werden als inneres und äußeres Mesaxon bezeichnet. An den Schmidt-Lantermann-Inzisuren bilden Kaliumkanäle durch alle Zellmembranschichten der Schwannzellen eine direkte Verbindung zwischen Innen- und Außenseite der Myelinschicht. Außerdem finden sich hier noch in Taschen gepresste Reste des Zytoplasmas der Schwannzellen. Eine Axon-Schwann-Zell-Einheit ist von einer Basalmembran umgeben. Zwischen den von Schwannzellen myelinisierten Axonabschnitten, befinden sich die Ranvierschen Schnürringe. Deren nur circa drei Mikrometer breite Mitte, steht mit Mikrovilli, die ihren Ursprung an der Außenseite der Schwannzellen haben, in Kontakt und wird als Nodium bezeichnet. (E. J. Arroyo &

Scherer, 2000) Hier befinden sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle, die zur saltatorischen Weiterleitung des Aktionspotentials beitragen. (Susuki, 2013) Das Nodium wird vom Paranodium und dem Juxtaparanodium flankiert und zum deutlich längeren Internodium abgegrenzt. Diese Architektur und die daran beteiligten Proteine werden im Folgenden genauer dargestellt. (E. J. Arroyo & Scherer, 2000)

1.4.2 Internodium

Diese Abschnitte der Axone zwischen den Ranvierschen Schnürringen werden von kompaktem Myelin umgeben. Entlang der Schmidt-Lanterman Inzisuren und dem inneren Mesaxon sind „delayed rectifier“ Kaliumkanäle aufgereiht. Im Gegensatz zu den paranodalen und juxtaparanodalen Axonabschnitten, besteht im Internodium keine direkte Verbindung zwischen der myelinbildenden Schwannzelle und dem Axon selbst. **MBP** (basisches Myelinprotein) als Bestandteil der Innenseite der Schwannzellmembran sorgt neben weiteren Funktionen über Adhäsionskräfte für die kompakte Struktur des Myelins. (Liu et al., 2019)

1.4.3 Juxtaparanodium

Dieser Abschnitt liegt unter dem kompakten Myelin der Schwann-Zellen und zwischen Internodium und Paranodium. Ein CAM-Komplex (Zelladhäsionsmolekül) aus Contactin-2 mit GPI (Glykosylphosphatidylinositol) -Anker und **Caspr2** sorgt hier für eine hohe Konzentration von Kv1-Kaliumkanälen die aus Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 und KVb2 Untereinheiten sowie ADAM22 (ADAM = a disintegrin and metalloproteinase), PSD-95 und PSD-93 (PSD = postsynaptisches Dichteprotein) bestehen. (Ogawa et al., 2010; Rasband, 2010, 2011). Die Kaliumkanäle in diesem Bereich sorgen wahrscheinlich für die Aufrechterhaltung des internodalen Ruhemembranpotentials. (Pinatel & Faivre-Sarrailh, 2020; Rasband, 2010)

1.4.4 Paranodium

Das Paranodium begrenzt als sogenannte paranodale Junctionszone das Nodium auf beiden Seiten. Das Myelin der Schwannzellen ist in diesem Bereich zu Schleifen aufgelockert und steht über axogliale Kontaktproteine mit dem Axolemm in Verbindung. Diese Proteine verknüpfen also Axon und Myelinschicht und verhindern zusätzlich eine Lateraldiffusion der nodalen spannungsabhängigen Natriumkanäle und sind somit für

deren Konzentration in den Schnürringen und damit die Funktionalität des Nerven mit verantwortlich. Ein CAM-Komplex aus **Neurofascin-155** (NF-155), Contactin mit GPI-Anker und dem Contactin assoziierten Protein **Caspr** stellen diese Verbindung her. (Rasband & Peles, 2016) Das paranodale Zytoskelett ist ebenfalls auf die oben genannten Aufgaben spezialisiert. Es besteht aus AnkyrinB, α II Spectrin, β II Spectrin und Protein 4.1B (Ogawa et al., 2006).

1.4.5 Nodium

Die Ranvierschen Schnürringe werden von außen durch Mikrovilli der beiden benachbarten Schwanzzellen bedeckt. Diese sind über NrCAM (neuronales Zelladhäsionsmolekül), Gliomedin und **Neurofascin-186** (NF-186) mit der Extrazellulärmatrix und den axonalen spannungsgesteuerten Natriumkanälen verbunden und tragen so zusammen mit der paranodalen Junctionszone zu deren Konzentration in den Schnürringen bei. Mit dem Zytoskelett sind die Kanäle im nodalen Bereich über AnkyrinG und β IV Spectrin verbunden. Neben den **spannungsgesteuerten Natriumkanälen**, beschrieben ist das Vorkommen von NaV 1.1, 1.2, 1.6, 1.7, 1.8 und 1.9, sind in den Schnürringen auch an AnkyrinG fixierte spannungsabhängige Kaliumkanäle KCNQ2 an der Weiterleitung der Aktionspotentiale beteiligt. (Rasband & Peles, 2016)

1.5 Axonale periphere Neuropathien

Ein gestörter Metabolismus von Neuronen des peripheren Nervensystems kann den zytoplasmatischen Transport beeinträchtigen. Dies macht sich zuerst in den peripheren Axonenden bemerkbar: Neurofilamente und Zellorganellen akkumulieren, das Axon stirbt von peripher nach zentral ab. (Wang, Medress, & Barres, 2012) Beispiele für primär axonale PNP sind:

CMT2, paraneoplastische PNP (beispielsweise bei kleinzelligem Bronchialkarzinom und Lymphomen), PNP bei Thiaminmangel, beispielsweise bei chronisch erhöhtem Alkoholkonsum, PNP bei Porphyrie, Bleivergiftungen, Thalliumvergiftungen, Amyloidose, Diabetes mellitus, Urämie, Vitamin-B12-Mangel und Sjögren-Syndrom. (Heuß, D. et al, 2019)

1.6 Demyelinisierende periphere Neuropathien

Hier ist primär die Myelinbildung durch die Schwann-Zellen beeinträchtigt, das Axon an sich ist zu Beginn nicht betroffen. Da die Myelinschicht für die schnelle saltatorische Erregung unabdingbar ist, macht sich deren Verlust durch eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit und durch Leitungsblöcke bemerkbar. Wird die Ursache der Demyelinisierung rechtzeitig erkannt und therapiert, ist eine Remyelinisierung möglich, da die Schwann-Zellen wieder neues Myelin bilden können. Ist die Demyelinisierung hingegen fortgeschritten, kommt es ebenfalls zu einem Verlust von Axonen. (Moss, Bopp, Johnson, & Höke, 2021) Beispiele für primär demyelinisierende PNP sind:

Guillain-Barré-Syndrom (GBS, AIDP), chronisch inflammatorische demyelinisierende PNP (CIDP), multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische PNP (MADSAM), multifokale motorische Neuropathien (MMN), einige hereditäre (CMT 1, 3, 4, X) PNP, paraproteinämische PNP, POEMS-Syndrom, hereditäre Neuropathien mit Druckpareisen (HNPP) und PNP bei Diphtherie. (DGN, 2012; Heuß, D. et al, 2019)

1.7 Untersuchte Nerven

1.7.1 Hautnerven

Die periphersten Nervenendigungen in der menschlichen Felder- und Leistenhaut sind die unmyelinisierten C-Fasern und die dünn myelinisierte A-delta-Fasern. Als Small Fibers bezeichnet, reichen ihre distal immer unmyelinisierten freien Endigungen vom subepidermalen Nervenplexus bis hinauf in die Dermis und Epidermis. Schmerzreize entstehen hier vermittelt durch Noxen, Hitze oder direkte Krafteinwirkung am Capsaicin-Rezeptor.

Etwas tiefer liegend, aber mit der Hautstanzbiopsie noch erreichbar, finden sich dick bemerkte A-beta-Fasern, welche die Meissner-Tastkörperchen und die Merkel-Tastscheiben im Stratum Papillare innervieren. Sie vermitteln nicht-schmerzhafte mechanische Reize, nämlich Vibration und Dehnung.

Auch die Ruffini-Körperchen und Schweißdrüsen im Stratum reticulare, die arteriovenösen Gefäßanastomosen und die tief in der Subkutis sitzenden Pacini-Körperchen, werden durch A-delta-Fasern innerviert. Sie gelangten in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hautstanzbiopsaten aufgrund der Entfernung von der

Hautoberfläche meist nicht zur Darstellung. (Karlsson, Porretta-Serapiglia, Lombardi, Jensen, & Lauria, 2013)

Aufgrund ihrer Wiederholbarkeit und geringen Invasivität werden Hautstanzbiopsien regelmäßig als diagnostisches Werkzeug angewendet. Da bei Small Fiber Neuropathien die großen Nervenbahnen nicht affektiert sind, spielen Hautbiopsien hier eine besondere Rolle. (Karlsson et al., 2013; Myers, Peltier, & Li, 2013).

Neben den unter 2.8. aufgeführten Möglichkeiten der immunhistochemischen Untersuchung von in der Hautbiopsie enthaltenen Nervenfasern, kann mit dieser Methode über den Nachweis von paravaskulären Infiltraten auch eine Vaskulitis diagnostiziert werden. (Carlson & Chen, 2006)

1.7.2 Nervus suralis

Der Nervus suralis entsteht meist subfaszial dorsal im distalen Drittel des Unterschenkels zwischen den Köpfen des Musculus gastrocnemius aus dem Nervus cutaneus surae medialis (Ast des Nervus tibialis) und einem Ast des N. cutaneus surae lateralis (Ast des Nervus peroneus). Er verläuft begleitet von der Vena saphena parva am lateralen Rand der Achillessehne nach distal, umrundet den Außenknöchel dorsalseitig und zieht dann am Außenrand des Fußes bis zur Basis der fünften Zehe nach vorne. Der rein sensible Nerv besteht aus 9 bis 14 Faszikeln, die sich aus dick myelinisierten A-beta-Fasern, dünn myelinisierten A-delta Fasern und nicht myelinisierten C-Fasern zusammensetzen. Das Innervationsgebiet des Nervus suralis ist der laterale Fußrand. (Garrett & Geiger, 2020; Im, Lee, Yeon, Lee, & Chung, 2020; Koop & Tadi, 2020) Bei guter operativer Erreichbarkeit und rein sensibler Funktion, sowie der Möglichkeit der Durchführung einer Haut-, Muskel- und Nervenbiopsie im selben Eingriff, stellt der Nervus suralis einen bevorzugten Biopsie-Nerven dar. Seine Kontinuität wird durch den Eingriff unterbrochen. Somit wird eine solche Biopsie vor allem bei rasch progredienten und trotz intensiver Umfelddiagnostik ätiologisch unklaren Polyneuropathien indiziert, insbesondere bei den medikamentös behandelbaren entzündlichen Neuropathien. Dies kann unter anderem bei V. a. eine Vaskulitis oder isolierte vaskulitische PNP, Sarkoidose, oder Speicherkrankheit der Fall sein. Bei selektivem Befall von anderen, z.B. auch von motorischen Nerven, können auch sonographisch gesteuerte Faszikelbiopsien zum Einsatz kommen. Die Biopsien werden mikroskopisch mit verschiedenen histologischen Färbungen von Gefrier-, Paraffin- und Kunstharzchnitten, elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch,

auch zum Nachweis von Makrophagen und T-Zellen, untersucht. Zudem kommen Zupfnervenpräparate zum Nachweis einer segmentalen Demyelinisierung zum Einsatz. (Heuß, D. et al, 2019)

1.8 Methoden zur Untersuchung von Hautnerven

Unmyelinisierte und teils auch myelinisierte dermale Nervenfasern können durch Hautbiopsien auch mehrfach im Krankheitsverlauf einfach und risikoarm zur Untersuchung gewonnen werden.

Die Untersuchung unmyelinisierter Nervenfasern der Haut (Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte und -länge bei vielen Small-Fiber-Neuropathien) ist bereits in der aktuellen Leitlinie zur Diagnostik bei Polyneuropathien (Heuß, D. et al, 2019) vorgesehen. Die Darstellung der Nervenfasern erfolgt immunhistochemisch mit PGP9.5 (protein gene product) -Antikörpern. (Heuß, D. et al, 2019; Lauria et al., 2010)

Durch Auflicht- und Elektronenmikroskopie von Hautschnitten gelang bei einem Kleinkind mit HMSN Typ III bereits der Nachweis von typischen Zeichen der Demyelinisierung, wie z.B. von hypomyelinisierten Axonen und sogenannten Zwiebelschalenformationen, welche zuvor eher aus pathologischen Nervus suralis Biopsien bekannt waren. (Ceuterick-de Groote et al., 2001) Aufgrund dieser Erkenntnis wurde bereits postuliert, dass Hautbiopsien stellenweise die deutlich invasiveren Nervus suralis Biopsien ersetzen könnten. (Li et al., 2005)

Von besonderem Interesse sind neben der Detektion von Veränderungen im Bereich des myelinisierten Internodiums, insbesondere auch Aufbau und Veränderungen im Bereich der Ranvierschen Schnürringe. Immunhistochemische Färbungen von am nodalen und paranodalen Komplex beteiligten Proteinen, zum Beispiel von MBP (Internodium), Caspr2 (Juxtapanodium), Kv1- und Kvbeta2-Kanälen (Juxtapanodium), Caspr1 (Paranodium), NF155 (Paranodium), NF186 (Nodium), NaV-Kanälen (Nodium) und KCNQ2-Kanälen (Nodium), haben sich hier etabliert.

In einer Vorarbeit, in der Oberschenkelhautbiopsien von Patienten mit demyelinisierenden, axonalen und Small Fiber Neuropathien untersucht wurden, konnte eine Verlängerung der Schnürringe im Sinne eines Zurückweichens von MBP vom Nodium, bei demyelinisierenden und Small Fiber Neuropathien, nicht aber bei Patienten mit axonalen Neuropathien gezeigt werden. (Doppler, Werner, Henneges, & Sommer, 2012) In einer Folgestudie fanden sich Veränderungen der paranodalen

Proteine Caspr und Neurofascin-155, sowie erneut eine Verlängerung der Schnürringe in der MBP-Färbung deutlich häufiger in der Patientengruppe mit demyelinisierenden, als in der Patientengruppe mit axonalen Polyneuropathien. (Doppler, Werner, & Sommer, 2013)

Anders als oben genannte Verfahren, welche die direkte Untersuchung des Aufbaus der Hautnervenfasern verfolgen, dient beispielsweise die Bestimmung des Expressionsniveaus bestimmter mikroRNAs (RNA = ribonucleic acid) und derer Zielmoleküle in Hautbiopsien, der Klärung pathophysiologischer Abläufe und der Identifikation von diagnostischen Biomarkern. (Bremer et al., 2010)

1.9 Hypothese dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von Schnürringveränderungen an Hautnervenfasern mit dem Vorliegen von elektrophysiologischen Merkmalen der Demyelinisierung zu vergleichen. Hierzu wurden die selbst erhobenen Befunde der Hautstanzbiopsien, elektrophysiologische und klinische Daten, sowie vorliegende Nervus suralis Biopsien ausgewertet.

Die untersuchten Haupt- und Nebenhypothesen können folgendermaßen zusammengefasst werden:

Auffällige Verteilungsmuster von Caspr, Natriumkanälen, Neurofascin, oder MBP an Schnürringen von Hautnerven...

... sind assoziiert mit elektrophysiologischen Merkmalen der peripheren Demyelinisierung.

... kommen in gleicher Ausprägung in Hautnerven und im Nervus suralis vor.

... kommen nicht bei gesunden Kontrollpersonen vor.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Das positive Ethikvotum liegt vor und kann unter Aktenzeichen 277/13 eingesehen werden.

2.2 Fallzahlplanung

Die Fallzahlplanung erfolgte durch Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler. Berücksichtigt wurden Vorläuferstudien und die multiple lineare Regression als statistisches Verfahren. So ergab sich für R^2 ein Wert von 0,117 und eine Effektgröße f^2 von 0,13. Mit 11 Prädiktoren ergab sich eine Fallzahl von 101, um ein Signifikanzniveau von 5 % und eine Power von 95 % zu erreichen. Die auf 10 % geschätzten Ausfallrate, führte dann zu einer Fallzahl von 110 Patienten. Da im Verlauf der tatsächlichen statistischen Auswertung dieser Arbeit, meist zwei Gruppen (Patienten mit Schnürringveränderungen versus Patienten ohne Schnürringveränderungen) miteinander verglichen wurden, fanden anstelle von multipler linearer Regression, Mittelwertsvergleiche mittels t-Test Verwendung.

2.3 Patientengruppe

Von Oktober 2013 bis Februar 2015 wurden prospektiv Patienten mit PNP rekrutiert. Die meisten von ihnen stellten sich erstmalig zur Abklärung des Verdachts auf eine Polyneuropathie in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg vor. In die Studie aufgenommen wurden nur diejenigen Patienten, bei denen sich dieser Verdacht auch bestätigt hatte. Zusätzlich wurden Patienten mit seltenen PNP-Formen rekrutiert, die sich regelmäßig zur Behandlung in der Klinik vorstellten.

Ausschlusskriterien waren orale Antikoagulation, Allergien gegen Lokalanästhetika und bekannte Wundheilungsstörungen.

Alle Patienten hatten sich nach ausführlicher Aufklärung und Aushändigung von schriftlichem Informationsmaterial, mündlich und schriftlich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden erklärt.

Die Patientengruppe umfasste 93 Personen, 51 Männer (54,8 %) und 43 Frauen (45,2 %), das durchschnittliche Alter betrug 62 Jahre (30 - 83 Jahre). Bei allen Patienten wurden durch das Elektrophysiologie-Labor der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg im Rahmen der Diagnosesicherung symptombezogene elektrophysiologische Messungen verschiedener peripherer Nerven durchgeführt.

Die endgültigen Diagnosen der Betroffenen, wurden den Arztbriefen entnommen.

2.4 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe von 25 Personen umfasste 17 Männer (68 %) und 8 Frauen (32 %) mit einem durchschnittlichen Alter von 56 Jahren (18 - 71 Jahre). Ausschlusskriterien für Kontrollprobanden waren anamnestische oder klinische Anzeichen einer Polyneuropathie, sowie Erkrankungen, die häufig mit einer Polyneuropathie einhergehen, wie Diabetes mellitus, hoher Alkoholkonsum oder Z. n. Chemotherapie. Alle Kontrollpersonen willigten nach ausführlicher Aufklärung und Aushändigung von Informationsmaterial schriftlich und mündlich in die Teilnahme an der Studie ein. Ihnen wurde radialeseitig eine Hautbiopsie vom Zeigefinger der nicht dominanten Hand entnommen.

2.5 Materialgewinnung für Hautbiopsien und Zupfnerven

2.5.1 Entnahme der Hautbiopsien

Bei allen Patienten erfolgte die Biopsieentnahme nach dem Ausschluss von Kontraindikationen am Grundglied des Zeigefingers der stärker betroffenen Seite radialeseitig im Bereich der Leistenhaut. Waren beide Seiten gleich stark betroffen, wurde der Zeigefinger der nicht-dominanten Hand zur Biopsie gewählt. Nach Aufklärung und schriftlicher Dokumentation der Zustimmung, erfolgte eine großzügige viermalige Wischdesinfektion und anschließende Sprühdesinfektion der Haut mit Cutasept® F (Inhaltsstoffe: Propan-2-ol, Benzalkoniumchlorid, gereinigtes Wasser) unter Beachtung der Einwirkzeit von zwei Minuten. Anschließend wurde die Biopsiestelle zur Lokalanästhesie subkutan mit circa einem Milliliter Mepivacainhydrochlorid 1 % (Scandicain® 1 %, Fa. Aspen, Bad Oldesloe, Deutschland) infiltriert. Nach Prüfung der regelrechten Analgesie mit einer Pinzette

wurde eine drei Millimeter durchmessende runde Einweg-Stanze (Fa. Stiefel) circa fünf Millimeter tief in das Gewebe gedrückt. Die Gewebeprobe wurde mit einer Pinzette, nötigenfalls unter Zuhilfenahme eines Skalpells, entfernt und auf einem Brettchen abgelegt. Nach der circa fünf Minuten dauernden Blutstillung durch Kompression und der Wundversorgung mit mehreren Klammerpflastern und einem Verbandpflaster, wurden die Proben zur Fixation für eine halbe Stunde in ein vorbereitetes Gefäß mit vierprozentiger PFA-Lösung (Paraformaldehydlösung zur Gewebefixierung durch Proteinvernetzung) gegeben. Die PFA-Lösung wurde anschließend abpipettiert und ausgewaschen, indem dreimal für jeweils zehn Minuten frischer 0,1 M Phosphatpuffer (M = molar = mol/l) hinzugegeben und wieder verworfen wurde. Bis zur Kryokonservierung durch Mitarbeiterinnen des Neurohistologie Labors wurden die Proben in eine dehydrierende Saccharose-Lösung gegeben und bei drei bis acht Grad Celsius gelagert. Zusätzlich wurden zu diagnostischen Zwecken in identischer Vorgehensweise fünf Millimeter durchmessende Hautbiospien vom distalen Ober- und Unterschenkel des stärker betroffenen Beines entnommen und prozessiert. Da diese regelmäßig keine beurteilbaren Schnürringe aufwiesen, wurden sie nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

2.5.2 Erstellung der Gefrierschnitte durch Mitarbeiterinnen des Neurohistologie Labors

Zunächst wurden die Hautbiospien im Einbettmedium Tissue Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und dann in einem Behältnis mit einer gewebeschonenden 2-Methylbutanatmosphäre für eine halbe Minute in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach zehnmütiger Aufbewahrung bei -20 °C, erfolgte eine unterschiedlich lange Phase der Lagerung bei -80 °C, bis die 50 µm dicken Gefrierschnitte mit einem Cryostat (LEICA CM3050 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt wurden. Neun Schnitte von jeder Probe wurden auf drei Super Frost beschichtete Objektträger (R. Langenbrick GmbH, Emmendingen, Deutschland) verteilt, für eine halbe Stunde luftgetrocknet und dann bis zur Färbung bei -20 °C eingefroren.

2.5.3 Entnahme und Vorbereitung des Nervus suralis

Bei 35 Patienten (37,6 %) mit ätiologisch unklaren und schweren neuropathischen Symptomen, wurde in einer offenen Biopsie einige Zentimeter des Nervus suralis der

am schwersten betroffenen Seite zur weiteren Diagnostik entnommen. Die Indikationsstellung erfolgte durch die behandelnden Neurologen, die Biopsieentnahme erfolgte konsiliarisch durch die Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Würzburg. Alle Patienten stimmten der Verwendung von Geweberesten für die Forschung schriftlich zu. Der Nervus suralis ist operativ gut zu erreichen und hinterlässt nach der Biopsie keine motorischen Ausfälle (Luigetti et al., 2020). Semidünnschnitte aus einem Anteil des biopsierten Nerven, wurden durch Ärztinnen und Ärzte der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg zum Zweck der Diagnosefindung ausgewertet. Histopathologisch erfolgte hier die Einteilung in überwiegend axonale, überwiegend demyelinisierende und gemischt axonale und demyelinisierende Schädigungsmuster. Die so erhobenen Befunde, wurden in die weitere Auswertung mit einbezogen.

Ein weiterer Anteil des biopsierten Nerven, konnte im Rahmen dieser Arbeit verarbeitet werden. Dieses etwa 0,5 - 1 cm langes Stück Nerv, wurde unmittelbar nach der Entnahme auf einer mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchteten Kompresse übergeben und anschließend für eine halbe Stunde in PFA fixiert. Die PFA-Lösung wurde anschließend verworfen und durch dreimaliges Aufpipettieren, zehnmütiges Einwirken und anschließendes Verwerfen von frischem 0,1 molarem Phosphatpuffer ausgewaschen. Anschließend wurden sofort die Zupfnervenpräparate angefertigt. Diese wurden im Verlauf analog zu den Fingerhautbiopsien immunhistochemisch gefärbt, um ebenfalls MBP, Caspr, NF und Na beurteilen zu können.

2.5.4 Anfertigung der Zupfnerven

Die Zupfnervenpräparate wurden am Auflichtmikroskop (Stemi 2000, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) bei circa eineinhalbfacher Vergrößerung angefertigt. Hierfür wurde der Nerv auf einen Objektträger gelegt und kontinuierlich mit 0,05 molarem Phosphatpuffer feucht gehalten. Das Bindegewebe wurde mit zwei spitzen Pinzetten entfernt, und der Nerv dabei in seine Faszikel aufgeteilt. Jeder Faszikel lieferte beim Auseinanderziehen mit den Pinzetten genug Axone um ein bis zwei Objektträger zu füllen. Bei dieser Methode kommen die Axone gestreckt auf dem Objektträger zu liegen und können demnach auf einer Länge von circa zwei Zentimetern beurteilt werden. Ein Nerv ergab so ca. 20 Objektträger mit Zupfnerven. Beim Zupfen der Nerven waren von Nerv zu Nerv deutliche Unterschiede bezüglich der

Anteile von Nervengewebe und Bindegewebe zu sehen. Die fertigen Objektträger trockneten bei Raumtemperatur und wurden bis zur Färbung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6 Durchführung der Doppelfärbungen

In Hautschnitten und Zupfnervenpräparaten wurden mittels Immunhistochemie vier Proteine (MBP, Caspr, NF, Pan-Na-Kanal) angefärbt. Alle Färbungen wurden als Doppelfärbungen ausgeführt. Auf allen Objektträgern mit Hautschnitten bzw. Zupfnerven eines Patienten, wurde MBP als Marker für die Myelinscheiden angefärbt. Zusätzlich wurde pro Patient auf jeweils einem Objektträger mit Hautschnitten bzw. Zupfnerven, jeweils eines der nodalen beziehungsweise paranodalen Proteine (Caspr, NF, oder pan-Na-Kanal) angefärbt. So entstanden für jede Person Objektträger mit folgenden Immunfluoreszenzdoppelfärbungen: Anti-MBP/anti-Caspr, anti-MBP/anti-Pan-Natriumkanal und mit anti-MBP/anti-Pan-Neurofascin. Die verwendeten Antikörper sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

2.6.1 Färbung der Hautschnitte

Vor der Färbung tauten die Objektträger bis zum völligen Abtrocknen des Kondenswassers bei Raumtemperatur auf. Dann wurden sie mit Biopsienummer und Art der Färbung beschriftet und in einer Feuchtwanne ausgelegt. Die zu färbenden Hautschnitte wurden mit einem hydrophoben PAP-Pen (PAP = Peroxidase-Antiperoxidase, siehe Tabelle 4) umrandet, um ein seitliches Auslaufen von Färbemedium zu verhindern und anschließend zum Waschen mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, siehe Tabelle 3) bedeckt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Hautschnitte anschließend für eine halbe Stunde mit in PBS verdünntem BSA (bovinem Serumalbumin, siehe Tabelle 4) bei Raumtemperatur in der Feuchtwanne inkubiert.

Nach dem Abklopfen der oben genannten Lösung von den Objektträgern, wurde eine Trägerlösung mit beiden **Erstantikörpern** der entsprechenden Doppelfärbung aufgetragen. Dann wurden diese über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Feuchtwanne inkubiert und anschließend dreimal in einer Glaswanne mit PBS gewaschen. Die Trägerlösung für die gegen die zu untersuchenden Proteine gerichteten Erstantikörper, bestand zu 98,7 % aus PBS, zu 1 % aus BSA und zu 0,3 % aus Triton X-100 (Fa. Sigma, Nr.: X100, siehe Tabelle 4), einem Detergens zur Erhöhung der Zellpermeabilität.

Anschließend wurden die Hautschnitte für zwei Stunden mit den gegen die Erstantikörper gerichteten, **fluoreszierenden Zweitantikörpern**, die ebenfalls in einer Trägerlösung verdünnt wurden, inkubiert. Diese Trägerlösung wurde mit 99 % PBS und 1 % FBS (fetales Rinderserum) angesetzt. Dabei reichte ein Milliliter des Gemisches aus Trägerlösung und Antikörpern für circa 10 Objektträger.

Zum Schutz vor schnellem Ausbleichen wurden die Schnitte nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS, mit einem Tropfen VectaShield (Fa. Vector, H-1200, siehe Tabelle 4) mit DAPI (=4',6-Diamidino-2-phenylindol, einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff, siehe Tabelle 4) benetzt und mit passenden Deckgläsern eingedeckt. Nach dem Ausstreichen von Luftblasen wurde der schmale Spalt zwischen Deckglas und Objektträger mit CoverGrip (Fa. Biotium, Cat.: 23005, siehe Tabelle 4) versiegelt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20 °C in lichtundurchlässigen Mappen.

2.6.2 Färbung der Zupfnerven

Die Objektträger wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, beschriftet, bei -20 °C für zehn Minuten in Aceton fixiert und für etwas weniger als zwei Minuten auf einer Heizplatte getrocknet. Die Axone in der Mitte des Objektträgers wurden mit einem PAP-Pen umrandet, zum Waschen wurde für zehn Minuten PBS aufpipettiert. Die Präparate wurden dann für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur mit einem Ansatz, bestehend aus 4 % NGS (normales Ziegenserum, Fa. Agilent DAKO, Santa Clara, USA, siehe Tabelle 4), 4 % FCS (fetales Kälberserum, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, siehe Tabelle 4) und 0,3 % Triton in 0,1 M PBS, blockiert. Die Blockierlösung wurde abgeklopft und die Präparate anschließend über Nacht mit den in Blockierlösung gelösten **Primärantikörpern** bei -20 °C inkubiert. Die Schnitte wurden am nächsten Tag dreimal in einer Wanne mit 0,1 M PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den ebenfalls in Blockierlösung gelösten **Sekundärantikörpern** inkubiert. Das Eindecken erfolgte analog zum Vorgehen bei den Hautschnitten. Nach dem Eindecken wurden die Objektträger in dunklen Mappen bei -20 °C bis zur Auswertung gelagert.

Die für Haut- und Nervus suralis Biopsien verwendeten Primärantikörper (**Tabelle 1**), Sekundärantikörper (**Tabelle 2**), angesetzten Lösungen (**Tabelle 3**) und weiteren Hilfsmittel (**Tabelle 4**), sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 1: Primärantikörper und ihre Verdünnung		
Ziel	Antikörper, Hersteller, Katalognummer	Verdünnung
MBP (in den Doppelfärbungen mit Caspr und NF)	Monoklonaler MBP Antikörper aus Mäusen, GeneTex, Irvine, USA, GTX1159	Hautschnitte 1:200 Zupfnerven: 1:500
MBP (in der Doppelfärbung mit Natriumkanälen)	Polyklonaler MBP Antikörper aus Kaninchen, Merck Millipore, Burlington, USA, ab980	Hautschnitte: 1:1000 Zupfnerven: 1:1000
Natriumkanäle	Monoklonaler gereinigter Pan-Natriumkanal Antikörper aus Mäusen, Sigma, Saint Louis, USA, S8809	Hautschnitte: 1:100 Zupfnerven: 1:100
Caspr	Polyklonaler Caspr Antikörper aus Kaninchen, Fa. Abcam, Cambridge, Großbritannien, ab34151	Hautschnitte: 1:1000 Zupfnerven: 1:1000
NF	Polyklonaler Neurofascin Antikörper aus Kaninchen, Fa. Abcam, Cambridge, Großbritannien, ab31457	Hautschnitte: 1:400 Zupfnerven: 1:50

Tabelle 2: Sekundärantikörper und ihre Verdünnung		
Ziel	Antikörper, Hersteller	Verdünnung
MBP Antikörper (ab980)	Anti-Kaninchen Cy3, rot fluoreszierend, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	Hautschnitte: 1:100 Zupfnerven: 1:100
Natriumkanal Antikörper (S8809)	Anti-Maus Alexa Fluor488, grün fluoreszierend, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	Hautschnitte: 1:400 Zupfnerven: 1:400
MBP Antikörper (GTX1159)	Anti-Maus Cy3, rot fluoreszierend, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	Hautschnitte: 1:100 Zupfnerven: 1:400
NF Antikörper (ab34151 und ab31457)	Anti-Kaninchen Alexa Fluor488, grün fluoreszierend, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	Hautschnitte: 1:100 Zupfnerven: 1:400

Tabelle 3: Angesetzte Lösungen	
Name, Zweck	Zusammensetzung, Herstellung
Blockierlösung Gefrierschnitte	90 % PBS, 10 % BSA
Trägerlösung Erstantikörper Haut	98,7 % PBS, 1 % BSA, 0,3 % Triton X-100
Trägerlösung Zweitantikörper Haut	99 % PBS, 1 % fetales Rinderserum
Blockierlösung und Trägerlösung für Antikörper bei Zupfnerven	91,7 % 0,1 M PBS, 4 % NGS, 4 % FCS, 0,3 % Triton X-100
Stammlösung A (Herstellung durch Histologielabor)	35,6 g Di-Natriumhydrogenphosphat + 1 Liter destilliertes Wasser
Stammlösung B (Herstellung durch Histologielabor)	31,2 g Di-Natriumhydrogenphosphat + 1 Liter destilliertes Wasser
PFA 4 % (Herstellung durch Histologielabor)	4 g PFA 95 % + 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer
0,1 M PBS zum Waschen	800 ml Stammlösung A + etwa 160 ml Stammlösung B bis pH 7,4, dann + 60 ml 5 M Natriumchlorid-Lösung + destilliertes Wasser bis zur Gesamtmenge von zwei Litern
0,05 M Phosphatpuffer Befeuchtung Zupfnerven	0,1 M Phosphatpuffer + destilliertes Wasser zu gleichen Teilen
0,1 M Phosphatpuffer (Herstellung durch Histologielabor)	405 ml 0,2 M Stammlösung A + etwa 95 ml Stammlösung B bis pH 7,4, dann destilliertes Wasser bis zur Gesamtmenge von einem Liter
5 M Natriumchlorid-Lösung (Herstellung durch Histologielabor)	146,1 g Natriumchlorid + 0,5 Liter destillierte Wasser
Saccharose-Lösung 10 % Dehydrierung der Hautbiopsien vor dem Einfrieren (Herstellung durch Histologielabor)	90 g 0,1 M Phosphatpuffer + 10 g Saccharose

Tabelle 4: Weitere industriell bezogenen Produkte	
Name	Zweck, Hersteller, Serien- /Bestellnummer
Aceton Lösung 2000 µg/ml	Fixierung der Zupfnerven, Fa. Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland, 48358
Triton-X100	Erhöhung der Zell-Permeabilität für Immunhistochemie, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Nr.: X100
FCS	Verhinderung unspezifischer Bindung der Antikörper, Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Nr.: F7524
FBS	Verhinderung unspezifischer Bindung der Antikörper, Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland, (Ab 1.1.2020 Merck-Group, Darmstadt, Deutschland), Fetal Bovine Serum Cat.-No.: S0115
NGS	Verhinderung unspezifischer Bindung der Antikörper, Fa. Agilent DAKO, Santa Clara, USA, Nr.: X0907
Vectashield mit DAPI	Schutz vor Ausbleichung der Fluoreszenz und zur fluoreszierenden Anfärbung der DNA der Zellkerne, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA, H-1200
PAP-Pen	Stift zum Auftragen einer hydrophoben Barriere um die Schnitte auf einem Objektträger, damit Färbemittel eingespart werden kann, Fa. Merck KgaA, Darmstadt, Z377821
PFA 95 %	Gewebefixierung durch Proteinvernetzung, Fa. Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland, 30525-89-4
CoverGrip Coverslip Sealant	Versiegelung von Deckglas mit Objektträger, Fa. Biotium Inc., Fremont, USA, 23005
Di-Natriumhydrogenphosphat	Zur Herstellung von Stammlösung A + B, Fa. Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland, 10028-24-7
Saccharose	Zur Herstellung der Saccharose-Lösung, Fa. Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland, DE 57-50-1

2.7 Auswertung

Die Auswertung der Zupfnervenpräparate erfolgte weitgehend analog zur Auswertung der Hautbiopsien. Aufgrund der großen Anzahl an Schnürringen war bei den Zupfnerven jedoch ein genaues Auszählen nicht praktikabel. Unterschieden wurden hier Objektträger mit mehr oder weniger als einhundert beurteilbaren Schnürringen.

Die fertig gefärbten Objektträger mit jeweils ein bis drei Hautschnitten oder Zupfnerven, wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit CARV-II-System und Fluoreszenz-Kamera (Carl Zeiss Microimaging Group, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) bei vierzigfacher Vergrößerung ausgewertet.

Schnürringe wurden als Unterbrechung des Nervenfaserverlaufes anhand der Färbung mit Anti-MBP identifiziert und nur dann als Schnürring gewertet, wenn innerhalb dieser Unterbrechung Caspr, Neurofascin oder Natriumkanäle lokalisiert waren. Potenziell auffällige Schnürringe wurden fotografiert. Das Bild wurde mit einer Software (VisiView Version 2.1.1, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) mit dem korrekten Maßstab versehen, gespeichert und am Bildschirm nochmal bewertet.

Schnürringe bei denen die Schnürringlänge in der MBP-Färbung größer als die Breite der entsprechenden Faser erschien, wurden mit oben genannter Software vermessen. Ein Schnürring wurde bei einer Länge von $> 7,5 \mu\text{m}$ (\cong Normalwert + zwei Standardabweichungen) als verlängert bewertet.

Wenn Caspr oder NF nicht klar auf das Paranodium begrenzt, sondern auch im angrenzenden Internodium nachweisbar waren, wurde dies als Dispersion beschrieben.

Die dargestellten Natriumkanäle wurden als normal bewertet, wenn sie als schmale Bande im Zentrum des Nodiums konzentriert waren. War diese Bande doppelt, also an jedem Ende des Schnürrings angelegt, oder deutlich verlängert, wurde dies als Veränderung beschrieben.

Die gespeicherten Fotos von Schnürringen mit möglichen Auffälligkeiten in den Färbungen MBP, Caspr, NF und Na, wurden zusammen mit Priv.-Doz. Dr. med. K. Doppler (Neurologische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg) endgültig beurteilt. Nur Schnürringe, die von beiden Untersuchern als auffällig klassifiziert wurden, wurden endgültig als verändert eingestuft.

Alle beurteilbaren Schnürringe wurden somit wie folgt kategorisiert:

- Caspr-Färbung: „normal“ oder „dispers“
- NF-Färbung: „normal“ oder „dispers“
- Pan-Na-Kanal-Färbung: „normal“ oder „verlängert“ oder „doppelt“
- MBP-Färbung: „normal“ oder „verlängert“

Für jede Biopsie und für jede Färbung, wurde die Anzahl der veränderten Schnürringe und die Anzahl der nicht veränderten Schnürringe dokumentiert. Die Längen aller vermessenen Schnürringe wurden dokumentiert.

Die durchschnittliche normale Schnürringlänge wurde analog zum oben beschriebenen Vorgehen, anhand von 200 Schnürringen von Kontrollpersonen ermittelt.

2.8 Elektrophysiologische Untersuchung

Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten im Rahmen des diagnostischen Prozesses durch das Elektroneurographie Labor der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg. Falls bei einem Patienten ein Nerv auf beiden Körperseiten gemessen wurde, wurde für die Auswertung die Messung mit den niedrigeren Werten für Amplitude bzw. Nervenleitgeschwindigkeit verwendet. Falls ein Nerv keine Reizantwort zeigte, wurden die Ergebnisse der noch messbaren Seite verwendet. Die am häufigsten untersuchten Nerven waren der Nervus tibialis (motorisch), der Nervus medianus (motorisch und sensibel) und der Nervus suralis (sensibel), so dass die Messergebnisse dieser drei Nerven in die Auswertung aufgenommen wurden.

2.8.1 Nervus tibialis motorisch

Der Nervus tibialis wurde in der Kniekehle und hinter dem Innenknöchel stimuliert. Die Ableitung des motorischen Summenaktionspotentials erfolgte über dem Musculus abductor hallucis longus. In die Auswertung aufgenommen wurden die Amplituden bei proximaler und distaler Stimulation, die Nervenleitgeschwindigkeit, die distale motorische Latenz, die F-Persistenz und die F-Latenz.

2.8.2 Nervus medianus motorisch

Der Nervus medianus wurde in der Ellenbeuge und am Handgelenk stimuliert. Die Ableitung des motorischen Summenaktionspotenzials mit Oberflächenelektroden erfolgte vom M. abductor pollicis brevis. In die Auswertung aufgenommen wurden die Amplituden bei proximaler und distaler Stimulation, die Nervenleitgeschwindigkeit, die distale motorische Latenz, die F-Persistenz und die F-Latenz.

2.8.3 Nervus medianus sensibel

Der Nervus medianus wurde am Handgelenk stimuliert. Das sensible Nervenaktionspotenzial wurde mit Ringelektroden vom Mittelfinger abgeleitet. In die Auswertung aufgenommen wurden Amplitude und Nervenleitgeschwindigkeit.

2.8.4 Nervus suralis sensibel

Der Nervus suralis wurde in der Wadenmitte stimuliert. Die Ableitung des antidromen sensiblen Nervenaktionspotenzials erfolgte hinter dem Außenknöchel. In die Auswertung aufgenommen wurden Amplitude und Nervenleitgeschwindigkeit.

2.9 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden in einer Microsoft-Excel-Tabelle (Microsoft Corporation, Redmond, USA) dokumentiert. Die statistischen Analysen mit SPSS Statistics (IBM Software, Armonk, USA), erfolgten unter statistischer Beratung (Dr. rer. biol. hum. Cornelia Fießler, Lehrstuhl für klinische Epidemiologie und Biometrie, Universität Würzburg) durch den Ersteller dieser Arbeit. Als statistische Instrumente wurden zum Vergleich von dichotomen Merkmalen der exakte Test nach Fisher und zum Mittelwertvergleich der t-Test eingesetzt. Die notwendige Stichprobengröße ($n > 10$) für die Auswertung von nicht zuverlässig normalverteilten Daten mittels t-Test, wurde bei jeder Messung übertroffen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Patientengruppe

Die inkludierten Patienten (n = 93) befanden sich im Zeitraum zwischen Oktober 2013 Februar 2015 in ambulanter oder stationärer neurologischer Behandlung der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg.

Die Männer (n = 50, 53,8 %) waren durchschnittlich 62 Jahre (30 - 80 Jahre) alt, die Frauen (n = 43, 46,2 %) waren durchschnittlich 60,9 Jahre (30 - 83 Jahre) alt.

Insgesamt 29 Patienten (31,2 %) waren an ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien erkrankt: CIDP (7), GBS (2), MMN (8), MADSAM (6), HNPP (2), CMT1A (1), paraproteinämische PNP (3).

Insgesamt 64 (68,8 %) Patienten waren an ätiologisch axonalen oder anderen Polyneuropathien erkrankt: SFN (13), diabetische PNP (3), vaskulitische PNP (4), idiopathische PNP (32), andere (12).

3.2 Beschreibung der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 25 Personen mit 17 Männern (68 %) und 8 Frauen (32 %) mit einem durchschnittlichen Alter von 56 Jahren (18 - 71 Jahre) und ohne Symptome einer Polyneuropathie. Bei 23 gesunden Probanden gab es keine bekannten Nebendiagnosen, welche mit dem Auftreten von Polyneuropathien assoziiert sind. Ein Proband wurde wegen erektiler Dysfunktion unbekannter Ursache behandelt, bei einem weiteren Probanden lagen keine Daten zu den Nebendiagnosen vor. Von allen Kontrollpersonen wurde wie geplant eine Hautbiopsie vom radialeseitigen Zeigefinger der nicht dominanten Hand entnommen. Die erstellten Kryoschnitte wurden genau wie in der Patientengruppe verarbeitet und konnten ohne Verluste ausgewertet werden. Nervenbiopsien wurden nicht durchgeführt. Bei 10 von 25 Kontrollpersonen wurden elektrophysiologische Messungen (11 x N. tibialis motorisch, 10 x N. suralis sensibel, 8 x N. medianus motorisch, 6 x N. medianus sensibel, 5 x N. ulnaris sensibel, 4 x N. ulnaris motorisch, 2 x N. axillaris sensibel, 1 x N. peroneus motorisch) durchgeführt und zeigten jeweils eine normale Nervenleitung.

3.3 Fingerhautbiopsien

3.3.1 Durchschnittliche normale Schnürringlänge in Fingerhautbiopsien

Bei 200 Schnürringen aus Fingerhautbiopsien von Kontrollpersonen wurde deren durchschnittliche Länge in der MBP-Färbung gemessen. Das Ergebnis entsprach mit $4,26 \mu\text{m}$ ($\text{SD} = 1,6 \mu\text{m}$) den Werten früherer Studien (Doppler et al., J Neurol, 2012: $4,3 \mu\text{m}$, $\text{SD} = 0,9 \mu\text{m}$). Schnürringe über $7,5 \mu\text{m}$ (entspricht dem Durchschnittswert plus zwei Standardabweichungen) wurden demnach als verlängert gewertet.

3.3.2 Qualität und Beurteilbarkeit der Doppelfärbungen der Fingerhautbiopsien und Verteilung der beobachteten Schnürringveränderungen in den PNP-Subgruppen

Bei allen Patienten wurden Hautbiopsien vom Finger entnommen, drei Hautschnitte pro Objektträger wurden pro Doppelfärbung mit Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert. Abgesehen von wenigen beim Prozessieren verloren gegangenen Hautstücken, konnten auf den erhalten gebliebenen Hautschnitten trotz regelrechter Doppelfärbung die Zielstrukturen aufgrund geringer Faserdichte teilweise nicht dargestellt werden.

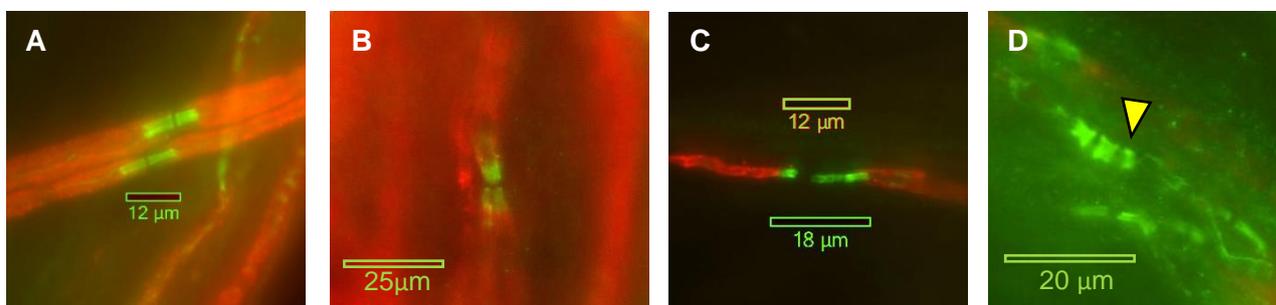
3.3.2.1 Caspr/MBP-Doppelfärbung

Nach dem Inkubations-Prozess verblieb in der Caspr/MBP-Doppelfärbung kein Patient ohne Hautschnitt auf dem Objektträger. Bei neun Patienten (idiopathisch: 4, CMT1A: 1, CIDP: 1, diabetisch: 1, Schwerpunkt-Neuropathie N. ischiadicus: 1) war Caspr auf den regelrecht gefärbten übrigen Hautschnitten nicht beurteilbar. Insgesamt hatten 84 Patienten (90,3 %) in dieser Färbung beurteilbare Schnürringe. Ein Hautschnitt enthielt durchschnittlich acht beurteilbare Schnürringe in der Caspr-Färbung. Unterschieden wurden normale Schnürringe mit streng auf das Paranodium begrenzter Darstellung von Caspr (Abbildungen 1A, 1B, 1D), von Schnürringen mit Dispersion von Caspr im Sinne einer Anfärbung bis in das angrenzende Internodium (Abbildung 1C). Insgesamt 35 Patienten (41,7 % der Patienten mit in dieser Färbung beurteilbaren Schnürringen) zeigten eine Dispersion von Caspr. Von allen in den Caspr-Färbungen der Patientengruppe gefundenen Schnürringen waren 6,7 % (= jeder 15. Schnürring) dispers.

Schnürringveränderungen von Caspr fanden sich in allen PNP-Subgruppen, außer bei GBS (n = 2) und CMT1A (n = 1). Der Anteil der Patienten mit einer Dispersion von Caspr war bei Patienten mit HNPP (2/2 $\hat{=}$ 100 %), SFN (7/13 $\hat{=}$ 54 %) und MADSAM (3/6 $\hat{=}$ 50 %) am höchsten.

Insgesamt wiesen 11 von 26 Patienten (42,3 %) mit ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien und beurteilbaren Schnürringen eine Dispersion von Caspr auf. Bei den ätiologisch nicht demyelinisierenden Polyneuropathien lag der Anteil bei 21 von 57 Patienten (36,8 %), der Unterschied war nicht statistisch signifikant ($p = 0,637$).

Abb. 1: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Anti-MBP und Anti-Caspr



A: Zupfnerven, Normalbefund.

B: Fingerhaut, Normalbefund mit Aufzweigung.

C: Zupfnerven, Dispersion von Caspr (insb. nach rechts) und verlängerter Schnürring.

D: Fingerhaut, ausgeprägte Darstellung des Mesaxons (Pfeil), Normalbefund.

A-D: MBP = rot, Caspr = grün.

3.3.2.2 NF/MBP-Doppelfärbung

Bei einem Patienten gingen im Rahmen der Färbung alle drei Hautschnitte auf dem Objektträger der NF/MBP-Doppelfärbung verloren. Bei 16 Patienten (idiopathisch: 9, SFN: 2, paraproteinämisch: 1, MGUS: 1, CMT1A: 1, Diabetes Mellitus: 1, CIDP: 1) war NF auf den regelrecht gefärbten übrigen Hautschnitten nicht beurteilbar.

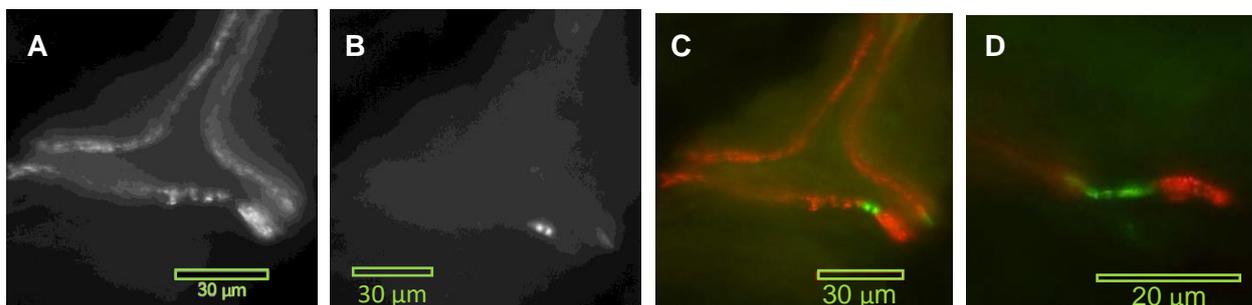
Insgesamt hatten 76 Patienten (81,7 %) in dieser Färbung beurteilbare Schnürringe.

Ein Hautschnitt enthielt durchschnittlich 4,9 beurteilbare Schnürringe in der NF-Färbung. Unterschieden wurden normale Schnürringe mit streng auf das Paranodium begrenzter Darstellung von NF (Abbildungen 2B, 2C), von Schnürringen mit Dispersion von NF im Sinne einer weiteren Darstellbarkeit bis in das angrenzende Internodium (Abbildung 2D).

Eine **Dispersion von NF** konnte nur bei einem Patienten (1,3 % der Patienten mit in dieser Färbung beurteilbaren Schnürringen) beobachtet werden. Bei diesem Patienten mit demyelinisierender paraproteinämischer Anti-MAG-Neuropathie bei MGUS Typ IgM kappa waren 2 von 40 beurteilbaren Schnürringen dispers.

Somit waren von allen in der NF-Färbung beurteilbaren Schnürringen, nur 0,08 % (= jeder 1292. Schnürring) dispers. Eine statistische Auswertung war nicht möglich.

Abb. 2: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Anti-MBP und Anti-NF



A: Fingerhaut, MBP (hell), teils schwache Färbung, Normalbefund.

B: Fingerhaut, NF (hell), Normalbefund.

C: Zusammenführen beider Bilder.

D: Fingerhaut, Dispersion von NF.

C-D: NF = grün, MBP = rot.

3.3.2.3 Pan-Na-Kanal/MBP-Doppelfärbung

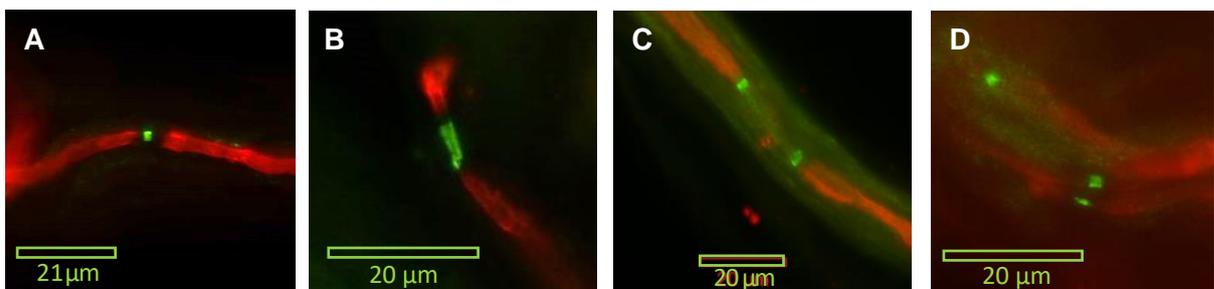
Bei vier Patienten gingen im Rahmen des Inkubationsprozesses alle Hautschnitte der Doppelfärbung Pan-Na-Kanal/MBP verloren. Bei 34 Patienten (idiopathisch: 10, SFN: 7, CIDP: 4, paraproteinämisch: 2, diabetisch: 2, GBS: 1, MMN:1, vaskulitisch: 1, CMT1A: 1, HNPP: 1, andere: 4) konnten Natriumkanäle auf den regelrecht gefärbten übrig gebliebenen Hautschnitten nicht beurteilt werden. Insgesamt hatten 56 Patienten (60,2 %) in dieser Färbung beurteilbare Schnürringe. Ein Hautschnitt enthielt durchschnittlich 2,5 beurteilbare Schnürringe in der Natriumkanalfärbung. Unterschieden wurden normale Schnürringe mit einer schmalen und im Nodium zentrierten Natriumkanalbande (Abbildungen 3A, 3D), von veränderten Schnürringen mit doppelter (Abbildung 3C) oder verlängerter (Abbildung 3B) Natriumkanalbande.

In der Natriumkanalfärbung waren 3,2 % (= jeder 31. Schnürring) der Schnürringe verändert.

Doppelte Natriumkanalbanden (Abbildung 3C) fanden sich bei insgesamt 8 Patienten (15 % der Patienten mit in dieser Färbung beurteilbaren Schnürringen), darunter Patienten mit MMN, HNPP, SFN, paraproteinämischer PNP, vaskulitischer PNP, idiopathischer PNP (3) und unklarer PNP. Insgesamt wiesen 3 von 16 Patienten (19 %) mit ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien und beurteilbaren Schnürringen doppelte Natriumkanalbanden auf. Bei den ätiologisch nicht demyelinisierenden Polyneuropathien lag der Anteil bei 5 von 38 Patienten (13 %), der Unterschied war nicht ($p = 0,682$) statistisch signifikant.

Verlängerte Natriumkanalbanden (Abbildung 3B) fanden sich bei 8 Patienten (14,8 % der Patienten mit in dieser Färbung beurteilbaren Schnürringen), darunter Patienten mit MADSAM (2), HNPP, SFN, vaskulitischer PNP und idiopathischer PNP (2). Insgesamt wiesen 3 von 16 Patienten (19 %) mit ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien und beurteilbaren Schnürringen verlängerte Natriumkanalbanden auf. Bei den ätiologisch nicht demyelinisierenden Polyneuropathien lag der Anteil bei 5 von 38 Patienten (13 %), der Unterschied war nicht ($p = 0,682$) statistisch signifikant.

Abb. 3: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Anti-MBP und Anti-Pan-Na-Kanal



A: Zupfnerven, Normalbefund.

B: Fingerhaut, Natriumkanalbande verlängert.

C: Zupfnerven, verlängerter Schnürring und doppelte Natriumkanalbande.

D: Fingerhaut, unten zwei überlappende Fasern mit normalen Natriumkanalbanden.

A-D: MBP = rot, Na = grün.

3.3.2.4 Alle Doppelfärbungen mit MBP

Nach dem Ausführen der Doppelfärbungen Caspr/MBP, NF/MBP und Pan-Na-Kanal/MBP verblieb kein Patient ohne mindestens einen Objektträger mit Hautschnitten, auf dem MBP angefärbt worden war. Bei sieben Patienten (idiopathisch: 3, CMT1A: 1, paraproteinämisch: 1, PNP bei Diabetes Mellitus Typ 1: 1, SFN: 1) war **MBP** trotz regelrechter Doppelfärbung nicht beurteilbar. Somit konnte MBP bei 86 Patienten (92,5 %) dargestellt und beurteilt werden. Ein Hautschnitt enthielt durchschnittlich 3,5 beurteilbare Schnürringe in der MBP-Färbung. Unterschieden wurden normale Schnürringe mit einer Unterbrechung der Anfärbung des internodalen MBP von weniger als 7,5 µm Länge im Bereich des Nodiums (Abbildungen 1A, 2A, 3A, 3D), von verlängerten Schnürringen mit einer MBP-Unterbrechung von mehr als 7,5 µm Länge im Bereich des Nodiums (Abbildungen 1C, 2C, 3C).

Verlängerte Schnürringe fanden sich bei 49 Patienten (57,0 % der Patienten mit in dieser Färbung beurteilbaren Schnürringen). In der MBP-Färbung waren durchschnittlich 5,3 % der Schnürringe (= jeder 19. Schnürring) verlängert.

Verlängerte Schnürringe in der MBP-Färbung konnten in allen Subgruppen, bis auf CMT1A gefunden werden. Selbst extreme Verlängerungen > 15 µm, was ungefähr dem Dreifachen der normalen Länge entspricht, kamen regelmäßig vor. Die größten Anteile von betroffenen Patienten gab es mit 100 % (2/2) bei HNPP-Patienten und mit 80 % (4/6) bei MADSAM-Patienten. Insgesamt wiesen 16 von 24 Patienten (67 %) mit ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien und beurteilbaren Schnürringen verlängerte Schnürringe auf. Bei den ätiologisch nicht demyelinisierenden Polyneuropathien lag der Anteil bei 30 von 59 Patienten (51 %), der Unterschied war nicht ($p = 0,817$) statistisch signifikant.

3.3.3 Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien von Patienten- und Kontrollgruppe

In der Patientengruppe ($n = 93$) zeigten sich bei der Auswertung der Fingerbiopsien bei 64 Patienten (68,8 %, 33 Frauen, 31 Männer) Veränderungen der Schnürringarchitektur. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten von Schnürringveränderungen bei Frauen und Männern zeigte sich ($p = 0,226$) nicht. Der Unterschied der Mittelwerte des Alters von Patienten mit Schnürringveränderungen (61,27 Jahre) und von Patienten ohne Schnürringveränderungen (62,76 Jahre) war

nicht ($p = 0,608$) statistisch signifikant. Es fanden sich bei 34 Patienten Schnürringe mit einer Dispersion von Caspr, bei 23 Patienten verlängerte Schnürringe in der MBP-Färbung, bei acht Patienten doppelte Natriumkanalbanden, bei acht Patienten verlängerte Natriumkanalbanden und bei einem Patienten eine disperse Neurofascin-Färbung (Abbildungen 1-3).

Bei keiner der 25 Kontrollpersonen fand sich eine auffällige Verteilung von Caspr, Neurofascin oder der Natriumkanäle. Bei zwei Kontrollpersonen fanden sich in der MBP-Färbung verlängerte Schnürringe. Eine Kontrollperson davon mit der Diagnose erektile Dysfunktion und eine Kontrollperson mit unbekanntem Nebendiagnosen. Sie erschien nicht mehr zu weiteren Untersuchungen, eine klinische Prüfung auf eventuelle Ausschlusskriterien zur Zulassung zur Kontrollgruppe war nicht möglich.

Schnürringveränderungen in vom Finger entnommenen Hautbiopsien kamen in der Patientengruppe signifikant ($p = 0,001$) häufiger vor als in der Kontrollgruppe.

Die folgende **Tabelle 5** gibt eine Übersicht über die in Fingerhautbiopsien von Patienten und Kontrollen gefundenen Schnürringveränderungen:

Tabelle 5: Schnürringveränderungen in den Fingerhautbiopsien von Patienten und Kontrollpersonen		
Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien	Patienten (n = 93)	Kontrollen (n = 25)
Dispersion Caspr	34 (36,6 %)	0
Verlängerte (> 7,5 µm) Schnürringe	23 (24,7 %)	2 (2,1 %)
Dispersion Neurofascin	1 (1,1 %)	0
Doppelte Natriumkanalbande	8 (8,6 %)	0
Verlängerte Natriumkanalbande	8 (8,6 %)	0
Personen mindestens einer beliebigen Schnürringveränderung	64 (68,8 %)	2 (2,1 %)

3.4 Nervus suralis Biopsien

3.4.1 Patientenkollektiv mit Zupfnerven-Präparaten

Bei 35 Patienten (37,6 %) wurde eine Nervus suralis Biopsie durchgeführt. Bei 27 Patienten (29,0 %) wurden aus Teilen daraus Zupfnerven-Präparate angefertigt. Diese Gruppe setzte sich aus 17 Patienten mit idiopathischer PNP, vier Patienten mit PNP bei Vaskulitis, zwei Patienten mit CIDP, einem Patienten mit paraproteinämischer PNP und acht Patienten mit anderen PNP-Formen (PNP bei Borreliose, unklare PNP, V.a. paraneoplastische PNP bei V.a. solidem Tumor, entzündliche PNP (2), PNP bei Motoneuronenerkrankung, unklare PNP – Differentialdiagnose (DD) HNPP, axonale PNP mit MGUS IgG-Kappa) zusammen.

3.4.2 Qualität und Beurteilbarkeit der Doppelfärbungen der Zupfnerven und Verteilung der beobachteten Schnürringveränderungen unter Berücksichtigung der Ätiologie

In der **Caspr-Färbung** konnten Schnürringe bei 25 Patienten (92,6 %) dargestellt und beurteilt werden. Bei zwei Patienten mit idiopathischer PNP konnten sie nicht nachgewiesen werden. Bei 20 Patienten (80 %) unterschiedlicher Ätiologien (idiopathisch: 9, vaskulitisch: 3, CIDP: 2, paraproteinämisch: 1, axonale PNP mit MGUS: 1, andere: 4) fand sich eine Dispersion von Caspr.

Schnürringe konnten in der **MBP-Färbung** bei 27 Patienten (100 %) beurteilt werden. Verlängerte Schnürringe fanden sich bei 19 Patienten (70,4 %). Eine vergleichsweise sehr geringe Anzahl von beurteilbaren Schnürringen von insgesamt deutlich weniger als 100 Stück lag in dieser Färbung bei vier Patienten, nämlich bei drei Patienten mit idiopathischer PNP und bei einem Patienten mit PNP bei Motoneuronenerkrankung vor.

Schnürringe konnten in der **NF-Färbung** bei neun Patienten (33,3 %) beurteilt werden. Eine Dispersion von NF konnte bei keinem der Schnürringe nachgewiesen werden.

Schnürringe konnten in der **Natriumkanal-Färbung** bei 21 Patienten (77,8 %) beurteilt werden. Die Natriumkanal-Bande war bei zehn Patienten (47,6 %) entweder doppelt oder verlängert. Hier wiesen drei Patienten (14,3 %), davon zwei mit CIDP und ein Patient mit vaskulitischer PNP, beide Merkmale gleichzeitig auf. Sechs Patienten (28,6 %), davon einer mit idiopathischer PNP, einer mit demyelinisierender paraproteinämischer PNP bei MGUS, einer mit axonaler PNP mit MGUS, einer mit

unklarer PNP DD HNPP und einer mit PNP bei Vaskulitis, hatten ausschließlich eine doppelte Natriumkanalbande. Es gab einen Patienten (4,8 %) mit idiopathischer PNP, bei dem ausschließlich ein Schnürring mit einer verlängerten Natriumkanalbande vorlag.

Aus der Patientengruppe mit Zupfnerven (n = 27) waren nur zwei Patienten mit CIDP und ein Patient mit paraproteinämischer PNP ätiologisch den demyelinisierenden Polyneuropathien zuzuordnen.

Der erste CIDP-Patient wies in Histologie und Elektrophysiologie ein demyelinisierendes Muster auf. In den Zupfnerven fand sich eine Dispersion von Caspr, sowie verlängerte und doppelte Natriumkanalbanden. In den Fingerhautbiopsien waren Caspr und Natriumkanäle trotz gelungener Färbung nicht nachweisbar. In den MBP-Färbungen fanden sich zwei normale Schnürringe.

Der zweite CIDP-Patient zeigte histologisch ein axonales und elektrophysiologisch ein demyelinisierendes Schädigungsmuster. In den Zupfnerven fanden sich eine Dispersion von Caspr, verlängerte und doppelte Natriumkanalbanden und auch verlängerte Schnürringe. In den Fingerhautbiopsien fanden sich zwei normale Schnürringe in der Caspr-Färbung, ein Schnürring mit doppelter Natriumkanalbande, kein Schnürring mit verlängerter Natriumkanalbande und vier verlängerte Schnürringe in der MBP-Färbung.

Der Patient mit paraproteinämischer PNP bei MGUS IgM-Lambda wies histologisch und elektrophysiologisch eher Zeichen der axonalen Schädigung auf. In den Zupfnerven fanden sich ein Schnürring mit Dispersion von Caspr und ein Schnürring mit doppelter Natriumkanalbande. Die MBP-Färbung war unauffällig. Die NF-Färbung erbrachte keine auswertbaren Ergebnisse.

3.4.3 Befunde der histologischen Routinediagnostik unter Berücksichtigung der Ätiologie

Bei der histologischen Routinediagnostik der Nervenbiopsien durch Neurologen der Klinik, erfolgte gemäß festgelegter Diagnosekriterien die Einordnung in Proben mit überwiegend axonalem, überwiegend demyelinisierendem oder gemischtem Schädigungsmuster.

Für alle 27 Patienten mit Zupfnerven-Präparaten lagen die Ergebnisse der histologischen Routineuntersuchung vor.

Bei sieben Patienten (25,9 %), nämlich bei einem von zwei Patienten mit CIDP, bei 4 von 14 Patienten mit idiopathischer PNP, bei einem Patienten mit unklarer PNP DD HNPP und bei einem Patienten mit PNP bei Motoneuronerkrankung, wurden histologisch überwiegend Zeichen der Demyelinisierung gefunden.

Ein Patient (3,6 %) mit PNP mit MGUS wies histologisch gleichermaßen Anzeichen für Demyelinisierung und axonale Schädigung auf.

Bei den übrigen 19 Patienten (70,4 %) fand sich histologisch eine überwiegend axonale Schädigung.

Schnürringveränderungen in den Zupfnerven-Präparaten, kamen bei keiner PNP-Ätiologie statistisch signifikant häufiger vor ($p = 0,705$).

3.4.4 Vergleich der histologischen Routinediagnostik mit den Schnürringveränderungen in Zupfnerven

Wie folgende **Tabelle 6** zeigt, gibt es in Nervus suralis Biopsien keine Assoziation zwischen dem überwiegenden Vorliegen von Zeichen der Demyelinisierung in der histologischen Routinediagnostik und dem Vorliegen von Schnürringveränderungen in den Zupfnervenpräparaten.

Tabelle 6: Schnürringveränderungen in Zupfnerven je nach Befund der histologischen Routinediagnostik. Bezug ist die Anzahl der Patienten mit Vorliegen von in der jeweiligen Färbung beurteilbaren Schnürringen.
p-Wert für nicht zufällige Verteilung.

	Histologisch überwiegend Zeichen der Demyelinisierung (7 Patienten)	Histologisch überwiegend Zeichen axonaler Schädigung (19 Patienten)	Histologisch gemischt axonales und demyelinisierendes Bild (1 Patient)
Caspr- Dispersion p = 0,581	100 % (4/4)	72 % (13/18)	100 % (1/1)
NF-Dispersion Fallzahl zu gering	0 % (0/2)	0 % (0/6)	0 % (0/1)
Na-Kanalbande verlängert P = 0,861	14 % (1/3)	23 % (3/13)	0 % (0/1)
Na-Kanalbande doppelt p = 0,502	67 % (2/3)	38 % (5/13)	100 % (1/1)
Schnürring verlängert (MBP) p = 0,925	60 % (3/5)	63 % (12/19)	100 % (1/1)

3.4.5 Vergleich der Schnürringveränderungen in Zupfnerven und Hautbiopsien

Bei keinem der 35 Patienten, die sowohl eine Fingerhautbiopsie als auch eine offene Biopsie des Nervus suralis erhalten hatten, waren die untersuchten Schnürringveränderungen in allen Doppelfärbungen der Fingerhautbiopsien und der Zupfnervenpräparate identisch ausgeprägt. Die folgende **Tabelle 7** zeigt für jede der durchgeführten Färbungen, die beobachtete Übereinstimmung der Schnürringveränderungen in Hautbiopsien und Zupfnervenpräparaten.

Tabelle 7: Übereinstimmung der Schnürringveränderungen in Hautbiopsien und Zupfnervenpräparaten. Für jede Färbung wurden ausschließlich Patienten mit sowohl in den Zupfnerven als auch in den Fingerhautbiopsien beurteilbaren Schnürringen (Caspr: n = 21, Na: n = 9, MBP: n = 24) ausgewählt. Für jede Färbung wurde dann mittels Kreuztabellen nach übereinstimmenden Befunden in beiden Untersuchungsmodalitäten gesucht. Mit dem exakten Test nach Fisher wurde die zweiseitige Signifikanz für die Verteilung der Befunde bestimmt.	
Caspr-Dispersion p = 0,163	5 von 21 Pat. (23,8 %) mit übereinstimmenden Befunden: Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven verändert: 4 Pat. (19,0%) Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven normal: 1 Pat. (4,8 %)
Neurofascin Dispersion	keine Auswertung wegen geringer Fallzahl.
Verlängerte Na-Färbung p = 0,832	6 von 9 Pat. (66,7 %) mit übereinstimmenden Befunden: Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven verändert: 0 Pat. Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven normal: 6 Pat. (66,7 %)
Doppelte Na-Färbung p = 0,738	6 von 9 Pat. (66,7 %) mit übereinstimmenden Befunden: Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven verändert: 0 Pat. Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven normal: 6 Pat. (66,7 %)
Veränderte Na-Färbung p = 0,673	4 von 9 Pat. (44,4 %) mit übereinstimmenden Befunden: Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven verändert: 0 Pat. Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven normal: 4 Pat. (44,4 %)
Verlängerte Schnürringe (MBP) p = 0,665	10 von 24 Pat. (41,7 %) mit Übereinstimmenden Befunden: Schnürringe von Fingerhaut <u>u.</u> Zupfnerven verändert: 8 Pat. (33,3 %) Schnürringe von Fingerhaut <u>und</u> Zupfnerven normal: 2 Pat. (8,3 %)

3.5 Elektrophysiologische Messungen

3.5.1 Patienten und Messverfahren

Bei allen Patienten wurde im Rahmen der Abklärung durch die Klinik anhand elektrophysiologischer Messungen bestimmt, ob ein demyelinisierendes, axonales oder gemischtes Schädigungsmuster vorliegt. Auch die einzelnen Werte für Nervenleitgeschwindigkeiten, Amplituden und bei motorischen Nerven zusätzlich für die distale motorische Latenz und die F-Persistenz lagen vor. Die am häufigsten untersuchten Nerven waren der Nervus tibialis (motorisch), der Nervus medianus (motorisch und sensibel) und der Nervus suralis (sensibel), so dass die Messergebnisse dieser drei Nerven in die Auswertung aufgenommen wurden (siehe Material und Methoden). Bei 77 Patienten (82,8 %) lagen diesbezüglich vollständige Messergebnisse vor, so dass eine Berücksichtigung in der Auswertung erfolgen konnte.

Sowohl die Morphologie der grafischen Darstellung der Reizantworten, als auch die absoluten Werte für Amplituden, distale motorische Latenzen, Nervenleitgeschwindigkeiten und F-Wellen-Persistenzen (motorische Nerven) bzw. Amplituden und Nervenleitgeschwindigkeiten (sensible Nerven) wurden berücksichtigt.

Zusammenfassend wurden, wie in der Einleitung dargestellt, verminderte Amplituden bei erhaltender Nervenleitgeschwindigkeit als axonales Schädigungsmuster und reduzierte Leitungsgeschwindigkeiten bei erhaltenen Amplituden oder distale Leitungsblöcke als demyelinisierendes Schädigungsmuster gewertet.

In der folgenden **Abbildung 4** finden sich Beispielbefunde für die Bildmorphologie der Graphen von elektrophysiologisch axonalen bzw. demyelinisierenden Messergebnissen.

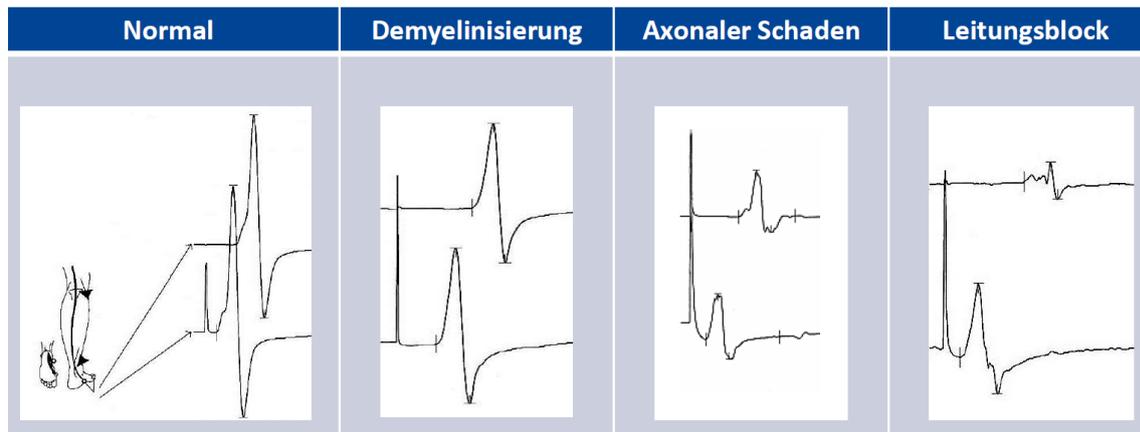


Abb. 4 (Abdruck aus den Vorlesungsunterlagen „Neurophysiologie in der neurologischen Diagnostik“ mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. med. Daniel Zeller, Neurologische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg): Reizantworten des N. tibialis, gemessen über dem M. flexor hallucis longus bei proximaler Stimulation in der Kniekehle (obere Kurve) und bei distaler Stimulation kaudal des Innenknöchels (untere Kurve). Y-Achse = Stromstärke, X-Achse = Zeit. Links, Normalbefund: Amplituden etwa gleich, bei proximaler Stimulation etwas spätere Registrierung des Summenaktionspotentials. Mitte links, Demyelinisierung: Zeit bis zur Registrierung der Reizantwort bei proximaler und bei distaler Stimulation verlängert, somit reduzierte NLG und verlängerte distal-motorische Latenz. Mitte rechts, axonaler Schaden: Beide Amplituden vermindert. Rechts, Leitungsblock: Bei proximaler Stimulation im Vergleich zu distaler Stimulation deutlich verspätete und reduzierte Reizantwort.

3.5.2 Elektrophysiologische Schädigungsmuster bei unterschiedlichen Ätiologien der Polyneuropathien

Bei allen 11 Patienten (14,3 %) mit SFN lag erwartungsgemäß elektrophysiologisch ein **Normalbefund** vor.

Bei 18 von 77 Patienten (23,4 %) lag ein **demyelinisierendes Schädigungsmuster** vor: Darunter befanden sich sechs der sieben Patienten mit CIDP, bei einem weiteren CIDP-Patienten lag ein gemischt axonal-demyelinisierendes Muster vor. Auch alle CMT1A-, GBS- und HNPP-Patienten, sowie der einzige elektrophysiologisch untersuchte MADSAM-Patient und zwei von drei Patienten mit paraproteinämischer PNP, wiesen erwartungsgemäß ein überwiegend demyelinisierendes Schädigungsmuster auf. Von den MMN-Patienten lagen zwar elektrophysiologische

Messwerte einzelner Nerven vor, jedoch keine aktuelle zusammenfassende Bewertung des elektrophysiologischen Schädigungsmusters. Zusätzlich zeigte sich elektrophysiologisch ein demyelinisierendes Schädigungsmuster bei Patienten mit idiopathischer PNP (2/32), PNP bei Motoneuronenerkrankung (1/1) und v.a. hereditäre PNP (1/1).

Bei 42 von 77 Patienten (54,5 %) lag ein **axonales Schädigungsmuster** vor: Darunter befanden sich 27 von 32 Patienten mit idiopathischer PNP, vier von vier Patienten mit PNP bei Vaskulitis, der Patient mit PNP mit MGUS Typ IgG-kappa, zwei von drei Patienten mit diabetischer PNP und sieben Patienten mit anderen PNP-Formen: Paraneoplastische PNP, unklare PNP DD HNPP, Schwerpunkt Neuropathie N. ischiadicus, unklare PNP DD rheumatisch DD diabetisch, entzündliche PNP, hereditäre PNP CMT 2, PNP bei Borreliose. Auch einer von drei Patienten mit paraproteinämischer PNP wies elektrophysiologisch ein überwiegend axonales Schädigungsmuster auf.

Bei sechs Patienten (7,8 %) lag ein **gemischt axonal-demyelinisierendes Schädigungsmuster** vor: Darunter befanden sich einer von sieben CIDP-Patienten, 4 von 32 Patienten mit idiopathischer PNP und ein Patient mit PNP entzündlicher Genese.

3.5.3 Schnürringveränderungen der Fingerhautbiopsien in Abhängigkeit der einzelnen elektrophysiologischen Messgrößen

Die Mittelwerte unten genannter elektrophysiologischer Messwerte von Patienten mit Schnürringveränderungen und von Patienten ohne Schnürringveränderungen wurden einander gegenübergestellt. Die notwendige Stichprobengröße ($n > 10$) für die Auswertung von nicht zuverlässig normalverteilten Daten mittels t-Test, wurde bei jeder Messung übertroffen.

Der Mittelwertvergleich zeigte keine der im Sinne der Fragestellung dieser Arbeit erwarteten Unterschiede. Statistisch gesehen hatten Patienten mit Caspr-Dispersion sogar bessere Amplituden (Nervus tibialis, Nervus suralis, jeweils proximale Reizung) als Patienten ohne Caspr-Dispersion.

Die folgenden **Tabellen 8, 9 und 10** stellen alle Durchschnittswerte oben genannter Messgrößen aus beiden Patientengruppen (Färbung auffällige – nicht auffällig) einander gegenüber.

Tabelle 8: Vergleich der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeiten von Patienten mit und ohne Schnürringveränderungen. Eine Färbung wurde als auffällig gewertet, wenn mindestens ein veränderter Schnürring gefunden wurde. Abkürzungen: SD = Standardabweichung, n = Fallzahl. *Fortsetzung Tabelle 9*

	Nerv	MBP elongiert	MBP normal	Caspr dispers	Caspr normal	Na doppelt	Na nicht doppelt	Na elongiert	Na nicht elongiert
Nervenleitgeschwindigkeit NLG [m/s]	Tibialis motorisch	39,5 SD=6,5 n = 40	39,8 SD=6,9 n = 35	41,6 SD=6,7 n = 28	39,3 SD=6,4 n = 46	41,2 SD=4,6 n = 5	40,3 SD=4,4 n = 44	41,9 SD=3,3 n = 6	40,2 SD=4,5 n = 43
	Medianus motorisch	45,7 SD=14,5 n = 38	44,6 SD=10,6 n = 28	49,9 SD=14,8 n = 22	45,5 SD=11,9 n = 41	47,2 SD=10,6 n = 7	47,9 SD=10,8 n = 34	52,3 SD=3,9 n = 7	46,9 SD=11,3 n = 34
	Medianus sensibel	48,8 SD=7,8 n = 31	49,3 SD=6,4 n = 22	50,1 SD=8,3 n = 20	48,2 SD=6,5 n = 34	52,0 SD=10,6 n = 5	50,7 SD=5,4 n = 31	50,3 SD=9,4 n = 7	51,1 SD=5,4 n = 29
	Suralis	45,7 SD=14,5 n = 38	44,5 SD=10,6 n = 28	43,1 SD=6,6 n = 25	41,7 SD=5,6 n = 33	41,9 SD=4,8 n = 4	41,7 SD=6,1 n = 35	41,4 SD=4,9 n = 7	41,8 SD=6,2 n = 32

Tabelle 9: Vergleich der durchschnittlichen Amplituden von Patienten mit und ohne Schnürringveränderungen. Eine Färbung wurde als auffällig gewertet, wenn mindestens ein veränderter Schnürring gefunden wurde.

Abkürzungen: dist. = distal, Red. = Reduktion, SD = Standardabweichung, mot. = motorisch, n = Fallzahl, prox. = proximal, sens. = sensibel. *Fortsetzung Tabelle 10*

	Nerv	MBP elongiert	MBP normal	Caspr dispers	Caspr normal	Na doppelt	Na nicht doppelt	Na elongiert	Na nicht elongiert
Amplitude A: N. tibialis & N. medianus [mV], N. suralis [µV]	Tibialis proximal	7,1 SD=7,0 n = 43	6,7 SD=8,5 n = 40	9,8 SD=8,3 n = 29 p=0,047	6,0 SD=7,4 n = 51 p=0,047	6,6 SD=9,8 n = 7	7,9 SD=7,7 n = 4 5	9,9 SD=9,6 n = 7	7,4 SD=7,7 n = 45
	Tibialis distal	4,7 SD=5,1 n = 43	4,6 SD=5,7 n = 40	5,6 SD=6,5 n = 29	5,6 SD=4,3 n = 51	4,8 SD=7,4 n = 7	5,3 SD=5,3 n = 45	7,6 SD=7,0 n = 7	4,8 SD=5,3 n = 45
	Tibialis Red. %			34,1 SD=17,8 n = 28	32,6 SD=23,7 n = 47				
	Medianus mot., prox.	9,7 SD=5,2 n = 37	8,9 SD=4,7 n = 28	11,0 SD=5,8 n = 21	9,1 SD=4,9 n = 41	10,7 SD=5,2 n = 7	10,6 SD=4,8 n = 33	13,4 SD=5,5 n = 7	10,0 SD=4,6 n = 33
	Medianus mot., dist.	8,6 SD=5,5 n = 37	7,7 SD=5,5 n = 28	9,7 SD=4,9 n = 21	8,1 SD=5,0 n = 41	9,1 SD=4,4 n = 7	9,4 SD=4,9 n = 33	11,5 SD=4,9 n = 7	8,9 SD=4,7 n = 33
	Medianus sens.	19,7 SD=18,5 n = 36	16,9 SD=17,6 n = 25	25,3 SD=22,5 n = 22 p=0,081	15,8 SD=13,7 n = 39 p=0,081	23,6 SD=27,6 n = 6	22,5 SD=18,0 n = 32	23,4 SD=24,5 n = 7	22,5 SD=18,5 n = 31
	Suralis	5,8 SD=7,1 n = 41	5,6 SD=7,5 n = 34	8,8 SD=8,7 n = 27 p=0,026	4,4 SD=5,9 n = 46 p=0,026	7,2 SD=13,4 n = 7	6,0 SD=7,0 n = 40	8,4 SD=12,3 n = 8	5,8 SD=7,1 n = 39

Tabelle 10: Vergleich der durchschnittlichen Latenzzeiten von Patienten mit und ohne Schnürringveränderungen. Eine Färbung wurde als auffällig gewertet, wenn mindestens ein veränderter Schnürring gefunden wurde.
Abkürzungen: dist. = distal, dmL = distale motorische Latenz, SD = Standardabweichung, mot. = motorisch, n = Fallzahl.

Nerv		MBP elongiert	MBP normal	Caspr dispers	Caspr normal	Na doppelt	Na nicht doppelt	Na elongiert	Na nicht elongiert
dmL [ms]	Tibialis	4,7 SD=1,6 n = 40	5,9 SD=6,4 n = 36	4,5 SD=1,6 n = 28	5,7 SD=5,6 n = 47	5,5 SD=2,2 n = 6	5,1 SD=5,3 n = 44	4,5 SD=1,0 n = 6	5,2 SD=5,4 n = 44
	Medianus	5,1 SD = 3,7 n = 37	5,0 SD=2,8 n = 28	4,5 SD=2,0 n = 21	5,3 SD=3,9 n = 41	5,0 SD=2,9 n = 7	4,0 SD=1,2 n = 33	4,0 SD=1,1 n = 7	4,3 SD=1,7 n = 33
F-Latenz [ms]	Tibialis	56,2 SD=13,0 n = 31	56,7 SD=14,7 n = 24	55,8 SD=6,3 n = 23	56,4 SD=17,4 n = 31	55,8 SD=6,6 n = 4	57,4 SD=13,1 n = 35	54,7 SD=5,1 n = 5	57,6 SD=13,3 n = 34
	Medianus	30,5 SD=4,7 n = 30	31,2 SD=5,3 n = 19	30,4 SD=5,4 n = 20	30,7 SD=4,7 n = 27	31,2 SD=8,4 n = 7	29,8 SD=2,7 n = 26	30,7 SD=3,1 n = 7	30,0 SD=4,7 n = 26

3.5.4 Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien in Abhängigkeit des Befundes der elektrophysiologischen Untersuchungen

Die gefundenen Schnürringveränderungen in den Fingerhautbiopsien wurden nicht nur mit den einzelnen Werten (Amplituden, Latenzen, etc.) der elektrophysiologischen Messungen verglichen, sondern auch mit der elektrophysiologischen Diagnose. Diese wurde durch verschiedene Ärztinnen und Ärzte der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg erstellt. In die elektrophysiologische Diagnose floss somit neben den oben genannten absoluten Werten, auch der Eindruck des jeweiligen Untersuchers von der Morphologie der aufgezeichneten Stromkurven mit ein. Zusammenfassend fanden sich, wie in **Tabelle 11** dargestellt, statistisch signifikant häufiger doppelte Natriumkanalbanden ($p = 0,018$) in der elektrophysiologisch als demyelinisierend befundenen Patientengruppe. Einschränkend muss hier die geringe Fallzahl von fünf Patienten mit elektrophysiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien und beurteilbaren Schnürringen in der Pan-Na-Kanal-Färbung und die Untersucherabhängigkeit beachtet werden. Weiter statistisch signifikante Zusammenhänge fanden sich nicht.

Tabelle 11: Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien je nach elektrophysiologischer Diagnose. Bezug für die Prozentangabe ist die Anzahl der Patienten mit in der jeweiligen Färbung beurteilbaren Schnürringen. p-Wert für nicht-zufällige Verteilung.		
	Elektrophysiologisch demyelinisierend	Elektrophysiologisch axonal
Dispersion von Caspr p = 0,501	42,9 % 6/14	28,6 % 10/35
Dispersion von Neurofascin, keine statistische Auswertung	6,7 % 1/15	0 % 0/30
Verlängerte Natriumkanalbanden p = 0,163	40 % 2/5	11,1 % 3/27
Doppelte Natriumkanalbanden p = 0,018	60 % 3/5	7,4 % 2/27
Verlängerte Schnürringe (MBP) p = 0,603	56,3 % 9/16	56,8 % 21/37

3.5.5 Schnürringveränderungen in Zupfnerven in Abhängigkeit von der elektrophysiologischen Gesamtdiagnose

Bei den als elektrophysiologisch demyelinisierend befundenen Patienten traten bei kleinen Fallzahlen Schnürringveränderungen in der Caspr- und Pan-Na-Kanal-Färbung etwas häufiger auf, als bei elektrophysiologisch als axonal befundenen Patienten.

Jedoch ohne dass die Unterschiede der Verteilungen statistische Signifikanz erreichten. Die Zahlen sind in **Tabelle 12** zusammengefasst.

	Elektrophysiologisch demyelinisierend	Elektrophysiologisch axonal
Dispersion von Caspr p = 0,093	100 % 3/3	75 % 15/20
Dispersion von Neurofascin, keine statistische Auswertung	0 % 0/0	0 % 0/8
Verlängerte Natriumkanalbanden p = 0,073	67 % 2/3	13,3 % 2/15
Doppelte Natriumkanalbanden p = 0,371	67 % 2/3	40 % (6/15)
Verlängerte Schnürringe (MBP) p = 0,093	100 % 3/3	75 % 15/20

3.6 Beschreibung der PNP-Subgruppen unter Berücksichtigung der Schnürringveränderungen aus Fingerhautbiopsien und Zupfnerven und der elektrophysiologischen Einordnung

3.6.1 Ätiologisch demyelinisierende Polyneuropathien

Bei den Patienten mit ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien konnte bei beiden in die Studie eingeschlossenen Patienten mit HNPP eine Dispersion von Caspr und eine Verlängerung der Schnürringe gefunden werden. Bei einem der beiden Patienten war die Natriumkanalfärbung beurteilbar und zeigte sowohl verlängerte als auch doppelte Natriumkanalbanden. Beide Patienten wiesen elektrophysiologisch ein demyelinisierendes Schädigungsmuster auf.

Bei vier von sechs MADSAM-Patienten lagen Schnürringveränderungen vor. Darunter drei Patienten mit Dispersion von Caspr, vier mit verlängerten Schnürringen und zwei Patienten mit verlängerten Natriumkanalbanden. Bei einer 64-jährigen MADSAM-Patientin ganz ohne Schnürringveränderungen (bei jeweils gut beurteilbaren Doppelfärbungen) lagen elektrophysiologische Messungen vor. Diese zeigten erwartungsgemäß ein demyelinisierendes Schädigungsmuster. Bei einem weiteren MADSAM-Patienten ohne Schnürringveränderungen, lag kein Befund der elektrophysiologischen Untersuchungen vor.

Bei der größten Subgruppe der acht MMN-Patienten hatten sechs Patienten veränderte Schnürringe, davon wiesen vier Patienten verlängerte Schnürringe, drei Patienten eine Dispersion von Caspr und ein Patient doppelte Natriumkanalbanden auf. Befunde der elektrophysiologischen Messungen lagen nicht vor.

Vier von sieben CIDP-Patienten wiesen Schnürringveränderungen auf. Caspr war bei einem Patienten mit elektrophysiologisch gemischtem Schädigungsmuster und einem Patienten, der wie die übrigen Patienten elektrophysiologisch ein demyelinisierendes Schädigungsmuster aufwies, dispers. Nur bei einem Patienten waren Natriumkanalbanden nachweisbar, diese waren normal. In der MBP-Färbung hatten drei Patienten verlängerte Schnürringe.

Bei dem CMT1A-Patienten waren Caspr, NF, MBP und Natriumkanäle trotz regelrechter Positivkontrolle auf insgesamt neun erhaltenen Hautschnitten nicht nachweisbar. Elektrophysiologisch fand sich erwartungsgemäß eine demyelinisierendes Schädigungsmuster.

Bei einem der GBS-Patienten fanden sich, bei jedoch Fehlen von beurteilbaren Schnürringen in der Natriumkanal-Färbung, keine Schnürringveränderungen. Bei dem anderen GBS-Patienten waren 18 von 27 beurteilbaren Schnürringen in der MBP-Färbung verlängert, weitere Auffälligkeiten fanden sich nicht. Es gab nur einen weiteren Patienten mit idiopathischer Polyneuropathie (elektrophysiologisch axonales Schädigungsmuster, keine Suralis Biopsie) der ähnlich viele verlängerte (14) und beurteilbare (21) Schnürringe in der MBP-Färbung hatte. Die Elektrophysiologie bestätigte bei beiden GBS-Patienten ein demyelinisierendes Schädigungsmuster. Nervus suralis Biopsien wurden nicht durchgeführt.

Zwei von drei Patienten mit paraproteinämischer PNP wiesen elektrophysiologisch ein demyelinisierendes Schädigungsmuster auf. Einer der Patienten zeigte in den Fingerhautbiopsien eine Dispersion von Caspr und verlängerte Schnürringe, eine Suralisbiopsie wurde nicht durchgeführt. Der andere Patient zeigte als einziger Patient in dieser Studie in der Fingerhautbiopsie eine Dispersion von NF, zusätzlich fanden sich hier doppelte Natriumkanalbanden und verlängerte Schnürringe. Eine Suralisbiopsie wurde nicht durchgeführt. Der dritte Patient mit paraproteinämischer PNP zeigte elektrophysiologische eher ein axonales Schädigungsmuster, die Fingerhautbiopsien waren unauffällig, in den Zupfnervenpräparaten fand eine Dispersion von Caspr und doppelte Natriumkanalbanden.

3.6.2 Ätiologisch nicht-demyelinisierende Polyneuropathien

Etwa die Hälfte der SFN-Patienten hatte auffällige Schnürringe in der Caspr- und der MBP-Färbung, während nur bei einem Patienten sowohl eine doppelte als auch eine verlängerte Natriumkanalbande gefunden werden konnte. Wie bei dieser Ätiologie zu erwarten, lag in der Elektrophysiologie, falls durchgeführt, ein Normalbefund vor. Nervus suralis Biopsien wurden nicht durchgeführt.

Es gab drei Patienten mit diabetischer PNP, davon konnten bei einem Patienten mit elektrophysiologisch axonalem Schädigungsmuster keine Schnürringe in den Fingerhautbiopsien gefunden werden. Bei einem Patienten mit elektrophysiologisch ebenfalls axonalem Schädigungsmuster lagen verlängerte Schnürringe in den Fingerhautbiopsien vor, Natriumkanalbanden waren nicht darstellbar, die Caspr-Färbung war normal. Beim dritten Patienten mit diabetischer Polyneuropathie lagen keine Befunde der elektrophysiologischen Messungen vor. Alle Färbungen der

Fingerhautbiopsie waren beurteilbar, es zeigte sich lediglich eine Dispersion von Caspr.

Bei allen vier Patienten mit vaskulitischer PNP lag erwartungsgemäß elektrophysiologisch und histologisch ein überwiegend axonales Schädigungsmuster vor. Der erste Patient zeigte in den Fingerhautbiopsien eine Dispersion von Caspr, in den Zupfnerven waren alle Merkmale verändert.

Der zweite Patient zeigte in den Fingerbiopsien eine Dispersion von Caspr, sowie eine Verlängerung der Schnürringe und Natriumkanalbanden. In den Zupfnerven war Caspr dispers und die Schnürringe verlängert, Natriumkanalbanden waren nicht darstellbar.

Beim dritten Patienten fanden sich keine Veränderungen in den Fingerhautbiopsien, Natriumkanäle waren allerdings nicht darstellbar. In den Zupfnerven fand sich eine Dispersion von Caspr, doppelte Natriumkanalbanden und verlängerte Schnürringe.

Der vierte Patient wies in den Fingerhautbiopsien doppelte Natriumkanalbanden auf. In den Zupfnerven waren keine Natriumkanalbanden darstellbar, die übrigen Merkmale waren normal.

Von allen 33 Patienten mit idiopathischer PNP lag bei 19 von 30 Patienten (63,3 %) mit beurteilbaren Schnürringen mindestens eine auffällige Färbung vor. Verlängerte Schnürringe in der MBP-Färbung waren mit einem Auftreten bei 16 von 30 Patienten (53,3 %) am häufigsten. Eine Dispersion von Caspr fand sich bei 8 von 29 Patienten (27,6 %) mit in dieser Färbung beurteilbaren Schnürringen. Es fanden sich ein Patient mit doppelter, zwei Patienten mit verlängerter und ein Patient mit doppelter und verlängerter Natriumkanalbande. In der Neurofascin-Färbung lagen insgesamt 22 normale Schnürringe vor. Elektrophysiologisch wiesen 27 von 33 Patienten (81,8 %) ein axonales, vier Patienten (12,1 %) ein gemischtes und zwei Patienten (6,3 %) ein demyelinisierendes Muster auf.

Zwölf weitere Patienten ließen sich nicht den zuvor genannten Subgruppen zuordnen. Zehn von ihnen hatten veränderte Schnürringe. Bis auf eine Verlängerung der Natriumkanalbanden und eine Dispersion von Neurofascin, fanden sich alle Schnürringveränderungen in dieser inhomogenen Subgruppe. Einer der Patienten (PNP bei Motoneuronerkrankung) zeigte elektrophysiologische überwiegend Zeichen der Demyelinisierung. Die übrigen Patienten zeigten axonale und gemischte Schädigungsmuster. Bei sieben Patienten wurden Suralisbiopsien durchgeführt, darunter drei Patienten, die histologisch überwiegend Zeichen der Demyelinisierung

zeigten, nämlich Patienten mit entzündlicher PNP, PNP bei Motoneuronerkrankung und unklarer PNP DD HNPP.

Von fünf dieser Patienten wurden Zupfnervenpräparate angefertigt. Wie in den Fingerhautbiopsien, fanden sich auch hier alle Veränderungen, bis auf verlängerte Natriumkanalbanden und eine Dispersion von Neurofascin.

3.6.3 Übersicht der Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien bei ätiologisch demyelinisierenden und nicht-demyelinisierenden Polyneuropathien

In der Patientengruppe mit ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien war bei insgesamt 21 von 23 Patienten (91 %) mit beurteilbaren Schnürringen mindestens ein veränderter Schnürring zu finden. In der Patientengruppe der ätiologisch nicht-demyelinisierenden Polyneuropathien lag dieser Anteil mit 43 von 50 Patienten (86 %) etwas niedriger, ein statistischer signifikanter Zusammenhang konnte mit $p = 0,493$ nicht nachgewiesen werden.

Die Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien der Patientengruppe sind, sortiert nach ätiologisch demyelinisierenden und axonalen Polyneuropathien in den beiden folgenden **Tabellen 13 und 14** zusammengefasst:

Tabelle 13: Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien bei ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien. Bezug für die Prozentangabe ist die Anzahl der Patienten mit in der jeweiligen Färbung beurteilbaren Schnürringen.
p-Wert für nicht-zufällige Verteilung.

Pat. mit veränderten Schnürringen / Pat. mit beurteilbaren Schnürringen	CIDP 7 Pat.	GBS 2 Pat.	MMN 8 Pat.	MADSAM 6 Pat.	HNPP 2 Pat.	CMT1A 1 Pat.	Paraprotein- ämisch 3 Pat.	Gesamt 29 Pat.
Dispersion Caspr p = 0,673	40 % 2/5	0 % 0/2	38 % 3/8	50 % 3/6	100 % 2/2	0/0	33 % 1/3	42 % 11/26
Dispersion Neurofascin	0 % 0/6	0 % 0/2	0 % 0/8	0 % 0/6	0 % 0/2	0/0	50 % 1/2	4 % 1/26
Verlängerte Natriumkanalbanden p = 0,318	0 % 0/1	0 % 0/1	0 % 0/6	33 % 2/6	100 % 1/1	0/0	0 % 0/1	19 % 3/16
Doppelte Natriumkanalbanden p = 0,213	0 % 0/1	0 % 0/1	17 % 1/6	0 % 0/6	100 % 1/1	0/0	100 % 1/1	19 % 3/16
Verlängerte Schnürringe (MBP) p = 0,900	43 % 3/7	50 % 1/2	38 % 3/8	67 % 4/6	100 % 2/2	0/0	100 % 2/2	67 % 16/24
Pat. mit mindestens 1 auffälligen Färbung / Pat. mit mindestens 1 beurteilbaren Färbung p = 0,474	57 % 4/7	50 % 1/2	63 % 5/8	67 % 4/6	100 % 2/2	0/0	67 % 2/3	64 % 18/28

Tabelle 14: Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien bei ätiologisch nicht demyelinisierenden Polyneuropathien. Bezug für die Prozentangabe ist die Anzahl der Patienten mit in der jeweiligen Färbung beurteilbaren Schnürringen.
p-Wert für nicht-zufällige Verteilung.

Pat. mit veränderten Schnürringen / Pat. mit beurteilbaren Schnürringen	SFN 13 Pat.	Diabetisch 3 Pat.	Vaskulitisch 4 Pat.	Idiopathisch 32 Pat.	Andere 12 Pat.	Gesamt 64 Pat.
Dispersion Caspr p = 0,673	54 % 7/13	50 % 1/2	50 % 2/4	29 % 8/28	30 % 3/10	37 % 21/57
Dispersion Neurofascin	0 % 0/11	0 % 0/2	0 % 0/4	0 % 0/21	0 % 0/11	0 % 0/50
Verlängerte Natriumkanalbanden p = 0,318	17 % 1/6	0 % 0/1	33 % 1/3	15 % 3/20	0 % 0/8	13 % 5/38
Doppelten Natriumkanalbanden p = 0,213	17 % 1/6	0 % 0/1	33 % 1/3	10 % 2/20	13 % 1/8	13 % 5/38
Verlängerte Schnürringe (MBP) p = 0,900	42 % 5/12	50 % 1/2	50 % 2/4	52 % 15/29	58 % 7/12	51 % 30/59
Pat. mit mindestens 1 auffälligen Färbung / Pat. mit min. einer beurteilbaren Färbung p = 0,474	77 % 10/13	100 % 2/2	75 % 3/4	63 % 19/30	75 % 9/12	70 % 43/61

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass inkludierte Patienten, bei denen elektrophysiologisch eine demyelinisierende PNP diagnostiziert wurde, signifikant häufiger doppelte Natriumkanalbanden in den Fingerhautbiopsien aufwiesen, als inkludierte Patienten, bei denen elektrophysiologisch eine axonale PNP diagnostiziert wurde. Ein direkter Bezug zu einzelnen Messwerten der elektrophysiologischen Untersuchungen, fand sich jedoch nicht. Im Folgenden sollen dieses und die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit, sowie die verwendeten Methoden, kritisch und vergleichend reflektiert werden.

4.2 Patientengruppe

In der Fallzahlplanung für diese Studie wurde eine Patientenzahl von 101 errechnet, um für die entsprechenden Fragestellungen ein Signifikanzniveau von 5 % und eine Power von 95 % zu erreichen. Letztendlich wurden 93 Patienten in die Auswertung einbezogen und das gesetzte Ziel somit fast erreicht. Es konnte eine statistisch signifikante Aussage mit Potential für weitere Untersuchungen getroffen werden, siehe unter „Auswertung der Fingerhautbiopsien“ in diesem Kapitel.

Bislang ist nicht abschließend bekannt, welche Faktoren Einfluss auf die untersuchten Schnürringmerkmale haben. Ein Zusammenhang, zwischen dem Auftretens von Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien und dem Patientenalter bzw. -geschlecht, konnte hier nicht gefunden werden. Dies ist positiv zu bewerten, da eine Verzerrung der Ergebnisse durch die Alters- und Geschlechtsstruktur der Patientengruppe somit unwahrscheinlich ist.

Bedenkt man, dass vor allem nach Unterschieden zwischen Patienten mit demyelinisierenden und Patienten mit nicht-demyelinisierenden Polyneuropathien gesucht wurde, muss kritisch angemerkt werden, dass etwa zweimal mehr Patienten mit ätiologisch nicht-demyelinisierenden als mit ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien inkludiert wurden. Um mehr Patienten mit demyelinisierenden Polyneuropathien inkludieren zu können, müsste der Zeitraum der Patientenrekrutierung verlängert werden, oder die Rekrutierung auf weitere Zentren ausgedehnt werden.

Zudem setzt sich die Gruppe der 25 Patienten mit demyelinisierenden Polyneuropathien aus unterschiedlichen Subgruppen zusammen. Die größte (MMN) umfasst nur acht Patienten. Diese Heterogenität der Patientengruppen ist eine Schwäche dieser Studie.

4.3 Kontrollgruppe

Die Rekrutierung von Kontrollpersonen gestaltete sich aufgrund der, wenn auch geringen, Invasivität der Hautbiopsien protrahiert. Dies führte, verglichen mit der Patientengruppe (n = 93), letztendlich zu einer deutlich geringeren Fallzahl (n = 25) in der Kontrollgruppe.

Die Kontrollpersonen waren im Vergleich zur Patientengruppe geringfügig jünger und deutlich häufiger männlichen Geschlechts. Da in der Patientengruppe keine geschlechts- bzw. altersabhängige Verteilung der Schnürringveränderungen beobachtet wurde, waren diesbezüglich jedoch keine relevanten Verzerrungen zu erwarten.

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden nur bei 10 der 25 Kontrollpersonen (40 %) durchgeführt.

Insgesamt ergab die Auswertung der Fingerhautbiopsien der Kontrollgruppe ein recht harmonisches Bild: Nur 2 von 25 Kontrollpersonen wiesen Schnürringveränderungen auf und müssen retrospektiv als geeignete Kontrollpersonen in Frage gestellt werden. Die erste dieser beiden Kontrollpersonen war für weiterführende Diagnostik zur Abklärung einer möglicherweise noch klinisch inapparenten Polyneuropathie nicht verfügbar. Die zweite Kontrollperson wurde trotz des Vorliegens einer erektilen Dysfunktion unbekannter Ursache, also einer potentiell sogar neuropathisch bedingten Erkrankung (Podnar & Vodusek, 2015), inkludiert. Hier wären neben den vorliegenden normwertigen elektrophysiologischen Untersuchungen von Nervus medianus (motorisch) und Nervus suralis (sensibel) weitere Untersuchungen wünschenswert gewesen.

Insbesondere bei den außerklinisch rekrutierten Kontrollpersonen, wäre zusätzlich zur durchgeführten PNP-bezogenen Anamnese, die Verwendung von standardisierten Fragebögen, sowie die Durchführung von klinischen, laborchemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen sinnvoll gewesen. Dies hätte zwar absehbar zu einer geringeren Bereitschaft geführt, als Kontrollperson an dieser Studie

teilzunehmen, jedoch die Sicherheit bei der Auswahl geeigneter Kontrollpersonen deutlich erhöht.

4.4 Auswertung der Fingerhautbiopsien

4.4.1 Normale Schnürringlänge in Fingerhautbiopsien der Kontrollgruppe

Das bei der Messung der Länge von 200 Schnürringen in der MBP-Färbung wurde mit 4,25 µm ein Ergebnis erzielt, dass sich vom Ergebnis 4,3 µm aus einer früheren Untersuchung (Doppler et al., 2012) kaum unterscheidet. Dies spricht, wenigstens für diese Fragestellung, für eine geringe Interobserver-Variabilität und ist somit positiv zu bewerten.

4.4.2 Qualität und Beurteilbarkeit der prozessierten Fingerhautbiopsien

Die Inkubation der Kryoschnitte mit den Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte reproduzierbar nach etablierten Protokollen. Beim Eintauchen der Objektträger in die benötigten Lösungen, gingen vereinzelt Hautschnitte verloren. Prinzipiell können hierdurch bei betroffenen Patienten Schnürringveränderungen übersehen worden sein. Um dieses Problem zu reduzieren wurden (siehe 2.5.2) adhäsive Objektträger verwendet. Laut Hersteller wird die Adhäsion elektrostatisch durch eine permanent positive Ladung der Oberfläche erzielt. (Internetauftritt R. Langenbrinck GmbH, 02.07.2023) Eine weitere Option zur Optimierung der Haftung der Gefrierschnitte, wäre die Verwendung von silanisierten Objektträgern. (Brooks, 2012) Weiterhin sollten tatsächlich verloren gegangene Hautschnitte bestenfalls aus noch vorhandenen Biopsieresten ersetzt und nachträglich gefärbt werden.

Trotz verlustfrei und protokollgerecht durchgeführter Doppelfärbungen, konnten Schnürringe bei, je nach Färbung, 8 bis 36 Patienten, nicht dargestellt werden. Da dieser Effekt unabhängig von der Charge der Inkubation auftrat, können patientenseitige Faktoren wie z.B. eine krankheitsbedingte Reduktion der Hautinnervation, eine Rolle spielen. Hier sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden, bei welchen Patienten die durchgeführten Untersuchungen zielführend angewendet werden können und bei welchen Patienten eine Fingerhautbiopsie wegen geringer Aussicht auf Beurteilbarkeit unterbleiben sollte.

Durchschnittlich konnte je nach Färbung auf jedem 2. (Caspr-Färbung), jedem 6. (MBP-Färbung) beziehungsweise auf jedem 13. (Na-Färbung) Hautschnitt, ein

veränderter Schnürring gefunden werden. Pro Patient und pro Doppelfärbung, konnten je nach Verlusten beim Inkubationsprozess, jedoch maximal drei Hautschnitte zur Auswertung zur Verfügung. Daher ist es wahrscheinlich, dass einige Patienten mit Schnürringveränderungen nicht als solche erkannt wurden. Als Konsequenz wäre eine Erhöhung der Anzahl Hautschnitte theoretisch möglich. Diese ist praktisch jedoch durch die Größe der Proben limitiert.

4.4.2 Einleitung zur Auswertung der Färbungen und der erhobenen Daten

Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass Veränderungen der Schnürringarchitektur häufiger bei Patienten mit demyelinisierenden Polyneuropathien auftreten als bei Patienten mit axonalen Polyneuropathien und als bei Kontrollpersonen. Dies wäre biologisch plausibel, denn wenn strukturgebende Bestandteile des Paranodiums, wie Caspr und NF (E. J. Arroyo & Scherer, 2000) verändert sind und somit die leitenden Natriumkanäle nicht mehr auf eine schmale Bande gebündelt werden können, oder wenn das Myelin (MBP) vom Nodium zurückweicht, müsste die saltatorische Leitfähigkeit stark beeinträchtigt sein.

Die Eingruppierung der Patienten erfolgte unter verschiedenen Gesichtspunkten:

- Elektrophysiologie: Neurologische Befundung und Kategorisierung in demyelinisierende, axonale oder gemischte Schädigungsmuster. Zudem standen die einzelnen Messwerte zur statistischen Auswertung zur Verfügung.
- Histologie: Semidünnschnitten aus Nervus suralis Biopsien, neurologische Befundung und Kategorisierung in überwiegend demyelinisierende, überwiegend axonale und gemischte Schädigungsmuster.
- Ätiologie der PNP: Neurologische Einschätzung unter Berücksichtigung von Krankheitsverlauf, relevanten Komorbiditäten und typischen Schädigungsmustern, Kategorisierung in ätiologisch demyelinisierende und nicht-demyelinisierende PNP, jeweils mit mehreren Subgruppen.

Folgt man der Hypothese, sollte das Ergebnis der elektrophysiologischen Untersuchungen am unmittelbarsten mit den untersuchten Schnürringveränderungen in Zusammenhang stehen, da eine Auflösung der nodalen Struktur ein Verlust der schnellen Leitfähigkeit der betroffenen Nervenfasern zur Folge haben sollte, der direkt gemessen werden kann.

Die in der histologischen Routinediagnostik durchgeführten Semidünnschnitte können zwar typische Zeichen der Demyelinisierung zeigen, sie stellen jedoch als Querschnitte der Nerven überwiegend Anteile des Internodiums dar. Eine direkte Beurteilung des Nodiums, als Generator der schnellen Leitung, ist nicht zuverlässig möglich.

Einen direkten topografischen Zusammenhang zur Lokalisation der Fingerhautbiopsien haben die elektrophysiologischen Messungen, welche an verschiedenen Nerven der Extremitäten durchgeführt werden, selten und die histologischen Befunde der Nervus suralis Biopsien nie. Lediglich durch sensible Neurographien des Nervus medianus, der den Zeigefinger palmarseitig im Bereich der Biopsiestelle innerviert (Soubeyrand, Melhem, Protais, Artuso, & Crézé, 2020), können elektrophysiologisch und hautbiopsisch verschiedene Abschnitte des selben Nerven untersucht werden.

Bestimmte Ätiologien der PNP sind typischerweise mit überwiegend axonalen oder demyelinisierenden Schädigungsmustern verbunden. Es ist vorstellbar, dass unterschiedliche schädliche Einflüsse auf die betroffenen Nerven, beispielsweise durch Diabetes mellitus oder Vaskulitis, auch zu unterschiedlichen Schnürringveränderungen führen. Konkrete Modelle für solche Pathomechanismen wurden in dieser Arbeit nicht erarbeitet, somit kann die Frage nach der Verteilung der Schnürringveränderungen über unterschiedliche PNP-Ätiologien, als am wenigsten fundiert beurteilt werden.

In der Literatur wie auch in dieser Arbeit, wird das Auftreten identischer Schnürringveränderungen bei unterschiedlichen PNP-Ätiologien beschrieben. Wie weiter unten genannt, fanden sich jedoch auch schon Unterschiede. So wurden in Hautbiopsien kürzere internodale Abstände (MBP) bei der demyelinisierenden CMT1A, als bei der axonalen CMT2 beschrieben. Segmentale Demyelinisierung (MBP) konnte in Hautbiopsien von CIDP-Patienten, nicht aber in denen von CMT1A-Patienten, welche wiederum eine signifikante Verkürzung des Paranodium (Caspr) zeigten, gefunden werden. (Myers et al., 2013; Saporta et al., 2009) Dies zeigt, dass die Kategorisierung der Patienten in solche mit und ohne auffälligen Schnürringen, wie in dieser Arbeit geschehen, möglicherweise nicht differenziert genug ist. Über die Erhebung weiterer Werte (z.B. für die absolute Länge der Paranodien, Internodien und Schnürringe, oder über den Anteil der veränderten Schnürringe pro Patient) könnten weitere Unterschiede zwischen den Ätiologien herausgearbeitet werden.

Betrachtet man die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Schnürringmerkmale, sollte die Verteilung der Natriumkanäle am unmittelbarsten mit der Leitfähigkeit der

Nervenfaser in Zusammenhang stehen, da durch sie die Potentialweiterleitung stattfindet.

Grundsätzlich waren die hier durchgeführten Befundungen der Zupfnervenpräparate und der Hautbiopsien vom Eindruck des Untersuchers abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Beurteilung der Schnürringe im Konsens zwischen zwei Untersuchern. Genaue Definitionen, wann eine Färbung als auffällig zu gelten hat, müssen noch erarbeitet werden. Die enorme Anzahl der für diese Untersuchungsmethode zur beurteilenden Schnürringe und die notwendige Objektivität, könnten in Zukunft zum Einsatz von KI (künstlicher Intelligenz) -Software führen, die sich mit einer Vielzahl von Bildern Normalbefunde aneignen und im Verlauf weitere Bilder befunden kann. Dies könnte die zeitliche Effektivität und die Verlässlichkeit der Untersuchungen erhöhen.

4.4.3 Natriumkanal-Färbung

Die Intaktheit einer schmalen Natriumkanalbande im Zentrum der Ranvierschen Schnürringe ist essentiell für die saltatorische Nervenleitung. (Lonigro & Devaux, 2009)

An der Konzentration der Natriumkanäle im Zentrum des Nodiums, sind viele Strukturproteine beteiligt. Die Untersuchungen von (Lonigro & Devaux, 2009) an einem Ratten-GBS-Modell weisen darauf hin, dass viele dieser Strukturproteine Schaden nehmen müssen, bevor eine Auswirkung auf die Verteilung der Natriumkanäle zu beobachten ist. In der zitierten Studie traten entsprechende Veränderungen, z. B. doppelte/geteilte Natriumkanalbanden, erst am Gipfel des Krankheitsverlaufes auf, während Neurofascin und Gliomedin bereits in früheren, symptomärmeren Krankheitsphasen betroffen waren.

Zeitabhängig können sich spannungsgesteuerte Natriumkanäle nach segmentaler Demyelinisierung bis in para- oder juxtaparanodale Regionen ausbreiten und werden im Rahmen der Remyelinisierung wieder relokalisiert. (Edgardo J. Arroyo, Sirkowski, Chitale, & Scherer, 2004; Myers et al., 2013)

Doppelte bzw. zweigeteilten Natriumkanalbanden, wurden in der Vergangenheit ebenfalls bereits in Nervus Ischiadicus Biopsien von Trembler-J-Mäusen (Mausmodell für CMT1A mit Punktmutation des PMP22-Gens) und in Vorderhorn-Fasern von AMAN-Kaninchen (AMAN = acute motor axonal neuropathy, AMAN-Kaninchen =

Kaninchenmodell mit GM1-Antikörpern zur GBS-Simulation) beobachtet. (Devaux & Scherer, 2005; Susuki et al., 2007).

Verlängerte Natriumkanalbanden wurden in postmortal entnommenen ZNS-Gewebeproben von Patienten mit multipler Sklerose beschrieben. (Howell et al., 2006) Auch in Nervus peroneus superficialis Biopsien von CIDP-Patienten wurde bereits eine deutliche Verlängerung von Natriumkanalbanden gefunden. (Cifuentes-Diaz et al., 2011)

Keine Fehlverteilungen der nodalen Natriumkanalbanden fanden sich in einer dieser Arbeit vorausgehenden klinischen Studie mit Hautbiopsien von menschlichen PNP-Patienten (Doppler et al., 2013) und in einer Untersuchung von Hautbiopsien von CMT1A-Patienten und Normalkontrollen. (Saporta et al., 2009)

Im Rahmen dieser Arbeit waren doppelte Natriumkanalbanden signifikant häufiger bei Patienten mit elektrophysiologisch demyelinisierenden, als bei Patienten mit elektrophysiologisch axonalen Polyneuropathien zu finden. Bei keiner Kontrollperson waren die Natriumkanäle fehlverteilt. Dies kann oben erwähnte These stützen, dass eine Fehlverteilung der Natriumkanäle ein Zeichen für einen fortgeschrittenen Krankheitsverlauf mit Beeinträchtigung der saltatorischen Nervenleitung darstellt.

Alternativ wäre neben der indirekten Beeinflussung der Natriumkanäle durch die Zerstörung von Strukturproteinen der Schnürringe, auch eine direkte Beeinträchtigung der Natriumkanäle denkbar.

Autoantikörper, welche sich direkt gegen Natriumkanäle von PNP-Patienten richten, wurden diesbezüglich jedoch noch nicht identifiziert. Deren Existenz ist jedoch nicht unwahrscheinlich. Bereits 1994 konnte in einer elektrophysiologischen Untersuchung gezeigt werden, dass pathologische Lambert-Eaton-Syndrom-IgG-Autoantikörper von an kleinzelligen Lungenkarzinomen erkrankten Patienten, die primär gegen spannungsabhängige Calciumkanäle gerichtet sind, in geringerem Maße ebenfalls an spannungsabhängigen Natriumkanälen in Tumorzellen binden. (Blandino, Viglione, Bradley, Oie, & Kim, o. J.) Weiterhin konnten auch bei Patienten mit idiopathischem AV-Block, bereits Autoantikörper gegen Natriumkanäle nachgewiesen werden. (Lazzerini, Capecchi, Laghi-Pasini, & Boutjdir, 2017) Somit eröffnet sich hier ein weiteres Feld für weiterführende Untersuchungen.

4.4.4 MBP-Färbung

Die MBP-Färbung wird in Studien zur Messung der internodalen Abstände, der Schnürringlänge und als Marker für segmentale Demyelinisierung genutzt. Hierbei ist zu beachten, dass MBP nicht im Paranodium anzutreffen ist, weshalb die Schnürringlänge in dieser Färbung allein etwas überschätzt werden kann. Insgesamt seien die MBP-basierten Messergebnisse in verschiedenen Laboren verlässlich gut reproduzierbar. (Nolano et al., o. J.)

In Vorarbeiten (Myers et al., 2013; Saporta et al., 2009) wurden in Hautbiopsien kürzere internodale Abstände bei der demyelinisierenden CMT1A, als bei der axonalen CMT2 und als bei Normalkontrollen beschrieben, während segmentale Demyelinisierung nur in den Hautbiopsien von CIDP-Patienten, nicht aber in denen von CMT1A-Patienten gefunden wurde. Hieraus wurde die Hypothese eines Defekts in der Entwicklung der Schwanzzellen bei CMT1A-Patienten abgeleitet. (Myers et al., 2013) Zudem wurde darauf hingewiesen, dass der Nachweis segmentaler Demyelinisierung in Nervus suralis Biopsien, nicht aber in Hautbiopsien, auf unterschiedliche entwicklungsphysiologische und pathologische Abläufe in proximalen und distalen Nervenabschnitten hinweisen kann. (Saporta et al., 2009)

Bei der einzigen in die vorliegende Arbeit eingeschlossenen CMT1A-Patientin konnten trotz regelrechter Positivkontrollen in keiner Färbung Schnürringe ausgewertet werden. Hierfür sind zwei Ursachen denkbar. Entweder kam es zu einem unerkannten Fehler in der Verarbeitung der Hautbiopsie, oder es liegen patientenseitige Faktoren, wie eine ausgeprägte Reduktion der Hautinnervation im Biopsiegebiet vor. Letzteres kann bei der in die Studie eingeschlossenen 48-jährigen Patientin gut möglich sein, da für die CMT1A mit paralleler Zunahme von Alter und Beeinträchtigung durch die Erkrankung, eine Abnahme der intraepidermalen Nervenfaserdichte und Dichte der Meissner Korpuskel beschrieben wurde. (Hartmannsberger et al., 2020)

Bezüglich der Schnürringlänge konnten Manganelli et al. zeigen, dass diese im Vergleich zu Normalkontrollen bei allen untersuchten CMT-Patienten verlängert war, am ausgeprägtesten bei CMT1A. (Manganelli et al., 2015)

Schnürringverlängerung über 6,1 μm in der MBP-Färbung wurden weiterhin durch (Doppler et al., 2013) bei Patienten mit demyelinisierenden Polyneuropathien signifikant häufiger als bei Patienten mit axonalen Polyneuropathien und Kontrollpersonen beschrieben. Das Auftreten von verlängerten Schnürringen war unabhängig von der Art der Symptome (motorisch, sensibel) oder

elektrophysiologischer Beteiligung der Hände. In einer weiteren Vorarbeit von Doppler et al. mit 81 PNP-Patienten, 19 SFN-Patienten und 25 Kontrollen, waren Schnürringverlängerungen über 6,5 µm nicht bei Patienten mit axonalen PNP, sondern nur bei neun Patienten (21,4 %) mit demyelinisierenden PNP, welche die INCAT (= Inflammatory Neuropathy Cause And Treatment) -Kriterien erfüllten und bei drei Patienten (15,8 %) mit SFN nachweisbar. (Doppler et al., 2012)

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die MBP-Färbung hinsichtlich der Schnürringlänge ausgewertet. Die hierfür bestimmte (siehe 4.3.3) normale Schnürringlänge von 4,25 µm, entsprach weitgehend den in der Literatur beschriebenen Werten. Schnürringverlängerungen über 7,5 µm, was der bestimmten normalen Schnürringlänge plus zwei Standardabweichungen entsprach, lagen bei etwa 58,5 % der Patienten vor, unabhängig davon, ob elektrophysiologisch eine axonale oder demyelinisierende Polyneuropathie diagnostiziert worden war. Auch zu einzelnen elektrophysiologischen Messwerten, bestand kein statistischer Zusammenhang.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von (Doppler et al., 2013) wurden in identischen Hautbiopsien, sowohl verlängerte, als auch normale Schnürringe gefunden.

Der Nachweis von Schnürringverlängerungen bei zwei Kontrollpersonen im Rahmen dieser Arbeit, wurde bereits unter 4.2 diskutiert.

4.4.5 Caspr-Färbung

Caspr ist im Paranodium an der Schwanzzell-Axon-Verbindung und somit an der elektrischen Isolation des Nodiums beteiligt. (Myers et al., 2013)

In dieser Arbeit wurden disperse von normalen Schnürringen in der Caspr-Färbung unterschieden. Bei einer Dispersion von Caspr, ist die Färbung nicht klar auf das Paranodium begrenzt, sondern unscharf auf das Internodium ausgedehnt.

Eine solche Dispersion wurde bereits in mehreren Vorarbeiten beschrieben und konnte zum Beispiel in Biopsien aus dem Vorderhorn von klinisch fortgeschritten betroffenen Tieren eines Kaninchen-GBS-Modells gefunden werden. In den betroffenen Schnürringen, war auch die Organisation der Natriumkanalbande aufgehoben. (Susuki et al., 2007)

In einem Rattenversuch wurde Lysolethicin in den N. ischiadicus der betäubten Tiere injiziert, um eine Demyelinisierung des Nervs auszulösen. In den nach einigen Tagen angefertigten Zupfnervenpräparaten, wurde eine Dispersion von Caspr beobachtet. (Edgardo J. Arroyo et al., 2004)

Weiterhin gelang (Li et al., 2005) der Nachweis einer Dispersion von Caspr in Hautbiopsien (Finger, Unterarm) von CMT1A-Patienten.

Von Doppler et al. wurde ein häufigeres Vorkommen einer Dispersion von Caspr bei Patienten mit demyelinisierenden Polyneuropathien im Vergleich zu Patienten mit axonalen Polyneuropathien und zu Normalkontrollen beschrieben. (Doppler et al., 2013)

Zudem wurden durch (Doppler et al., 2015) bereits Autoantikörper gegen Caspr nachgewiesen. Die betroffenen Patienten wiesen in Haut- und Nervenbiopsien erhebliche Veränderungen, von der Dispersion bis hin zur Zerstörung der Paranodien auf.

Zusätzlich zu der oben beschriebenen qualitativen Untersuchungsmethode, ist auch die Längenmessung beider Hemiparanodien eines Schnürrings möglich. Neben der absoluten Länge, kann so auch der Grad der Asymmetrie, als Merkmal einer stattgehabten De- und Remyelinisierung, bestimmt werden. (Myers et al., 2013)

So konnte für CMT1A-Patienten bereits eine signifikante Verkürzung des Paranodiums und für CMT1A- und auch CIDP-Patienten ein leicht, aber dennoch signifikant erhöhter Asymmetrie-Index im Vergleich zu Normalkontrollen gefunden werden. (Saporta et al., 2009)

Auch in dieser Arbeit, fand sich eine Dispersion von Caspr signifikant häufiger bei Polyneuropathie-Patienten als bei Kontrollpersonen. Ein vermehrtes Auftreten von dispersen Schnürringen in der Caspr-Färbung bei einzelnen PNP-Ätiologien oder bei elektrophysiologisch demyelinisierenden PNP konnte nicht beobachtet werden.

Durch die Längenmessung der Hemiparanodien, hätte die Befunderhebung in dieser Studie weiter objektiviert und mit anderen Arbeiten vergleichbar gemacht werden können. Zudem wäre die Doppelfärbung Natriumkanäle / Caspr interessant, um die Auswirkung einer Dispersion von Caspr auf die Verteilung der Natriumkanalbande des betroffenen Schnürringes zu beobachten.

4.4.6 Neurofascin-Färbung

Mit der Pan-Neurofascin-Färbung werden in gesunden Kontrollpersonen das Nodium, wo die NF186-Isoform lokalisiert ist, und die NF155-Isoform am Paranodium angefärbt. Neurofascin ist an der saltatorischen Nervenleitung beteiligt, indem es dazu beiträgt, die Lateraldiffusion der Natriumkanäle ins Internodium und das Driften der juxtaparanodalen Kaliumkanäle ins Nodium zu verhindern. Es wurden bereits Subtypen der CIDP mit anti-NF155 und anti-NF186 Antikörpern mit spezifischen klinischen Charakteristika beschrieben. (Gao, Kong, Liu, Liu, & Zhu, 2021) Auch (Martín-Aguilar et al., 2022) beschreiben eine anti-NF155-Nodopathie mit spezifischem Phänotyp und Ansprechen auf Rituximab. Die hier untersuchte Dispersion von Neurofascin, wurde durch (Doppler et al., 2013) signifikant häufiger bei Patienten mit demyelinisierenden PNP als bei Patienten mit axonalen PNP und als bei Normalkontrollen gefunden. Insgesamt wurden in dieser zitierten Studie bei 19 von 68 Studienteilnehmern, also bei 27,9 % der Studienteilnehmer, disperse Schnürringe gefunden, was in deutlichem Gegensatz zum Nachweis nur einer einzigen Studienteilnehmerin mit Dispersion von NF in dieser Arbeit steht.

Eine Dispersion von NF wurde auch in Vorderhornzellen von, zur Herstellung eines GBS-Modelles gegen peripheres Myelin immunisierten Ratten, gefunden. Hier kam man zu dem Schluss, dass die Dispersion von Neurofascin der Störung der Natriumkanalbanden vorausgeht, also in einem früheren Krankheitsstadium auftritt. Dies unterstreicht die Rolle von weiteren nodalen und paranodalen Proteinen, welche die Struktur der Ranvierschen Schnürringe mit aufrechterhalten. (Lonigro & Devaux, 2009)

4.4.7 Internodopathien, Paranodopathien, Nodopathien

In vielen verlängerten Schnürringen fanden sich normale Natriumkanalbanden. Auch viele Patienten mit dispersen Schnürringen in der Caspr-Färbung, zeigten in der Na-Färbung normale Natriumkanalbanden. Dies stützt die oben genannte Hypothese, dass eine intakte saltatorische Leitfähigkeit vor allem auf einer physiologischen Lokalisation der an der Potentialweiterleitung beteiligten Ionenkanäle basiert und das zunächst mehrere Strukturproteine des nodalen Komplexes beeinträchtigt sein müssen, bevor es zu einer Dislokation der Ionenkanäle kommt.

Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass reine Nodopathien, in der elektrophysiologischen Diagnostik Schädigungsmuster aufweisen können, die üblicherweise als Folge einer Demyelinisierung der Nervenfasern interpretiert werden.

Diese Beobachtung finden sich auch in der aktuellen Leitlinie zur Diagnostik bei Polyneuropathien wieder. Hier heißt es „Der Begriff der autoimmunen Nodopathien gewinnt zunehmend an Bedeutung (2, 45, 46). Mit dem Nachweis von Antikörpern gegen Moleküle des nodalen/paranodalen Komplexes (NF155, NF186, Contactin-1, Caspr1) werden neue Einsichten in die Pathogenese von bestimmten Autoimmunneuropathien, die histologisch keine segmentale Demyelinisierung, aber elektrophysiologische „demyelinisierende“ Charakteristika aufweisen, gewonnen. Dies kann aber durch den paranodalen Befall erklärt werden.“ (Heuß, D. et al, 2019)

4.5 Auswertung der Zupfnerven

Bei 27 der 93 hautbiopsierten Patienten wurden aus der für die histopathologische Untersuchung (Semidünnschnitte) bestimmten Nervus suralis Biopsie ebenfalls Zupfnervenpräparate angefertigt und analog zur Prozessierung der Hautschnitte mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Auftreten von Schnürringveränderungen in den Zupfnerven und dem Auftreten von Zeichen der Demyelinisierung in der histologischen Routinediagnostik (Semidünnschnitte) fand sich in dieser Arbeit nicht. Dies stützt die oben diskutierte These, dass pathologische Prozesse am Schnürring unabhängig von der internodalen Bemerkung stattfinden können und als eigenständige Entität betrachtet werden sollten.

Unter den Patienten, von denen sowohl verwertbare Fingerhautbiopsien als auch verwertbare Zupfnervenpräparate vorlagen, gab es keinen Patienten, bei dem alle untersuchten Schnürringmerkmale in Fingerhautbiopsie und Zupfnerven identisch ausgeprägt waren. Bei der Betrachtung einzelner Schnürringmerkmale zeigte sich das höchste Maß an Übereinstimmung der Ergebnisse von Fingerhautbiopsien und Zupfnervenpräparaten bei der Natriumkanalfärbung. Hier gab es sechs Patienten (von neun Patienten mit auswertbaren Färbungen in beiden Modalitäten) die sowohl in den Fingerhautbiopsien als auch in den Zupfnervenpräparaten normale Natriumkanalbanden zeigten. Bei den übrigen drei Patienten fanden sich gegensätzliche Resultate. Einschränkend muss hier berichtet werden, dass von den

neun auswertbaren Patienten, lediglich bei einem Patienten Schnürringveränderungen der Natriumkanalbanden in den Fingerhautbiopsien gefunden wurden, so dass hier nicht von repräsentativen Zahlen ausgegangen werden kann.

Folglich können auf Grundlage der hier erhobenen Daten dieselben Schnürringmerkmale in Fingerhautbiopsien und Nervenbiopsien untersucht werden. Die in Fingerhautbiopsien und Nervenbiopsien gefundenen Veränderungen entsprechen sich jedoch nicht.

In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen berichteten (Saporta et al., 2009) bereits bei einer Untersuchung von CMT1A-Patienten vom Nachweis segmentaler Demyelinisierung in Nervus suralis Biopsien, nicht aber in Hautbiopsien.

Auch in der grundlegenden Arbeit von (Li et al., 2005), wurde bereits auf einige Unterschiede zwischen Haut- und Nervenbiopsien hingewiesen. Demnach enthalten Hautbiopsien vor allem kleinkalibrige myelinisierte Axone mit internodalen Abständen von etwa 70 µm, während der Nervus suralis auch dicker myelinisierte Axone führt und größere (400 – 1000 µm) internodale Abstände vorliegen. Mit dem Fehlen dick myelinisierter Axone in Hautbiopsien, wurde auch das Fehlen von Zwiebelschalenformationen in Hautbiopsien von CMT1A-Patienten erklärt, da diese eben vor allem an dick myelinisierten Fasern zu finden seien.

Die Beobachtung von (Herrmann, Griffin, Hauer, Cornblath, & McArthur, 1999), dass ein Zusammenhang der IENFD von Unterschenkelhautbiopsien und der Dichte der myelinisierten Fasern in Zupfnervenpräparaten von Nervus suralis Biopsien besteht, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht, erscheint aber trotz der gefundenen Unterschiede im Nachweis von Schnürringveränderungen in Haut- und Nervenbiopsien, plausibel.

Ursächlich für die unterschiedlichen Befunde in Fingerhautbiopsien und Zupfnerven in dieser Arbeit, können viele Faktoren, eine Rolle spielen. Die folgende **Tabelle 15** soll einen Überblick über Unterschiede von Fingerhaut- und Nervenbiopsien geben.

Tabelle 15: Relevante Unterschiede, die beim Vergleich von Fingerhautbiopsien und Zupfnervenpräparaten aus Nervus suralis Biopsien, gewürdigt werden sollten:	
Fingerhautbiopsie	Nervus suralis Biopsie
Überwiegend dünn myelinisierte Axone	Auch dick myelinisierte Axone
Kürzere internodale Abstände (Li et al., 2005)	Längere internodale Abstände (Li et al., 2005)
auch efferente Fasern zu dermalen ekkrinen Schweißdrüsen	ausschließlich afferente Fasern
Einzelne intrakutane Axone der oberen Extremität, im Vergleich distaler	großer subfasziärer Nerv der unteren Extremität, im Vergleich proximaler
mechanische Beanspruchung im Alltag, ggf. auch abhängig von Händigkeit	kaum mechanische Beanspruchung
Biopsiertes Areal vom klinischen Befallsmuster betroffen?	Biopsiertes Areal vom klinischen Befallsmuster betroffen?
Biopsie in Lokalanästhesie (alkalisch)	Keine lokale Umflutung an Biopsiestelle

4.6 Hautbiopsien zur Untersuchung myelinisierter Axone

Hautbiopsien zur Untersuchung von myelinisierten Fasern werden oft mit Stanzen von zwei bis fünf Millimetern Durchmesser durchgeführt. An Fingern besteht prinzipiell das Risiko der Verletzung des ipsilateralen Gefäß-Nervenbündels, weiterhin kann es zu allergischen Reaktionen auf das Lokalanästhetikum, Infektionen, Nachblutungen und Narbenbildung kommen. Aufgrund der geringen Eindringtiefe und Ausdehnung der verursachten Wunden, sind Komplikationen jedoch selten. (Myers et al., 2013) Nach Abschluss der Wundheilung, ist prinzipiell wieder eine Biopsie an derselben Stelle möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden über 120 Personen hautbiopsiert, Komplikationen wurden nicht beobachtet.

Die internodale Länge von Nervenfasern nimmt nach distal ab, weshalb in Hautbiopsien durchaus Nervenfaserschnitte mit mehreren Schnürringen beobachtet werden können und somit neben der Messung der internodalen Länge auch die Suche nach segmentaler Demyelinisierung möglich ist. (Saporta et al., 2009) Neben den oben beschriebenen Färbungen sind viele weitere Untersuchungen möglich. So kann beispielsweise die Dichte von Meissner Tastkörperchen als Marker für Axonverlust herangezogen werden. (Manganelli et al., 2015; Saporta et al., 2009) Zur Bestimmung der IENFD wird das axonale PGP 9.5 angefärbt. (Myers et al., 2013)

Auch die Lokalisation von Immunzellen im Bezug zur Nervenfasern kann bestimmt werden. (Susuki, 2013)

Laut (Myers et al., 2013) sei es denkbar, dass der Nachweis von Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien seltener gelingt, wenn die obere Extremität weniger von den PNP-Symptomen betroffen ist. In Untersuchungen mit CMT-Patienten und Patienten mit diabetischer PNP, konnten jedoch auch bei nur minimaler klinischer Beteiligung der Hände, pathologische Schnürringveränderungen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung steht wieder im Einklang mit der oben beschriebenen Hypothese, dass Schnürringveränderungen zunächst ohne klinische Symptome im Innervationsgebiet auftreten können. Diese folgen mutmaßlich, sobald die saltatorische Leitfähigkeit durch den Strukturverlust im Bereich der Schnürringe beeinträchtigt wird.

Die Untersuchung von rasterartig verteilten Hautbiopsien derselben Person wären interessant, um die Häufigkeit von Schnürringveränderungen in Abhängigkeit von nervalen Innervationsgebieten und Befallsmustern und somit optimale Biopsiestellen für zukünftige Untersuchungen bestimmen zu können. Fingerhaut verspricht prinzipiell eine hohe Nervenfaserdichte. In der SFN-Diagnostik sind Hautbiopsien bereits fest etabliert. (Heuß, D. et al, 2019) Insbesondere bei längenabhängigen Small Fiber Neuropathien, kann diese jedoch auch hier so stark reduziert sein, dass keine Schnürringe mehr ausgewertet werden können. (Doppler et al., 2012; Griffin, McArthur, & Polydefkis, 2001). In dieser Arbeit konnten bei einer Patientin mit CMT1A, bei einem Patienten mit diabetischer PNP und bei einem Patienten mit idiopathischer PNP, trotz regelrechten Positivkontrollen in keiner Färbung der Fingerhautbiopsien Schnürringe gefunden werden. Dies entspricht einem Anteil etwa 3,2 % der Patientengruppe. Jede Kontrollperson wies beurteilbare Schnürringe auf.

Prinzipiell wären auch Hautstanzbiopsien im Bereich der ebenfalls gut innervierten und von neuropathischen Erkrankungen häufig betroffenen Zehen denkbar. Gerade bei Diabetikern oder Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit, müsste die Indikation aufgrund zu erwartender Wundheilungsstörungen jedoch sicherlich sehr streng gestellt werden. Auch die Reihenuntersuchungen im zeitlichen Verlauf, wie von Lonigro & Devaux, 2009 (Lonigro & Devaux, 2009) am Tiermodell durchgeführt, wären wünschenswert um weitere Erkenntnisse zu erlangen.

Zusammenfassend haben Hautbiopsien ein erhebliches bereits genutztes und noch zu erschließendes Potential bei der Untersuchung myelinisierter Nervenfasern.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde durch das immunhistochemische Anfärben von nodalen (Natriumkanäle, NF), paranodalen (Caspr, NF) und internodalen (MBP) Proteinen der in Fingerhautbiopsien vorhandenen Nervenfasern untersucht, ob eine Veränderung der typischen Verteilungsmuster dieser Proteine, eine demyelinisierende Polyneuropathie anzeigen kann. Dazu wurden am Universitätsklinikum Würzburg prospektiv 93 Polyneuropathie-Patienten und 25 Kontrollpersonen rekrutiert. Bei allen Patienten wurden Hautstanzbiopsien am Zeigefinger durchgeführt. Bei 35 Patienten mit schweren oder unklaren Verläufen, wurden konsiliarisch Nervus suralis Biopsien durchgeführt. Aus einem Abschnitt von 27 dieser Biopsien, konnten im Rahmen dieser Arbeit Zupfnervenpräparate angefertigt und analog zu den Hautbiopsien ausgewertet werden. Aus der Routinediagnostik der Klinik flossen weiterhin die Ergebnisse der elektrophysiologischen Routinediagnostik und der Histologiebefund der Nervus suralis Biopsien in die Auswertung ein.

Zusammenfassend kamen veränderte Natriumkanalbanden in Fingerhautbiopsien signifikant häufiger bei Patienten mit elektrophysiologisch als demyelinisierend befundenen Polyneuropathien, als bei Patienten mit elektrophysiologisch als axonal befundenen Polyneuropathien vor. Vielfach fanden sich veränderte Natriumkanalbanden inmitten para- und internodal unauffälliger Schnürringe und umgekehrt. Diese Beobachtung stützt die bereits in Vorarbeiten vorgeschlagene und in der aktuellen Leitlinie zur Diagnostik für Polyneuropathien aufgegriffene Entität der Paranodopathien (Uncini, Susuki, & Yuki, 2013). Möglich wäre, dass eine veränderte Verteilung der Natriumkanäle die schnelle Leitfähigkeit beeinträchtigen und somit trotz intakter Bemerkung, elektrophysiologisch das Bild einer demyelinisierenden Neuropathie vermittelt. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von doppelten und verlängerten Natriumkanalbanden und einzelnen Messwerten (z.B. Amplituden und Latenzzeiten) fand sich nicht. Auch in den Zupfnervenpräparaten der Nervus suralis Biopsien, konnten o.g. Verteilungsmuster untersucht werden. Deren Vorkommen zeigte sich als unabhängig vom elektrophysiologischen und histologischen Befund, von der Ätiologie der PNP und von den gefundenen Veränderungen in den Hautbiopsien des betreffenden Patienten.

6 Appendix

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung (teilweise übersetzt)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µV	Mikrovolt
A	Amplitude
Abb.	Abbildung
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AIDP	akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikulopathie
AMAN	akute motorische axonale Neuropathie
ANA	antinukleäre Antikörper
AV-Block	atrioventrikulärer Block
b.	bei
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM	Zelladhäsionsmolekül
Caspr	Contactin assoziiertes Protein, Marker für das Paranodium
CIDP	chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
cm	Zentimeter
CMT	Morbus Charcot-Marie-Tooth
Cutasept® F	F = farblos
DADS	distal acquired demyelinating symmetric neuropathy
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	Differentialdiagnose
dist.	distal
dmL	distale motorische Latenz
DNFL	dermale Nervenfaserlänge
Dr. med.	Doktor der Medizin
Fa.	Firma

FBS	fetales Rinderserum
FCS	fetales Kälberserum
F-Latenz	Latenzzeit der F-Welle
F-Persistenz	Auslösbarkeit der F-Welle [%]
F-Welle	(der M-Welle) folgende Welle
g	Gramm
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
ges.	gesamt
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid 1
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HNPP	hereditäre Neuropathie mit Neigung zu Druckpareesen
HSMN	hereditäre sensible und motorische Neuropathie
IBM	International Business Machines
IENFD	intraepidermale Nervenfaserdichte
IgA/D/E/G/M	Immunglobulin A / D / E / G / M
INCAT	inflammatory neuropathy cause and treatment
IVIG	intravenöse Immunglobuline
KCNQ2	zweiter Kaliumkanal der spannungsabhängigen Subfamilie Q
KI	künstliche Intelligenz
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
l	Liter
LGI1	leucine-rich, glioma-inactivated 1 (ein Protein)
M	Molar = mol/l
m	Meter
MADSAM	multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Polyneuropathie
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MBP	basisches Myelin Protein
mg	Milligramm
MGUS	monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
miRNA	mikro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
M., Mm.	Musculus, Musculi
MMN	multifokale motorische Neuropathie
mol	Einheit der Stoffmenge Mol mit $6,02214076 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mot.	motorisch
m/s	Meter pro Sekunde
MSAP	Muskelsummenaktionspotential, auch M-Welle
mV	Millivolt

M-Welle	siehe MSAP
n	Größe der Stichprobe
N., Nn.	Nerv, Nerven
Na	Natrium
NaV	spannungsabhängiger Natriumkanal
NF	Neurofascin, hier: Neurofascin 155 und 186
NGS	normales Ziegenserum
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
nm	Nanometer
NRCAM	neuronaies Zelladhäsionsmolekül
NSVN	nicht systemische Vaskulitis der peripheren Nerven
p	Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen der Nullhypothese
PAP-Pen	Peroxidase-Antiperoxidase-Stift
Pat.	Patient(en), Patientin(nen)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehydlösung zur Gewebefixierung durch Proteinvernetzung
PGP9.5	Proteingenprodukt 9.5
pH	pondus Hydrogenii
PMP22	peripheres Myelinprotein 22
PNP	Polyneuropathie(n)
PNS	Peripheres Nervensystem
POEMS	Polyneuropathie, Organomegalie, Endokrinopathie, monoklonale Gammopathie, Hautveränderungen (englisch: skin lesions)
Priv.-Doz.	Privatdozentin
Prof.	Professor
prox.	proximal
PSD	postsynaptisches Dichteprotein
s	Sekunde
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2
SD	Standardabweichung
sens.	sensibel
SFN	Small Fiber Neuropathie(n)
SNAP	sensibles Nervenaktionspotenzial
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Tab.	Tabelle
T-Zelle	Thymus-Zelle
u.	und
V. a.	Verdacht auf

VGKC	voltage gated potassium channel
x	mal
Z. n.	Zustand nach
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1, Seite 29	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Anti-MBP und Anti-Caspr
Abb. 2, Seite 30	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Anti-MBP und Anti-NF
Abb. 3, Seite 31	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Anti-MBP und Anti-Pan-Na-Kan
Abb. 4, Seite 40	Beispielbefunde für die Bildmorphologie der Graphen von elektrophysiologisch axonalen bzw. demyelinisierenden Messergebnissen

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1, Seite 21	Primärantikörper und ihre Verdünnung
Tab. 2, Seite 21	Sekundärantikörper und ihre Verdünnung
Tab. 3, Seite 22	angesetzte Lösungen
Tab. 4, Seite 23	weitere industriell bezogenen Produkte
Tab. 5, Seite 33	Schnürringveränderungen in den Fingerhautbiopsien von Patienten und Kontrollpersonen
Tab. 6, Seite 37	Schnürringveränderungen in Zupfnerven je nach Befund der histologischen Routinediagnostik
Tab. 7, Seite 38	Übereinstimmung der Schnürringveränderungen in Hautbiopsien und Zupfnervenpräparaten
Tab. 8, Seite 42	Vergleich der durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeiten von Patienten mit und ohne Schnürringveränderungen
Tab. 9, Seite 43	Vergleich der durchschnittlichen Amplituden von Patienten mit und ohne Schnürringveränderungen
Tab. 10, Seite 44	Vergleich der durchschnittlichen Latenzzeiten von Patienten mit und ohne Schnürringveränderungen
Tab. 11, Seite 45	Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien je nach elektrophysiologischer Diagnose
Tab. 12, Seite 46	Schnürringveränderungen in Zupfnerven je nach elektrophysiologischer Diagnose
Tab. 13, Seite 51	Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien bei ätiologisch demyelinisierenden Polyneuropathien
Tab. 14, Seite 52	Schnürringveränderungen in Fingerhautbiopsien bei ätiologisch <u>nicht</u> demyelinisierenden Polyneuropathien
Tab. 15, Seite 66	Relevante Unterschiede, die beim Vergleich von Fingerhautbiopsien und Zupfnervenpräparaten aus Nervus suralis Biopsien, gewürdigt werden sollten

6.4 Literaturverzeichnis

- Arroyo, E. J., & Scherer, S. S. (2000). On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochemistry and Cell Biology*, 113, 0001.
- Arroyo, Edgardo J., Sirkowski, E. E., Chitale, R., & Scherer, S. S. (2004). Acute demyelination disrupts the molecular organization of peripheral nervous system nodes. *The Journal of Comparative Neurology*, 479, 424–434.
- Bischoff, C. (2008). EMG · NLG. In *EMG · NLG* (2., aktualisierte Auflage). Thieme Verlag.
- Bischoff, C., Schulte-Mattler, W. J., & Conrad, B. (Hrsg.). (2005). 3. Neurographie. In *Das EMG-Buch* (2., vollständig überarbeitete Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Blandino, J. K. W., Viglione, M. P., Bradley, W. A., Oie, H. K., & Kim, Y. I. (o. J.). *Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: Role in action potentials and inhibition by lambert-eaton syndrome IgG*. 11.
- Bremer, J., O'Connor, T., Tiberi, C., Rehrauer, H., Weis, J., & Aguzzi, A. (2010). Ablation of Dicer from Murine Schwann Cells Increases Their Proliferation while Blocking Myelination. *PLoS ONE*, 5, e12450.
- Bril, V., Blanchette, C. M., Noone, J. M., Runken, M. C., Gelinis, D., & Russell, J. W. (2016). The dilemma of diabetes in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 30, 1401–1407.
- Brooks, S. A. (2012). Basic Immunocytochemistry for Light Microscopy. In M. Dwek, S. A. Brooks, & U. Schumacher (Hrsg.), *Metastasis Research Protocols* (S. 1–30). Totowa, NJ: Humana Press.
- Carlson, J. A., & Chen, K.-R. (2006). Cutaneous Vasculitis Update: Small Vessel Neutrophilic Vasculitis Syndromes. *The American Journal of Dermatopathology*, 28, 486–506.

- Ceuterick-de Groote, C., De Jonghe, P., De Jonghe, P., Timmerman, V., Van Goethem, G., Löfgren, A., ... Martin, J.-J. (2001). Infantile Demyelinating Neuropathy Associated with a de novo Point Mutation on Ser72 in PMP22 and Basal Lamina Onion Bulbs in Skin Biopsy. *Pathology - Research and Practice*, 197, 193–198.
- Cifuentes-Diaz, C., Dubourg, O., Irinopoulou, T., Vigny, M., Lachkar, S., Decker, L., ... Girault, J.-A. (2011). Nodes of Ranvier and Paranodes in Chronic Acquired Neuropathies. *PLoS ONE*, 6, e14533.
- Devaux, J., & Scherer, S. (2005). Altered Ion Channels in an Animal Model of Charcot-Marie-Tooth Disease Type IA. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 1470–1480.
- DGN. (2012). *Diagnostik bei Polyneuropathien*.
- Dimachkie, M. M., & Barohn, R. J. (2013). Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy. *Current Treatment Options in Neurology*, 15, 350–366.
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Wilhelmi, K., Villmann, C., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., ... Sommer, C. (2015). Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 86, 720–728.
- Doppler, K., Werner, C., Henneges, C., & Sommer, C. (2012). Analysis of myelinated fibers in human skin biopsies of patients with neuropathies. *Journal of Neurology*, 259, 1879–1887.
- Doppler, K., Werner, C., & Sommer, C. (2013). Disruption of nodal architecture in skin biopsies of patients with demyelinating neuropathies. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 18, 168–176.
- Gao, Y., Kong, L., Liu, S., Liu, K., & Zhu, J. (2021). Impact of Neurofascin on Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy via Changing the Node of Ranvier Function: A Review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 779385.

- Garrett, A., & Geiger, Z. (2020). Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb, Superficial Peroneal (Fibular) Nerve. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Gemignani, F., Bellanova, M. F., Sacconi, E., & Pavesi, G. (2022). Non-length-dependent small fiber neuropathy: Not a matter of stockings and gloves. *Muscle & Nerve*, 65, 10–28.
- Griffin, J. W., McArthur, J. C., & Polydefkis, M. (2001). Assessment of cutaneous innervation by skin biopsies: *Current Opinion in Neurology*, 14, 655–659.
- Hameed, S., & Cascella, M. (2020). Multifocal Motor Neuropathy (MMN). In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Hanemann, C. O., & D'Urso, D. (2000). *Mutation-dependent alteration in cellular distribution of peripheral myelin protein 22 in nerve biopsies from Charcot–Marie–Tooth type 1A*. 6.
- Hartmannsberger, B., Doppler, K., Stauber, J., Schlotter-Weigel, B., Young, P., Sereda, M. W., & Sommer, C. (2020). Intraepidermal nerve fibre density as biomarker in Charcot–Marie–Tooth disease type 1A. *Brain Communications*, 2, fcaa012.
- Herold, Gerd und Mitarbeiter. (2017). *Innere Medizin 2017*. Köln: Dr. Gerd Herold.
- Herrmann, D. N., Griffin, J. W., Hauer, P., Cornblath, D. R., & McArthur, J. C. (1999). Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. *Neurology*, 53, 1634–1634.
- Heuß, D. et al. (2019). *Diagnostik bei Polyneuropathien, S1-Leitlinie, 2019*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.).
- Howell, O. W., Palser, A., Polito, A., Melrose, S., Zonta, B., Scheiermann, C., ... Reynolds, R. (2006). Disruption of neurofascin localization reveals early changes preceding demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, 129, 3173–3185.

- Hughes, R. A. C., Swan, A. V., Raphael, J.-C., Annane, D., van Koningsveld, R., & van Doorn, P. A. (2007). Immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: A systematic review. *Brain*, *130*, 2245–2257.
- Im, J.-H., Lee, J.-Y., Yeon, W.-H., Lee, M.-K., & Chung, Y.-G. (2020). The anatomy of the saphenous and sural nerves as a source of processed nerve allografts. *Cell and Tissue Banking*, *21*, 547–555.
- Internetauftritt R. Langenbrinck GmbH. (2023, Juli 2). Abgerufen 2. Juli 2023, von <https://www.langenbrinck.com/artikeldetails.aspx?WPPParams=50C9D4C6C5D2E6BDA5A98396A9>
- Karlsson, P., Porretta-Serapiglia, C., Lombardi, R., Jensen, T. S., & Lauria, G. (2013). Dermal innervation in healthy subjects and small fiber neuropathy patients: A stereological reappraisal: Karlsson. *Journal of the Peripheral Nervous System*, *18*, 48–53.
- Koop, L. K., & Tadi, P. (2020). Neuroanatomy, Sensory Nerves. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Lauria, G., Hsieh, S. T., Johansson, O., Kennedy, W. R., Leger, J. M., Mellgren, S. I., ... Valls-Solé, J. (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. *European Journal of Neurology*, *17*, 903-e49.
- Lazzerini, P. E., Capecchi, P. L., Laghi-Pasini, F., & Boutjdir, M. (2017). Autoimmune channelopathies as a novel mechanism in cardiac arrhythmias. *Nature Reviews Cardiology*, *14*, 521–535.
- Li, J., Bai, Y., Ghandour, K., Qin, P., Grandis, M., Trostinskaia, A., ... Shy, M. E. (2005). Skin biopsies in myelin-related neuropathies: Bringing molecular pathology to the bedside. *Brain*, *128*, 1168–1177.

- Liu, B., Xin, W., Tan, J.-R., Zhu, R.-P., Li, T., Wang, D., ... He, T.-C. (2019). Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*, 22347–22352.
- Lonigro, A., & Devaux, J. J. (2009). Disruption of neurofascin and gliomedin at nodes of Ranvier precedes demyelination in experimental allergic neuritis. *Brain*, *132*, 260–273.
- Luigetti, M., Di Paolantonio, A., Bisogni, G., Romano, A., Conte, A., Barbato, F., ... Sabatelli, M. (2020). Sural nerve biopsy in peripheral neuropathies: 30-year experience from a single center. *Neurological Sciences*, *41*, 341–346.
- Manganelli, F., Nolano, M., Pisciotta, C., Provitera, V., Fabrizi, G. M., Cavallaro, T., ... Santoro, L. (2015). Charcot-Marie-Tooth disease: New insights from skin biopsy. *Neurology*, *85*, 1202–1208.
- Martín-Aguilar, L., Lleixà, C., Pascual-Goñi, E., Caballero-Ávila, M., Martínez-Martínez, L., Díaz-Manera, J., ... Querol, L. (2022). Clinical and Laboratory Features in Anti-NF155 Autoimmune Nodopathy. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, *9*, e1098.
- Meuth, S. G., & Kleinschnitz, C. (2010). Multifocal Motor Neuropathy: Update on Clinical Characteristics, Pathophysiological Concepts and Therapeutic Options. *European Neurology*, *63*, 193–204.
- Moss, K. R., Bopp, T. S., Johnson, A. E., & Höke, A. (2021). New evidence for secondary axonal degeneration in demyelinating neuropathies. *Neuroscience Letters*, *744*, 135595.
- Myers, M. I., Peltier, A. C., & Li, J. (2013). Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy: Review of Dermal Myelinated Fibers. *Muscle & Nerve*, *47*, 1–11.
- Nguyen, T. P., & Chaudhry, V. (2011). Multifocal motor neuropathy. *Neurology India*, *59*, 700.

- Nobile-Orazio, E., Giannotta, C., Musset, L., Messina, P., & Léger, J.-M. (2014). Sensitivity and predictive value of anti-GM1/galactocerebroside IgM antibodies in multifocal motor neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *85*, 754–758.
- Nolano, M., Provitera, V., Crisci, C., Stancanelli, A., Kennedy, W. R., & Santoro, L. (o. J.). *Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin*.
- Ogawa, Y., Oses-Prieto, J., Kim, M. Y., Horresh, I., Peles, E., Burlingame, A. L., ... Rasband, M. N. (2010). ADAM22, A Kv1 Channel-Interacting Protein, Recruits Membrane-Associated Guanylate Kinases to Juxtaparanodes of Myelinated Axons. *The Journal of Neuroscience*, *30*, 1038–1048.
- Ogawa, Y., Schafer, D. P., Horresh, I., Bar, V., Hales, K., Yang, Y., ... Rasband, M. N. (2006). Spectrins and AnkyrinB Constitute a Specialized Paranodal Cytoskeleton. *The Journal of Neuroscience*, *26*, 5230–5239.
- Osen, K. K., Furness, D. N., & Hackney, C. M. (2011). The border between the central and the peripheral nervous system in the cat cochlear nerve: A light and scanning electron microscopical study. *Hearing Research*, *277*, 44–53.
- Pinatel, D., & Faivre-Sarrailh, C. (2020). Assembly and Function of the Juxtaparanodal Kv1 Complex in Health and Disease. *Life*, *11*, 8.
- Podnar, S., & Vodusek, D. B. (2015). Sexual dysfunction in patients with peripheral nervous system lesions. *Handbook of Clinical Neurology*, *130*, 179–202.
- Ramineni, K., Chandra, S., Mahadevan, A., Kulkarni, G., & Ramanujam, Cn. (2019). Clinical, electrophysiological and laboratory parameters, and outcome in patients with biopsy proven systemic and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology India*, *67*, 62.
- Rasband, M. N. (2010). CLUSTERED K⁺ CHANNEL COMPLEXES IN AXONS. *Neuroscience letters*, *486*, 101–106.

- Rasband, M. N. (2011). COMPOSITION, ASSEMBLY, AND MAINTENANCE OF EXCITABLE MEMBRANE DOMAINS IN MYELINATED AXONS. *Seminars in cell & developmental biology*, 22, 178–184.
- Rasband, M. N., & Peles, E. (2016). The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020495>
- Rison, R. A., & Beydoun, S. R. (2016). Paraproteinemic neuropathy: A practical review. *BMC Neurology*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0532-4>
- Ropper, A. H. (1992). The Guillain-Barré-Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 1130.
- Saporta, M. A., Katona, I., Lewis, R. A., Masse, S., Shy, M. E., & Li, J. (2009). Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain*, 132, 3263–3273.
- Sedaghat, Z., & Karimi, N. (2020). Guillain Barre syndrome associated with COVID-19 infection: A case report. *Journal of Clinical Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.04.062>
- Shankland, K. R., Armitage, J. O., & Hancock, B. W. (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, 380, 848–857.
- Sommer C. et al. (2018). *Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden, S2e-Leitlinie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.).
- Soubeyrand, M., Melhem, R., Protais, M., Artuso, M., & Crézé, M. (2020). Anatomy of the median nerve and its clinical applications. *Hand Surgery and Rehabilitation*, 39, 2–18.
- Susuki, K. (2013). Node of Ranvier Disruption as a Cause of Neurological Diseases. *ASN Neuro*, 5, AN20130025.

- Susuki, K., Rasband, M. N., Tohyama, K., Koibuchi, K., Okamoto, S., Funakoshi, K., ... Yuki, N. (2007). Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27, 3956–3967.
- Taams, N. E., Notermans, N. C., Fokkink, W.-J. R., Tio-Gillen, A. P., Huizinga, R., Schreurs, M. W. J., & Jacobs, B. C. (2018). Clinical relevance of serum antibodies to GD1b in immune-mediated neuropathies. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 23, 227–234.
- Themistocleous, A. C., Ramirez, J. D., Serra, J., & Bennett, D. L. H. (2014). The clinical approach to small fibre neuropathy and painful channelopathy. *Practical Neurology*, 14, 368–379.
- Van den Bergh, P. Y. K., Doorn, P. A., Hadden, R. D. M., Avau, B., Vankrunkelsven, P., Allen, J. A., ... Topaloglu, H. A. (2021). European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint Task Force—Second revision. *European Journal of Neurology*, 28, 3556–3583.
- van Paassen, B. W., van der Kooi, A. J., van Spaendonck-Zwarts, K. Y., Verhamme, C., Baas, F., & de Visser, M. (2014). PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 38.
- Virani, A., Rabold, E., Hanson, T., Haag, A., Elrufay, R., Cheema, T., ... Bhanot, N. (2020). Guillain-Barré Syndrome associated with SARS-CoV-2 infection. *IDCases*. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00771>
- Vrancken, A. F. J. E., & Said, G. (2013). Vasculitic neuropathy. In *Handbook of Clinical Neurology* (Bd. 115, S. 463–483). Elsevier.

Wang, J. T., Medress, Z. A., & Barres, B. A. (2012). Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *The Journal of Cell Biology*, 196, 7–18.

Yuki, N., & Hartung, H.-P. (2012). Guillain–Barré Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 366, 2294–2304.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich in den verschiedenen Phasen dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders danken möchte ich ...

- Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgemeinschaft und die Möglichkeit, das vorliegende Thema zu bearbeiten.
- Frau Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler für die herausragende Betreuung während der ersten Phase dieser Arbeit während des Studiums und für deren nahtlose und unermüdliche Fortsetzung nach meinem Start ins Berufsleben.
- Frau Barbara Broll, Frau Barbara Dekant, Frau Hiltrud Klüpfel und Frau Kathleen Stahl. Sie haben als Mitarbeiterinnen des histologischen Labors der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg nicht nur die Kryoschnitte für meine Arbeit angefertigt, sondern mich auch stets mit Rat und Tat im Labor unterstützt.
- den Mitgliedern der Arbeitsgemeinschaft von Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer für Anregungen (hier insbesondere Frau Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler, MHBA) und Hilfestellungen.
- Frau Dr. rer. biol. hum. Cornelia Fiessler vom Lehrstuhl für klinische Epidemiologie und Biometrie der Universität Würzburg für ihre kompetente statistische Beratung.
- allen Patienten und Kontrollpersonen, die sich ohne persönlichen Vorteil zur Teilnahme an dieser Arbeit und zur Hautbiopsie bereit erklärt haben.